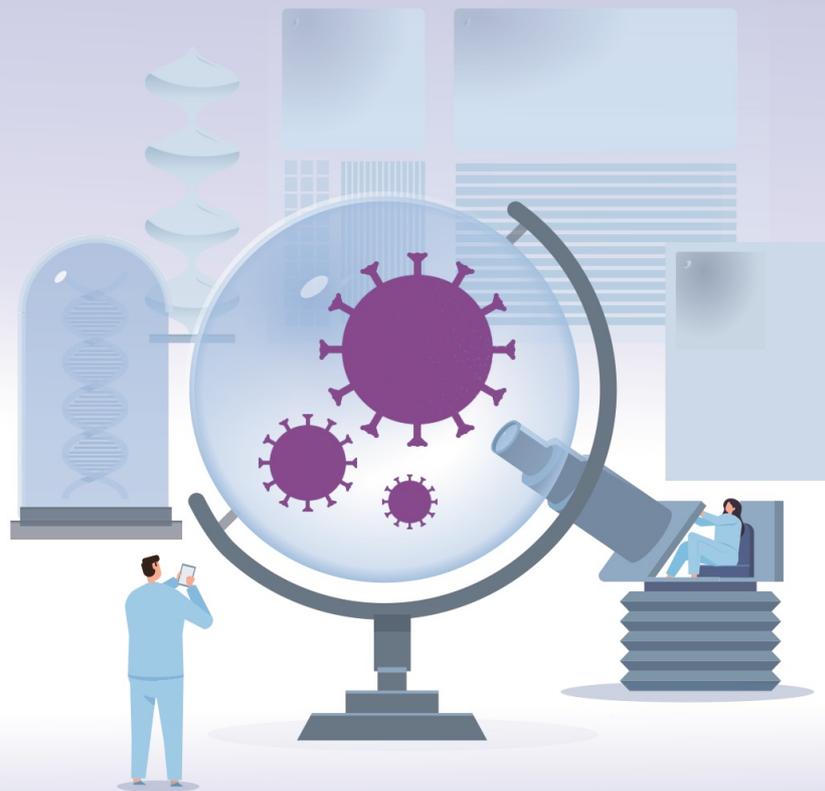


BAKTERIOLOGI

TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS



Yety Eka Sispita Sari, S.Si., STr. Kes., M.Si | Fitrotin Azizah, S.ST., M.Si
Michael Vallery Loueis Tumbol, S.Farm, M.Kes, Apt | Endah Prayekti, S.Si., M.Si
Nurbidayah, M. Pd | Dian Rachma Wijayanti, M.Sc
Rohayati, S.,ST. M.Si | Rima Agnes Widya Astuti, S.Tr.AK., M.Kes
Fera Sartika SKM.,M.Si | Suryani M. Florence Situmeang, S.Pd, M.Kes
Mazidah Noer Inayah, S.Si., M.Si | Chylen Setiyo Rini, S.Si., Msi
Mulya Fitrah Juniawan, S. Si., M. Si | Kasmudin Darmo, S.Si., M.Kes
Yulia Ratna Dewi, S.Tr.A.K.,M.Biomed | Mizan Sahroni, M.Sc
Sanatang, S.Si, M.Kes | Venny Patricia, S.Pd, M.Kes
Anindita Riesti Retno Arimurti, S.Si., M.Si | Ni Putu Sinta Puspa Dewi, S.Si., M.Si

BAKTERIOLOGI 1
TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS

Yety Eka Sispita Sari, S.Si., STr. Kes., M.Si
Fitrotin Azizah, S.ST., M.Si
Michael Vallery Loueis Tumbol, S.Farm , M.Kes, Apt
Endah Prayekti, S.Si., M.Si
Nurbidayah, M. Pd
Dian Rachma Wijayanti, M.Sc
Rohayati, S.,ST. M.Si
Rima Agnes Widya Astuti, S.Tr.AK., M.Kes
Fera Sartika SKM.,M.Si
Suryani M. Florence Situmeang, S.Pd, M.Kes
Mazidah Noer Inayah, S.Si., M.Si
Chylen Setiyo Rini,S.Si.,Msi
Mulya Fitrah Juniawan, S. Si., M. Si
Kasmudin Darmo, S.Si., M.Kes
Yulia Ratna Dewi, S.Tr.A.K.,M.Biomed
Mizan Sahroni, M.Sc
Sanatang, S.Si, M.Kes
Venny Patricia, S.Pd, M.Kes
Anindita Riesti Retno Arimurti, S.Si., M.Si
Ni Putu Sinta Puspa Dewi, S.Si., M.Si



BAKTERIOLOGI 1

TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS

Yety Eka Sisipita Sari, S.Si., STr. Kes., M.Si
Fitrotin Azizah, S.ST., M.Si
Michael Vallery Loueis Tumbol, S.Farm , M.Kes, Apt
Endah Prayekti, S.Si., M.Si
Nurbidayah, M. Pd
Dian Rachma Wijayanti, M.Sc
Rohayati, S.,ST. M.Si
Rima Agnes Widya Astuti, S.Tr.AK., M.Kes
Fera Sartika SKM.,M.Si
Suryani M. Florence Situmeang, S.Pd, M.Kes
Mazidah Noer Inayah, S.Si., M.Si
Chylen Setiyo Rini,S.Si.,Msi
Mulya Fitrah Juniawan, S. Si., M. Si
Kasmudin Darmo, S.Si., M.Kes
Yulia Ratna Dewi, S.Tr.A.K.,M.Biomed
Mizan Sahroni, M.Sc
Sanatang, S.Si, M.Kes
Venny Patricia, S.Pd, M.Kes
Anindita Riesti Retno Arimurti, S.Si., M.Si
Ni Putu Sinta Puspa Dewi, S.Si., M.Si

ISBN : 978-634-7003-64-5

Editor Buku: Oksita Asri Widayanti, S.Si., M.Sc

Cetakan Pertama : 2025

Diterbitkan Oleh :

PT MEDIA PUSTAKA INDO

Jl. Merdeka RT4/RW2 Binangun, Kab. Cilacap, Jawa Tengah

Website: www.mediapustakaindo.com

E-mail: mediapustakaindo@gmail.com

Anggota IKAPI: 263/JTE/2023

Hak Cipta dilindungi oleh undang-undang. Dilarang memperbanyak sebagian karya tulis ini dalam bentuk apapun, baik secara elektronik maupun mekanik, termasuk memfotokopi, merekam, atau dengan menggunakan sistem penyimpanan lainnya, tanpa izin tertulis dari Penulis.

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kepada Tuhan yang Maha Esa yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya kepada saya sehingga buku Bunga Rampai ini dapat tersusun. Buku ini diperuntukkan bagi Dosen, Praktisi, dan Mahasiswa Kesehatan sebagai bahan bacaan dan tambahan referensi.

Buku Bunga Rampai ini berjudul BAKTERIOLOGI 1 TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS mencoba menyuguhkan dan mengemas beberapa hal penting konsep Ilmu Bakteriologi. Buku ini berisi tentang segala hal yang berkaitan dengan konsep Bakteriologi serta konsep lainnya yang disusun oleh beberapa Dosen dari berbagai Perguruan Tinggi.

Buku ini dikemas secara praktis, tidak berbelit-belit dan langsung tepat pada sasaran. Selamat membaca.

Banyumas, 8 Januari 2025

Tim Penulis

DAFTAR ISI

BAB 1_Konsep Dasar Bakteriologi	1
A. Pengertian dan Sejarah Bakteriologi	1
B. Klasifikasi dan Nomenklatur Bakteri.....	5
C. Mekanisme Patogenisitas Bakteri	10
D. Sterilisasi dan Desinfeksi	11
E. Antibiotik dan Resistensi Bakteri	11
F. Peran Bakteri dalam Ekologi dan Industri	12
BAB 2_Klasifikasi Bakteri	18
A. Pengantar Klasifikasi Bakteri	18
B. Klasifikasi Berdasarkan Bentuk atau Morfologi.....	20
C. Klasifikasi Berdasarkan Gram Staining (Pewarnaan Gram).....	21
D. Klasifikasi Berdasarkan Suhu Pertumbuhan	23
E. Klasifikasi Berdasarkan Kebutuhan Oksigen.....	25
F. Klasifikasi Berdasarkan Metabolisme dan Sumber Nutrisi	27
G. Klasifikasi Berdasarkan Habitat atau Lingkungan Hidup.....	28
H. Klasifikasi Berdasarkan Potensi Patogenik (Patogen vs. Nonpatogen).....	31
I. Klasifikasi Berdasarkan Struktur Genetik dan Filogenetik.....	34
BAB 3_Taksonomi dan Nomenklatur Bakteri	38
A. Latar Belakang.....	38
B. Taksonomi.....	39
BAB 4_morfologi Bakteri.....	57
A. Pendahuluan.....	57
B. Morfologi Sel Bakteri.....	59
C. Morfologi Koloni Bakteri	61
BAB 5_Struktur Bakteri	69
A. Pendahuluan.....	69

B. Struktur Dasar	70
C. Struktur Khusus/Tambahan.....	75
BAB 6 Teori Pewarnaan, Reaksi Pewarnaan, Jenis-jenis Pewarnaan dan Prosedur Pewarnaan	82
A. Teori Pewarnaan	82
B. Jenis-jenis Pewarnaan.....	83
C. Prosedur Pewarnaan	86
BAB 7 Pewarnaan Sederhana	94
A. Pendahuluan.....	94
B. Jenis Pewarnaan Sederhana.....	95
C. Aplikasi Pewarnaan Sederhana dalam Diagnostik.....	101
BAB 8 Pewarnaan Gram.....	109
A. Pendahuluan.....	109
B. Prinsip Dasar Pewarnaan Gram.....	109
C. Tahapan Pewarnaan Gram.....	114
D. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Hasil Pewarnaan Gram	116
E. Kesalahan Umum yang Sering Terjadi pada Pewarnaan Gram	117
F. Aplikasi Pewarnaan Gram	117
BAB 9 Pewarnaan Ziehl Neelsen	121
A. Pewarnaan Ziehl Neelsen	121
B. Prosedur Pewarnaan Ziehl Neelsen.....	122
BAB 10 Pewarnaan Kinyoun Gabbet.....	130
A. Pendahuluan.....	130
BAB 11 Pewarnaan Schaeffer-Fulton.....	139
A. Kemampuan Adaptasi Bakteri.....	139
B. Endospora	141
C. Teknik Pewarnaan Endospora	147

BAB 12	Pewarnaan Klein	157
BAB 13	STERILISASI	167
	A. Pengertian Sterilisasi	167
	B. Metode Strerilisasi	168
BAB 14	Isolasi Bakteri.....	182
	A. Definisi Isolasi Bakteri.....	182
	B. Media Tumbuh Bakteri	187
	C. Media, Kondisi Kultur Dan Kebutuhan Nutrisi	193
	D. Metode Isolasi.....	194
	E. Prosedur Isolasi metode spread plate:	196
	F. Pour plate method (Tabur)	199
	G. Prosedur Metode Pour Plate	200
	H. Streak Plate Method (Gores).....	203
	I. Isolasi.....	205
BAB 15	Media Bakteri.....	214
	A. Pendahuluan.....	214
	B. Klasifikasi Media Bakteri Berdasarkan Bentuk	215
	C. Klasifikasi Media Bakteri Berdasarkan Komposisi Kimia..	218
	D. Klasifikasi Media Bakteri Berdasarkan Fungsinya.....	219
	E. Kebutuhan Nutrisi Mikroorganisme.....	221
BAB 16	Reproduksi Bakteri	227
	A. Fisi Biner.....	227
	B. Budding.....	229
	C. Endospora	230
	D. Pertukaran Materi Genetik	232
BAB 17	Metode Kultur Bakteri.....	244
	A. Kultur Bakteri	244
	B. Macam-macam Metode Kultur Bakteri	245

BAB 18	Fisiologi Bakteri.....	256
A.	Definisi dan Peran penting fisiologi bakteri.....	256
B.	Relevansi fisiologi bakteri dalam kesehatan, bioteknologi, dan lingkungan	257
C.	Struktur Seluler Utama Bakteri dan Fungsinya.....	257
D.	Metabolisme Bakteri	259
E.	Regulasi Genetik dan Respon terhadap Lingkungan	262
F.	Aplikasi dan Prospek Masa Depan	264
BAB 19	Pewarnaan Kapsul	272
A.	Pendahuluan.....	272
B.	Lapisan Kapsul.....	273
C.	Komposisi Kapsul.....	274
D.	Fungsi Kapsul.....	274
E.	Pewarnaan Kapsul	275
F.	Metode Pewarnaan Kapsul	275
G.	Aplikasi Pewarnaan Kapsul Bakteri dalam Bidang Penelitian Mikrobiologi.....	278
BAB 20	Pemeriksaan Most Probable Number.....	282
A.	Pendahuluan.....	282
B.	Metode Most Probable Number (MPN)	284

BAB 1

Konsep Dasar Bakteriologi

* Yety Eka Sispita Sari, S.Si., S.Tr.Kes., M.Si*

A. Pengertian dan Sejarah Bakteriologi

1. Definisi bakteri

Bakteri adalah mikroorganisme berukuran mikroskopis yang terdiri dari satu sel dan termasuk dalam kelompok prokariota. Bakteri tidak memiliki inti sel yang terbungkus membran, mempunyai materi genetik berupa DNA di sitoplasma. Bakteri bisa ditemukan di hampir semua tempat di bumi juga semua makhluk hidup sebagai flora normal bahkan sebagai penyebab infeksi.

Ciri-ciri bakteri yaitu:

- Prokariota : Tidak memiliki nukleus yang terbungkus membran.
- Uniseluler : Hanya terdiri dari satu sel.
- Dinding Sel : Memiliki dinding sel yang umumnya mengandung peptidoglikan, bentuk peptidoglikan berbeda pada bakteri Gram-positif dan Gram-negatif.
- Reproduksi: Berkembang biak dengan cara pembelahan biner, yaitu proses aseksual..
- Ukuran: Sangat kecil, biasanya hanya terlihat di bawah mikroskop, dengan ukuran antara 1 hingga 5 mikrometer., sehingga hanya bisa diamati dengan mikroskop.

2. Perkembangan ilmu bakteriologi

Ilmu bakteriologi telah berkembang melalui berbagai tahapan penting, mulai dari hasil penelitian para ilmuwan hingga sekarang transformasi teknologi modern laboratorium yang memudahkan penelitian lebih mendalam tentang mikroorganisme ini. Berikut literatur yang penulis rangkum tentang perkembangan ilmu bakteriologi dari masa ke masa:

Abad ke-17: Penemuan Awal Bakteri

- a. Antonie van Leeuwenhoek (1670-an) : Melalui mikroskop sederhana yang di kembangkan sendiri, Van Leeuwenhoek adalah orang pertama yang mengamati bakteri dan mikroorganisme lain dan menyebutnya sebagai "animalcules." Ini menandai awal dari studi mikrobiologi, meskipun pada saat itu konsep bakteri belum sepenuhnya bisa dipahami.

Abad ke-19: Lahirnya Bakteriologi sebagai Ilmu

- a. Louis Pasteur (1860-an) : Pasteur membuktikan bahwa mikroorganisme penyebab atau organisme yang bisa melakukan fermentasi dan pembusukan, sekaligus menyangkal teori "spontaneous generation" (teori bahwa makhluk hidup bisa muncul dari benda mati). Beliau juga mengembangkan teknik pasteurisasi untuk membunuh bakteri patogen dalam makanan dan minuman.
- b. Robert Koch (1876-1882): Koch mengembangkan metode untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri tertentu, termasuk bakteri penyebab penyakit, seperti *Bacillus anthracis* (penyebab antraks) dan *Mycobacterium tuberculosis* (penyebab tuberkulosis). Koch juga merumuskan "Postulat

Koch," yang merupakan pedoman untuk membuktikan hubungan antara bakteri patogen dan penyakit tertentu.

Abad ke-20: Perkembangan Teknik Laboratorium dan Vaksinasi

- a. Paul Ehrlich (1910): Mengembangkan kemoterapi, yaitu penggunaan senyawa kimia untuk membunuh mikroorganisme penyebab penyakit. Obat pertama yang dikembangkan adalah Salvarsan, untuk mengobati sifilis.
- b. Alexander Fleming (1928): Penemuan antibiotik pertama, penisilin, yang dihasilkan dari jamur **Penicillium notatum**. Ini membuka era baru dalam pengobatan infeksi bakteri dengan antibiotik.
- c. Teknik Pewarnaan Gram (1884): Metode yang ditemukan oleh Hans Christian Gram untuk membedakan bakteri berdasarkan struktur dinding sel atau peptidoglikannya, menjadi kunci identifikasi sel bakteri dalam klasifikasi di laboratorium.

Abad ke-20 (Pertengahan): Perkembangan Teknik Molekuler

- a. Watson dan Crick (1953): Penemuan struktur DNA oleh Watson dan Crick membuka jalan bagi penelitian lebih lanjut tentang genetika bakteri. Ini memungkinkan pemahaman lebih baik tentang bagaimana bakteri bereplikasi dan beradaptasi.
- b. Teknik Rekayasa Genetika (1970-an): Rekayasa genetika mulai diterapkan pada bakteri. Penggunaan teknologi DNA rekombinan memungkinkan ilmuwan untuk memasukkan gen baru ke dalam bakteri, mengubahnya

menjadi agent untuk menghasilkan obat-obatan, hormon (seperti insulin), dan enzim.

Abad ke-21: Revolusi Genomik dan Mikrobiom

- a. Proyek Genom Bakteri (2000-an): Kemajuan dalam teknologi sekuensing genom memungkinkan para ilmuwan untuk membaca seluruh urutan DNA dari berbagai bakteri. Hal ini memberi wawasan mendalam tentang evolusi bakteri, resistensi antibiotik, dan potensi bioteknologi.
- b. Studi Mikrobiom (2010-an): Studi mikrobiom, yaitu kelompok mikroorganisme sebagai flora normal tubuh manusia, sebagai bakteri baik atau Mikrobiom yang terbukti memainkan peran penting dalam kesehatan manusia, termasuk dalam sistem pencernaan, sistem kekebalan tubuh, dan bahkan suasana hati.
- c. CRISPR-Cas9 (2012): Penemuan sistem CRISPR-Cas9, yang awalnya diidentifikasi dalam bakteri, merevolusi dunia bioteknologi sebagai alat pengeditan genetik yang sangat presisi. Ini memberikan dampak besar dalam penelitian genetika dan terapi genetik.

3. Perkembangan Terkini : Resistensi Antibiotik dan Teknologi Baru

- a. Resistensi Antibiotik ditemukan dengan makin banyaknya penelitian tentang antibiotik, bakteri secara perlahan-lahan terjadi kekebalan atau resistensi terhadap obat-obatan yang beredar, sehingga masalah ini menjadi masalah global. Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) telah menyatakan resistensi antibiotik sebagai ancaman kesehatan global, dan banyak

- penelitian berfokus pada pengembangan antibiotik baru serta pendekatan lain untuk mengatasi infeksi bakteri.
- b. Penggunaan AI dan Teknologi Data: Teknologi kecerdasan buatan (AI) dan big data kini digunakan untuk memetakan pola resistensi antibiotik dan mengidentifikasi terapi baru yang tepat aman dan efisien. AI juga digunakan untuk menganalisis mikrobiom dan merancang antibiotik atau probiotik yang lebih efektif.
 - c. Terapi Bakteriofag: Selain antibiotik, penggunaan virus yang menginfeksi bakteri (bakteriofag) sedang dipertimbangkan dan dilakukan penelitian sebagai alternatif dalam mengatasi infeksi bakteri yang resisten terhadap antibiotik.

4. Masa Depan Bakteriologi

- a. Vaksin Baru : Penelitian yang masih berjalan untuk mengembangkan vaksin yang lebih baik sebagai antibakteri atau antibiotik, terutama pada penderita dengan diagnosa tuberkulosis, pneumonia, dan gonore yang resisten terhadap pengobatan.
- b. Pendekatan Ekologis : penelitian bidang bakteriologi semakin melibatkan pendekatan ekologis, dengan fokus pada hubungan antara bakteri dan lingkungan. Ini mencakup pemahaman tentang bagaimana perubahan iklim dan polusi mempengaruhi metabolisme dan pertumbuhan mikroba, dan meneliti apakah mikroba dapat digunakan dalam bioremediasi untuk membersihkan lingkungan.

B. Klasifikasi dan Nomenklatur Bakteri

Sistem klasifikasi bakteri berkembang seiring dengan transformasi teknologi laboratorium.

Klasifikasi bakteri merupakan upaya untuk mengelompokkan berbagai jenis bakteri berdasarkan karakteristik tertentu. Hal ini penting untuk mempermudah identifikasi, pemahaman mengenai hubungan evolusi antar mikroorganisme, serta aplikasi praktis dalam bidang kesehatan, industri, dan lingkungan. Klasifikasi bakteri pada umumnya didasarkan pada tiga aspek utama: morfologi, genetik, dan fisiologi.

1. Klasifikasi Berdasarkan Morfologi

Klasifikasi morfologi berfokus pada bentuk dan struktur sel bakteri yang dapat diamati di bawah mikroskop. Beberapa kriteria penting dalam morfologi bakteri meliputi:

Bentuk Sel:

- Kokus (bulat) : bakteri yang berbentuk bulat seperti bola. Kata “kokus” berasal dari bahasa Yunani “kokkos” yang berarti biji atau butir. Bakteri ini dapat ditemukan dalam berbagai susunan.
 - Monokokus : Kokus tunggal.
 - Diplokokus : Kokus yang berpasangan setelah membelah.
 - Streptokokus : Kokus yang membentuk rantai panjang.
 - Stafilokokus : Kokus yang berkelompok seperti anggur.
 - Tetrad : Kokus yang berkelompok dalam empat sel.
 - Sarcina : Kokus yang membentuk kubus dari delapan sel.

Contoh bakteri kokus termasuk *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus pneumoniae*. Bentuk kokus sering kali terkait dengan patogen penyebab penyakit manusia, terutama infeksi saluran pernapasan dan kulit..

Susunan Sel:

- Diplokokus : Bakteri kokus yang berpasangan, seperti *Neisseria gonorrhoeae*.
 - Streptokokus : Bakteri kokus yang membentuk rantai, seperti *Streptococcus pyogenes*.
 - Stafilokokus : Bakteri kokus yang membentuk gugusan seperti anggur, seperti *Staphylococcus aureus*.
- Basil (batang) : Basil memiliki bentuk batang atau silinder memanjang. Kata “basil” berasal dari bahasa Latin bacillus yang berarti batang kecil. Bakteri berbentuk basil juga memiliki variasi dalam pengelompokannya:
 - Monobasil : Basil tunggal.
 - Diplobasil : Basil yang berpasangan.
 - Streptobasil : Basil yang membentuk rantai.

Bakteri basil umumnya banyak ditemukan di lingkungan dan beberapa spesies penting dalam dunia medis. Contoh bakteri basil termasuk *Escherichia coli*, yang merupakan flora normal usus manusia, dan *Bacillus anthracis*, penyebab penyakit antraks

- Spirillum (spiral) : bakteri yang berbentuk spiral atau heliks. Bakteri ini lebih jelas bentuknya daripada bakteri berbentuk spiral lainnya, seperti spiroketa. Bentuk spiral mereka memungkinkan gerakan rotasi, bakteri ini mempunyai alat gerak berupa flagela di salah satu atau kedua ujung sel, yang membantu bergerak. Contoh bakteri spirillum termasuk *Spirillum minus*, yang dikenal sebagai penyebab demam gigitan tikus. Spirillum cenderung ditemukan di lingkungan perairan dan biasanya bukan patogen pada manusia, meskipun beberapa spesies dapat menyebabkan infeksi dalam kondisi tertentu.
- Vibrio (koma): Memiliki bentuk batang yang melengkung seperti koma atau tanda kurung. Nama ini berasal dari kata Latin “vibrare, yang berarti bergetar, mencerminkan gerakan khas bakteri ini. Vibrio adalah bakteri gram-negatif dan umumnya ditemukan di lingkungan perairan, terutama di lautan. Bakteri ini dapat menjadi patogen berbahaya bagi

manusia. Contoh paling terkenal adalah *Vibrio cholerae*, penyebab kolera, sebuah penyakit diare akut yang menyebar melalui air yang terkontaminasi.

Ukuran :

1. Bakteri biasanya berukuran sangat kecil, dengan panjang berkisar 0,5-5 mikrometer, meskipun ada beberapa yang lebih besar.

Struktur Lainnya:

2. Fitur tambahan seperti keberadaan flagela (alat gerak), pili (alat adhesi), atau kapsul (lapisan pelindung) juga dipertimbangkan dalam klasifikasi morfologi. Contohnya, *Bacillus anthracis* memiliki kapsul yang melindungi dari fagositosis.

2. Klasifikasi Berdasarkan Genetik

Genetika bakteri mencakup materi genetik yang mengontrol fungsi dan pertumbuhan bakteri, serta bagaimana informasi genetik dapat diwariskan dan berubah melalui proses mutasi dan rekombinasi. Materi genetik bakteri terdiri dari DNA kromosom utama dan plasmid, serta bakteri memiliki kemampuan untuk mentransfer gen antar individu melalui mekanisme horizontal. Dalam artikel ini, kita akan membahas komponen materi genetik bakteri, replikasi DNA, transkripsi, translasi, dan mekanisme transfer gen horizontal, serta mutasi dan rekombinasi genetik.

Materi Genetik Bakteri : Kromosom DNA dan Plasmid

Bakteri memiliki dua bentuk utama materi genetik:

Kromosom DNA : Bakteri umumnya memiliki satu molekul DNA sirkular yang besar dan terorganisasi dalam bentuk kromosom. DNA kromosom ini mengandung sebagian besar informasi genetik yang diperlukan untuk semua fungsi seluler dasar, seperti pertumbuhan, replikasi, dan metabolisme. DNA bakteri biasanya tidak terbungkus

dalam membran inti seperti pada eukariota, tetapi tersebar di area yang disebut nukleoid.

Plasmid : Selain kromosom utama, banyak bakteri juga memiliki plasmid, yaitu molekul DNA kecil, sirkular, dan terpisah dari kromosom. Plasmid sering kali membawa gen-gen yang memberi beberapa keuntungan tertentu, seperti resistensi antibiotik, kemampuan untuk memproduksi toksin, atau gen yang memungkinkan bakteri untuk menggunakan substrat tertentu. Plasmid dapat direplikasi secara mandiri dari kromosom, dan sering kali dipindahkan antar sel bakteri melalui mekanisme transfer gen horizontal.

3. Klasifikasi Berdasarkan Fisiologi

Klasifikasi fisiologi berfokus pada aktivitas metabolik dan kebutuhan lingkungan bakteri untuk tumbuh dan berkembang biak. Beberapa faktor penting dalam klasifikasi fisiologi termasuk:

1. Kebutuhan Oksigen:
 - Aerob obligat: Bakteri yang membutuhkan oksigen untuk pertumbuhan. Contoh: *Mycobacterium tuberculosis*.
 - Anaerob obligat: Bakteri yang tidak dapat tumbuh di lingkungan yang mengandung oksigen. Contoh: *Clostridium botulinum*.
 - Anaerob fakultatif: Bakteri yang dapat hidup dengan atau tanpa oksigen. Contoh: *Escherichia coli*.
2. Sumber Energi dan Karbon:
 - Fototrof: Bakteri yang memperoleh energi dari cahaya, seperti *Cyanobacteria*.
 - Kemotrof: Bakteri yang memperoleh energi dari senyawa kimia. Bakteri ini dapat dibagi lagi menjadi:
 - Organotrof: Menggunakan senyawa organik sebagai sumber energi, seperti *Pseudomonas aeruginosa*.

- Litotrof: Menggunakan senyawa anorganik sebagai sumber energi, seperti *Nitrosomonas*.
3. Suhu Optimal Pertumbuhan:
- Psikrofilik: Bakteri yang tumbuh baik pada suhu dingin (0-15°C). Contoh: *Pseudomonas fluorescens*.
 - Mesofilik: Bakteri yang tumbuh optimal pada suhu sedang (20-45°C). Sebagian besar bakteri patogen termasuk dalam kelompok ini.
 - Termofilik: Bakteri yang tumbuh baik pada suhu tinggi (55-80°C). Contoh: *Thermus aquaticus*.

Metabolisme Nitrogen:

Beberapa bakteri mampu memetabolisme nitrogen, misalnya melalui fiksasi nitrogen. *Rhizobium*, misalnya, berperan penting dalam fiksasi nitrogen pada akar tanaman leguminosae.

C. Mekanisme Patogenisitas Bakteri

Mekanisme patogenisitas bakteri melibatkan interaksi kompleks antara bakteri patogen dan tubuh inang. Faktor virulensi bakteri seperti toksin, enzim, adhesi, dan invasi memainkan peran penting dalam kemampuan bakteri untuk menyebabkan penyakit. Proses infeksi bakteri melibatkan kolonisasi, penyebaran, dan kerusakan jaringan, sementara tubuh inang merespon infeksi dengan mengaktifkan sistem imun untuk melawan patogen. Namun, beberapa bakteri telah mengembangkan strategi untuk menghindari respon imun, yang memungkinkan mereka untuk menyebabkan infeksi berkelanjutan dan penyakit yang parah. Memahami mekanisme ini sangat penting untuk pengembangan terapi yang efektif dalam pengendalian infeksi bakteri.

Patogenisitas bakteri mengacu pada kemampuan bakteri untuk menyebabkan penyakit dalam tubuh inang. Proses ini melibatkan interaksi kompleks antara bakteri dan inang, dengan bakteri menggunakan berbagai faktor virulensi untuk menginfeksi dan menyebar, serta menimbulkan kerusakan pada sel-sel inang. Di sisi lain, tubuh inang merespon infeksi dengan mengaktifkan

mekanisme pertahanan untuk melawan invasi bakteri. Artikel ini akan membahas mekanisme patogenisitas bakteri, faktor-faktor virulensi yang digunakan oleh bakteri, serta bagaimana tubuh inang merespon infeksi.

D. Sterilisasi dan Desinfeksi

Sterilisasi dan desinfeksi merupakan metode kunci dalam pengendalian mikroorganisme, dengan peran penting dalam menjaga kebersihan dan mencegah infeksi. Metode fisik seperti pemanasan, filtrasi, dan radiasi digunakan untuk sterilisasi yang memastikan semua mikroorganisme, termasuk spora, dihancurkan. Sementara itu, metode kimia seperti antiseptik dan desinfektan digunakan untuk mengurangi populasi mikroorganisme pada permukaan dan benda mati. Prinsip-prinsip sterilisasi dan desinfeksi melibatkan eliminasi atau pengurangan mikroorganisme yang efektif, penerapan metode yang tepat sesuai dengan bahan atau lingkungan yang disterilkan atau didesinfeksi, serta kontrol yang ketat terhadap faktor-faktor seperti waktu, suhu, dan konsentrasi kimia. Memahami metode ini sangat penting dalam konteks medis, industri, dan sanitasi sehari-hari untuk memastikan kesehatan dan keselamatan yang optimal.

Pengendalian mikroorganisme adalah langkah penting dalam menjaga kebersihan, mencegah infeksi, dan meminimalkan risiko penyebaran penyakit, terutama di lingkungan medis, laboratorium, dan industri makanan.

E. Antibiotik dan Resistensi Bakteri

Antibiotik adalah senyawa yang digunakan untuk mengobati infeksi bakteri dengan membunuh bakteri atau menghambat pertumbuhannya. Namun, penggunaan antibiotik yang tidak tepat atau berlebihan dapat memicu masalah besar, yaitu resistensi antibiotik, di mana bakteri mengembangkan kemampuan untuk bertahan hidup meskipun terpapar antibiotik. Artikel ini akan membahas mekanisme kerja antibiotik, jenis-jenis antibiotik, mekanisme resistensi bakteri terhadap antibiotik, serta pentingnya penggunaan antibiotik yang bijak.

1. Mekanisme Kerja Antibiotik terhadap Bakteri

Antibiotik bekerja dengan menargetkan struktur atau proses penting dalam sel bakteri tanpa merusak sel inang manusia. Tergantung pada mekanismenya, antibiotik dapat membunuh bakteri secara langsung (bakterisida) atau menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik).

Berikut adalah beberapa mekanisme kerja utama antibiotik terhadap bakteri:

- Mengganggu Sintesis Dinding Sel Bakteri:
- Menghambat Sintesis Protein
- Mengganggu Sintesis Asam Nukleat (DNA dan RNA)
- Merusak Membran Sel
- Menghambat Metabolisme Bakteri

F. Peran Bakteri dalam Ekologi dan Industri

Bakteri memiliki peran penting dalam berbagai aspek ekologi dan industri. Dalam ekosistem alami, bakteri memainkan peran kunci dalam menjaga keseimbangan lingkungan melalui siklus biogeokimia seperti fiksasi nitrogen dan dekomposisi. Di sisi lain, dalam industri, bakteri dimanfaatkan dalam berbagai aplikasi seperti fermentasi, bioremediasi, dan produksi antibiotik. Kemampuan bakteri untuk menjalankan proses metabolisme yang beragam menjadikannya alat yang sangat berharga bagi manusia dalam memecahkan masalah lingkungan dan memenuhi kebutuhan industri yang terus berkembang.

1. Peran Bakteri dalam Siklus Biogeokimia

Siklus biogeokimia adalah proses alami yang menggerakkan elemen-elemen kimia penting melalui atmosfer, hidrosfer, biosfer, dan geosfer. Bakteri berperan vital dalam beberapa siklus biogeokimia, terutama dalam siklus nitrogen dan siklus karbon.

1. Fiksasi Nitrogen
2. Dekomposisi
3. Siklus Karbon

2. Aplikasi Bakteri dalam Industri

Selain berperan dalam ekologi, bakteri juga memiliki berbagai aplikasi penting dalam industri. Mikroorganisme ini telah dimanfaatkan untuk mendukung berbagai proses industri yang berdampak luas pada ekonomi, kesehatan, dan lingkungan.

a. Fermentasi:

Fermentasi adalah proses metabolisme di mana bakteri mengubah senyawa organik menjadi produk lain melalui jalur enzimatik, biasanya di bawah kondisi anaerob. Bakteri asam laktat seperti **Lactobacillus** digunakan dalam fermentasi makanan untuk menghasilkan produk seperti yogurt, keju, dan acar, di mana mereka memfermentasi gula menjadi asam laktat, yang memberi rasa asam khas dan membantu mengawetkan produk.

b. Bioremediasi:

Bioremediasi adalah penggunaan bakteri untuk membersihkan lingkungan yang tercemar, terutama dari bahan kimia berbahaya seperti minyak, logam berat, atau polutan organik. Bakteri yang digunakan dalam bioremediasi memiliki kemampuan untuk menguraikan atau mengubah senyawa beracun menjadi zat yang lebih aman.

c. Produksi Antibiotik:

Bakteri adalah sumber utama antibiotik, senyawa yang digunakan untuk melawan infeksi bakteri pada manusia dan hewan. Antibiotik yang pertama kali ditemukan, yaitu **penisilin**, diproduksi oleh jamur *Penicillium*, tetapi banyak antibiotik lain berasal dari bakteri.

d. Produksi Enzim dan Produk Industri Lainnya:

Bakteri juga digunakan dalam produksi enzim yang memiliki berbagai aplikasi industri, seperti dalam produksi detergen, pemrosesan makanan, dan

pengolahan kulit. Bakteri seperti **Bacillus subtilis** menghasilkan enzim amilase yang digunakan dalam industri pembuatan roti untuk

DAFTAR PUSTAKA

- Fadli, M., & Karima, N. (2020). "Dasar-dasar Mikrobiologi: Struktur dan Fungsi Bakteri". Jakarta: Penerbit Universitas Terbuka
- Fatimah, D. (2020). "Mikrobiologi Farmasi". Surabaya: Airlangga University Press.
- Hartono, H. (2020). "Resistensi Antibiotik di Indonesia: Tantangan dalam Era Kesehatan Modern." *Jurnal Kesehatan Masyarakat Nasional*.
- Haryanto, A. (2022). "Biologi Bakteri: Teori dan Praktik". Jakarta: Salemba Medika.
- Indrawati, N. (2022). "Mikrobiologi Dasar: Teori dan Aplikasi". Bandung: Alfabeta
- Nurhayati, S., & Syamsuddin, A. (2021). "Adaptasi Metabolisme Bakteri Terhadap Lingkungan Ekstrem". Jurnal Mikrobiologi Terapan, 8(1), 34-46.
- Purnomo, W. (2004). Mikrobiologi: Dasar dan Aplikasi dalam Kehidupan Sehari-hari. Bumi Aksara.
- Purwoko, A. (2020). "Mikrobiologi Dasar". Bandung: Penerbit ITB.
- Rahman, A., & Fitriana, N. (2022). "Pemanfaatan Bakteri dalam Industri Fermentasi di Indonesia". Jurnal Industri Mikrobiologi, 7(4), 67-80.
- Santoso, D. A. (2021). "Biologi Mikroorganisme". Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Soegiarto, A. (2021). "Mikrobiologi Umum". Surabaya: Airlangga University Press.
- Supriyadi, A., & Mustofa, M. (2022). "Peranan Bakteri dalam Biogeokimia dan Implikasinya Terhadap Kesuburan Tanah". Jurnal Biologi Indonesia, 15(3), 45-60.
- Suparno, A., & Ratnasari, I. (2023). "Bioteknologi Mikrobiologi dan Aplikasinya". Malang: Universitas Brawijaya Press.
- Surjadi, C. (2012). Mikrobiologi Kesehatan Masyarakat. Penerbit Salemba Medika.
- Sutrisno, M. (2022). "Panduan Mikrobiologi untuk Pemula". Semarang: Widya Karya.
- Suhadi, Eko P. (2007). Mikrobiologi Klinik: Suatu Pengantar. EGC..

- Tortora, G.J., Funke, B.R., & Case, C.L. (2018). *Microbiology: An Introduction*. Pearson.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., et al. (2014). *Brock Biology of Microorganisms*. Benjamin Cummings.
- Wibowo, S. (2021). "Mikrobiologi Kesehatan". Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Widjaja, R., & Setiawan, Y. (2023). "Penggunaan Bakteri untuk Bioremediasi: Potensi dan Tantangan di Indonesia". *Jurnal Teknologi Lingkungan*, 10(2), 78-90.

BIODATA PENULIS



YETY EKA SISPITA SARI, S.Si., S.Tr.Kes., M.Si

Telepon: +6285335383184

Email: yetyikas.s@um-surabaya.ac.id

Saya berpengalaman di bidang teknologi laboratorium medis dengan lebih dari 15 tahun pengalaman bekerja di laboratorium. Perjalanan akademis laboratorium saya dimulai dengan D3 di Analisis Kesehatan lulus tahun 2003-2004 langsung ditempatkan di Sekartanjung Dairy Industry Pasuruan sebagai Quality control mikrobiologi. kemudian sambil melanjutkan kuliah S1 saya dilibatkan penelitian internasional antara Indonesia dan Belanda sebagai asisten peneliti merangkap bekerja di instalasi mikrobiologi RSUD DR SOETOMO dan pada tahun 2008 saya dipercaya untuk mengelola laboratorium histopatologi forensik di Departemen Forensik dan Medicolegal. Tahun 2017 sampai Saat ini, saya mendedikasikan keahlian saya untuk memajukan pendidikan dan penelitian di Universitas Muhammadiyah Surabaya.

Keahlian dan Kompetensi

- Manajemen Laboratorium Medis
- Penelitian Mikrobiologi
- Penelitian Patologi Anatomi
- Histopatologi Forensik
- Teknologi Diagnostik
- Sistem Manajemen Informasi Laboratorium (LIMS)
- Otomasi dalam Proses Laboratorium
- Manajemen Penelitian kesehatan.

A. Pengantar Klasifikasi Bakteri

Bakteri adalah mikroorganisme prokariotik yang memiliki keragaman bentuk, fungsi, dan habitat. Sebagai organisme yang penting dalam berbagai bidang, mulai dari kesehatan hingga ekologi, memahami cara mengklasifikasikan bakteri menjadi langkah mendasar untuk mendalami ilmu mikrobiologi.

Klasifikasi bakteri bertujuan untuk mengorganisasikan keanekaragaman mereka ke dalam kelompok yang memiliki karakteristik serupa. Pendekatan ini membantu ilmuwan untuk mengidentifikasi, mempelajari, dan memanfaatkan bakteri dengan lebih efektif. Sistem klasifikasi bakteri umumnya didasarkan pada beberapa karakteristik utama, yaitu:

1. Morfologi Sel

Morfologi mengacu pada bentuk fisik bakteri, termasuk ukuran, bentuk (misalnya, kokus, basil, spiral), dan keberadaan struktur khusus seperti flagela atau kapsul.

2. Ciri Fisiologis dan Biokimia

Klasifikasi fisiologis dan biokimia mencakup cara bakteri memperoleh energi, kebutuhan nutrisinya, kemampuan memfermentasi, serta sensitivitas terhadap berbagai kondisi lingkungan.

3. Komposisi Genetik

Pendekatan molekuler, seperti analisis DNA ribosom 16S, telah menjadi alat penting dalam klasifikasi modern. Pendekatan ini memungkinkan pengelompokan yang lebih akurat berdasarkan hubungan evolusi.

4. Reaksi Gram

Pewarnaan Gram membagi bakteri menjadi dua kelompok utama: Gram positif dan Gram negatif, berdasarkan struktur dinding sel mereka.

5. Habitat dan Ekologi

Faktor lingkungan, seperti tempat hidup bakteri, apakah bersifat patogen, simbiotik, atau saprofit, juga menjadi dasar klasifikasi.

Tujuan Klasifikasi

Klasifikasi dalam ilmu biologi, termasuk mikrobiologi, bertujuan untuk mengorganisasikan dan mengelompokkan makhluk hidup berdasarkan persamaan dan perbedaan yang dimilikinya. Dalam konteks bakteri, klasifikasi membantu menyusun informasi tentang berbagai spesies bakteri ke dalam sistem yang sistematis dan mudah dipahami. Hal ini tidak hanya penting untuk memahami keanekaragaman biologis, tetapi juga untuk memanfaatkan bakteri secara lebih efektif dalam berbagai bidang, seperti medis, lingkungan, dan industri.

Tujuan Utama Klasifikasi

1. Identifikasi Organisme

Klasifikasi membantu ilmuwan mengenali dan mengidentifikasi organisme dengan memberikan nama yang terstandar. Proses ini memungkinkan komunikasi yang konsisten antara para ilmuwan di seluruh dunia.

2. Mengungkap Hubungan Evolusi

Melalui pendekatan filogenetik, klasifikasi bertujuan untuk mengidentifikasi hubungan evolusi antara organisme. Ini memberikan wawasan tentang bagaimana organisme berevolusi dan beradaptasi dalam berbagai lingkungan.

3. Mempermudah Studi dan Penelitian

Dengan mengelompokkan organisme berdasarkan karakteristik serupa, klasifikasi menyediakan struktur yang membantu para peneliti mempelajari karakteristik umum dan unik dari masing-masing kelompok.

4. Aplikasi Praktis

Dalam dunia kedokteran, klasifikasi bakteri memungkinkan identifikasi patogen yang menyebabkan penyakit dan menentukan pengobatan yang tepat. Di industri, ini membantu mengenali bakteri yang bermanfaat, seperti dalam fermentasi atau pengolahan limbah.

5. Pelestarian Keanekaragaman Hayati

Klasifikasi juga membantu dalam pelestarian keanekaragaman hayati dengan memberikan data tentang spesies yang mungkin langka atau terancam punah.

6. Standarisasi dan Komunikasi Ilmiah

Sistem klasifikasi yang terstandar, seperti sistem taksonomi, memungkinkan penyebaran informasi yang akurat dan seragam di berbagai disiplin ilmu.

Pentingnya Klasifikasi Bakteri

Klasifikasi bakteri memberikan landasan untuk memahami patogenesis penyakit, pengembangan antibiotik, dan eksplorasi aplikasi bioteknologi. Sebagai contoh, identifikasi bakteri patogen membantu dalam diagnosis klinis dan penentuan terapi yang tepat.

B. Klasifikasi Berdasarkan Bentuk atau Morfologi

Salah satu cara paling dasar dalam mengklasifikasikan bakteri adalah berdasarkan bentuk atau morfologinya. Pendekatan ini mengacu pada penampilan fisik bakteri yang dapat diamati di bawah mikroskop. Morfologi bakteri memberikan informasi awal yang penting dalam identifikasi bakteri dan sering digunakan dalam diagnosa mikrobiologi.

Bentuk Utama Bakteri

1. Kokus (Coccus)

- a. Bentuk: Bulat atau menyerupai bola.
- b. Contoh: *Staphylococcus aureus* (berbentuk kelompok seperti anggur), *Streptococcus pyogenes* (berbentuk rantai).

- c. Karakteristik: Biasanya ditemukan secara tunggal, berpasangan (diplokokus), berkelompok (stafilokokus), atau dalam rantai (streptokokus).
- 2. Basil (Bacillus)**
- a. Bentuk: Silinder atau batang.
 - b. Contoh: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*.
 - c. Karakteristik: Dapat ditemukan secara tunggal, berpasangan, atau membentuk rantai panjang.
- 3. Spiral (Spirilla dan Spirochetes)**
- a. Bentuk: Melengkung atau berbentuk spiral.
 - b. Contoh: *Treponema pallidum* (spirochete), *Spirillum volutans* (spirilla).
 - c. Karakteristik: Spirilla cenderung memiliki struktur yang kaku, sedangkan spirochete lebih fleksibel.
- 4. Vibrio**
- a. Bentuk: Lengkung menyerupai koma.
 - b. Contoh: *Vibrio cholerae* (penyebab kolera).
 - c. Karakteristik: Sering kali ditemukan di lingkungan perairan.
- 5. Filamentous**
- a. Bentuk: Seperti benang panjang yang bercabang.
 - b. Contoh: *Streptomyces* (sering ditemukan di tanah).
 - c. Karakteristik: Membentuk koloni mirip jamur dan sering menghasilkan antibiotik.

Pentingnya Klasifikasi Berdasarkan Morfologi

Klasifikasi morfologi tidak hanya mempermudah pengenalan bakteri tetapi juga memberikan petunjuk awal tentang sifat biologisnya, seperti cara pergerakan, reproduksi, atau interaksinya dengan inang.

C. Klasifikasi Berdasarkan Gram Staining (Pewarnaan Gram)

Pewarnaan Gram adalah metode klasifikasi bakteri yang pertama kali diperkenalkan oleh Hans Christian Gram pada tahun 1884. Metode ini didasarkan pada perbedaan struktur dinding sel bakteri, yang memengaruhi kemampuan mereka untuk mempertahankan pewarna kristal violet selama proses

pewarnaan. Dengan teknik ini, bakteri dibagi menjadi dua kelompok utama: Gram-positif dan Gram-negatif.

Proses Pewarnaan Gram

1. Langkah Pewarnaan

- a. Bakteri diwarnai dengan pewarna utama, kristal violet.
- b. Ditambahkan larutan iod untuk membentuk kompleks pewarna-iod di dalam sel.
- c. Bakteri dicuci dengan alkohol atau aseton untuk melarutkan kompleks pada dinding sel tertentu.
- d. Diwarnai kembali dengan safranin sebagai pewarna tandingan.

2. Hasil Pewarnaan

- a. **Gram-positif:** Berwarna ungu karena mampu mempertahankan kristal violet.
- b. **Gram-negatif:** Berwarna merah muda atau merah karena kehilangan kristal violet dan hanya mempertahankan pewarna tandingan safranin.

Struktur Dinding Sel sebagai Dasar Klasifikasi

1. Bakteri Gram-positif

- a. Memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal pada dinding selnya.
- b. Tidak memiliki membran luar seperti bakteri Gram-negatif.
- c. Contoh: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*.

2. Bakteri Gram-negatif

- a. Memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis, tetapi dilindungi oleh membran luar yang mengandung lipopolisakarida (LPS).
- b. Membran luar memberikan perlindungan tambahan, membuat Gram-negatif sering lebih resisten terhadap antibiotik.
- c. Contoh: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*.

Signifikansi Pewarnaan Gram

1. Diagnosis Klinis

Pewarnaan Gram membantu dalam identifikasi cepat jenis bakteri yang menyebabkan infeksi, sehingga memandu pilihan pengobatan yang tepat.

2. Pengembangan Antibiotik

Gram-positif dan Gram-negatif memiliki respons berbeda terhadap antibiotik tertentu, seperti penisilin yang lebih efektif terhadap Gram-positif.

3. Penelitian Mikrobiologi

Metode ini menjadi langkah awal untuk mengklasifikasikan bakteri sebelum dilakukan analisis lebih lanjut.

D. Klasifikasi Berdasarkan Suhu Pertumbuhan

Suhu merupakan salah satu faktor lingkungan utama yang memengaruhi pertumbuhan bakteri. Berdasarkan suhu pertumbuhannya, bakteri dikelompokkan menjadi beberapa kategori yang mencerminkan adaptasi mereka terhadap lingkungan tertentu. Setiap kelompok memiliki suhu minimum, optimum, dan maksimum untuk pertumbuhan.

Klasifikasi Bakteri Berdasarkan Suhu

1. Psikrofil

a. Ciri-ciri:

Psikrofil tumbuh pada suhu rendah, dengan suhu optimum di bawah 15°C dan suhu maksimum sekitar 20°C.

b. Contoh habitat: Lingkungan dingin seperti dasar laut, salju, atau daerah kutub.

c. Contoh bakteri: *Psychrobacter* spp., *Shewanella* spp.

2. Psikrotrof

a. Ciri-ciri:

Psikrotrof dapat tumbuh pada suhu rendah, tetapi suhu optimalnya antara 20–30°C. Mereka sering ditemukan pada makanan yang disimpan di lemari es.

b. Contoh bakteri: *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fluorescens*.

3. Mesofil

a. Ciri-ciri:

Mesofil tumbuh pada suhu sedang, dengan suhu optimal antara 25–40°C. Kelompok ini mencakup

banyak bakteri patogen yang dapat menginfeksi manusia karena suhu tubuh manusia sesuai untuk pertumbuhan mereka.

- b. **Contoh habitat:** Tubuh manusia, tanah, atau air.
- c. **Contoh bakteri:** *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

4. Termofil

- a. **Ciri-ciri:**

Termofil tumbuh pada suhu tinggi, dengan suhu optimal antara 50–70°C. Mereka biasanya ditemukan di lingkungan panas seperti sumber air panas dan tanah vulkanik.

- b. **Contoh bakteri:** *Thermus aquaticus*, *Geobacillus stearothermophilus*.

5. Hipertermofil

- a. **Ciri-ciri:**

Hipertermofil mampu tumbuh pada suhu ekstrem, dengan suhu optimum di atas 80°C dan beberapa hingga 121°C. Mereka sering ditemukan di lingkungan ekstrem seperti ventilasi hidrotermal di dasar laut.

- b. **Contoh bakteri:** *Thermococcus* spp., *Pyrolobus fumarii*.

Pentingnya Klasifikasi Berdasarkan Suhu Pertumbuhan

1. Industri Pangan

Pengetahuan tentang psikrotrof membantu dalam mencegah kontaminasi makanan di lemari es, sementara mesofil relevan untuk keamanan pangan pada suhu ruang.

2. Penelitian dan Bioteknologi

Enzim dari bakteri termofil, seperti Taq polimerase dari *Thermus aquaticus*, digunakan dalam teknik PCR (Polymerase Chain Reaction).

3. Ekologi Mikroba

Klasifikasi ini membantu memahami adaptasi bakteri terhadap lingkungan ekstrem dan peran mereka dalam ekosistem tertentu.

E. Klasifikasi Berdasarkan Kebutuhan Oksigen

Kebutuhan oksigen merupakan salah satu faktor penting yang memengaruhi metabolisme dan pertumbuhan bakteri. Berdasarkan toleransi dan kebutuhan mereka terhadap oksigen, bakteri dapat diklasifikasikan menjadi beberapa kelompok. Hal ini mencerminkan cara mereka menghasilkan energi dan enzim yang dimiliki untuk menghadapi lingkungan kaya atau miskin oksigen.

Klasifikasi Bakteri Berdasarkan Kebutuhan Oksigen

1. Aerob Obligat

a. Ciri-ciri:

Mebutuhkan oksigen untuk pertumbuhan karena menggunakan oksigen sebagai akseptor elektron terakhir dalam respirasi aerob.

b. **Contoh bakteri:** *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*.

c. **Habitat:** Lingkungan dengan kadar oksigen tinggi, seperti udara bebas atau jaringan tubuh tertentu.

2. Anaerob Obligat

a. Ciri-ciri:

Tidak dapat tumbuh di lingkungan yang mengandung oksigen karena oksigen bersifat toksik bagi mereka. Energi dihasilkan melalui fermentasi atau respirasi anaerob.

b. **Contoh bakteri:** *Clostridium botulinum*, *Bacteroides fragilis*.

c. **Habitat:** Lingkungan tanpa oksigen, seperti tanah dalam atau saluran pencernaan.

3. Anaerob Fakultatif

a. Ciri-ciri:

Dapat hidup baik dengan atau tanpa oksigen. Ketika oksigen tersedia, mereka menggunakan respirasi aerob, tetapi dalam kondisi tanpa oksigen, mereka beralih ke fermentasi atau respirasi anaerob.

- b. **Contoh bakteri:** *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.
 - c. **Habitat:** Beragam, mulai dari tubuh manusia hingga lingkungan bebas oksigen.
- 4. Aerotoleran Anaerob**
- a. **Ciri-ciri:**
Tidak menggunakan oksigen untuk metabolisme, tetapi mampu bertahan di lingkungan yang mengandung oksigen. Energi dihasilkan melalui fermentasi.
 - b. **Contoh bakteri:** *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus spp.*
 - c. **Habitat:** Saluran pencernaan atau lingkungan kaya zat organik.
- 5. Mikroaerofil**
- a. **Ciri-ciri:**
Membutuhkan oksigen untuk tumbuh, tetapi hanya dalam konsentrasi rendah (2-10%). Konsentrasi oksigen tinggi bersifat toksik bagi mereka.
 - b. **Contoh bakteri:** *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*.
 - c. **Habitat:** Lingkungan seperti mukosa saluran pencernaan atau air dengan kadar oksigen rendah.

Signifikansi Klasifikasi Berdasarkan Kebutuhan Oksigen

1. Kedokteran

Pengetahuan tentang kebutuhan oksigen bakteri membantu dalam diagnosis penyakit dan perancangan terapi, misalnya penggunaan antibiotik yang spesifik terhadap anaerob obligat pada infeksi dalam tubuh.

2. Industri Makanan dan Minuman

Anaerob fakultatif dan aerotoleran digunakan dalam fermentasi untuk menghasilkan produk seperti yogurt, keju, atau alkohol.

Ekosistem Mikroba

Klasifikasi ini membantu memahami peran bakteri dalam daur biogeokimia, seperti daur karbon atau nitrogen, di lingkungan dengan kadar oksigen yang bervariasi.

F. Klasifikasi Berdasarkan Metabolisme dan Sumber Nutrisi

Bakteri dapat diklasifikasikan berdasarkan cara mereka memperoleh energi dan karbon sebagai sumber nutrisi untuk menjalankan metabolisme. Klasifikasi ini penting untuk memahami bagaimana bakteri bertahan hidup di berbagai lingkungan dan perannya dalam siklus biogeokimia.

Klasifikasi Berdasarkan Sumber Energi

1. Fototrof

a. Ciri-ciri:

Menggunakan cahaya sebagai sumber energi utama. Fototrof biasanya memiliki pigmen fotosintetik seperti klorofil.

b. Contoh bakteri: *Cyanobacteria*, *Rhodobacter spp.*

2. Kemotrof

a. Ciri-ciri:

Memperoleh energi dari reaksi kimia dengan mengoksidasi senyawa organik atau anorganik.

b. Subkategori:

- **Kemolitotrof:** Menggunakan senyawa anorganik seperti H_2S , NH_3 , atau Fe^{2+} sebagai donor elektron. Contoh: *Nitrosomonas spp.*, *Thiobacillus spp.*
- **Kemoorganotrof:** Menggunakan senyawa organik sebagai sumber energi. Contoh: *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*

Klasifikasi Berdasarkan Sumber Karbon

1. Autotrof

a. Ciri-ciri:

Menggunakan karbon dioksida (CO_2) sebagai sumber karbon untuk sintesis biomolekul.

b. Contoh bakteri: *Nitrosomonas spp.* (kemolitotrof autotrof), *Cyanobacteria* (fototrof autotrof).

2. Heterotrof

a. Ciri-ciri:

Memperoleh karbon dari senyawa organik yang dihasilkan oleh organisme lain.

b. Contoh bakteri: *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus aureus*.

Klasifikasi Berdasarkan Metabolisme Energi

1. Respirasi Aerob

a. Ciri-ciri:

Menggunakan oksigen sebagai akseptor elektron terakhir dalam respirasi. Energi dihasilkan dengan efisiensi tinggi.

b. Contoh bakteri: *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Respirasi Anaerob

a. Ciri-ciri:

Menggunakan senyawa lain seperti nitrat, sulfat, atau karbonat sebagai akseptor elektron terakhir.

b. Contoh bakteri: *Desulfovibrio spp.*, *Clostridium spp.*

3. Fermentasi

a. Ciri-ciri:

Energi dihasilkan tanpa menggunakan rantai transport elektron. Produk akhir berupa asam, alkohol, atau gas.

b. Contoh bakteri: *Lactobacillus spp.*, *Saccharomyces cerevisiae* (meskipun ini adalah ragi, prinsip fermentasinya sama).

Signifikansi Klasifikasi Berdasarkan Metabolisme dan Sumber Nutrisi

1. Ekologi Mikroba

Bakteri dengan berbagai jalur metabolisme memainkan peran penting dalam siklus karbon, nitrogen, dan sulfur di lingkungan.

2. Industri

Bakteri heterotrof seperti *Lactobacillus* digunakan dalam fermentasi makanan, sedangkan kemolitotrof autotrof seperti *Nitrosomonas* penting dalam pengolahan limbah.

3. Kesehatan

Memahami jalur metabolisme bakteri patogen membantu dalam pengembangan antibiotik dan terapi.

G. Klasifikasi Berdasarkan Habitat atau Lingkungan Hidup

Habitat bakteri mencerminkan lingkungan fisik, kimia, dan biologis di mana mereka mampu bertahan hidup dan

berkembang. Berdasarkan habitat atau lingkungan hidup, bakteri dapat diklasifikasikan menjadi beberapa kelompok yang menyesuaikan diri dengan kondisi tertentu. Klasifikasi ini penting untuk memahami peran ekologis dan potensinya dalam berbagai aplikasi, termasuk medis, industri, dan lingkungan.

Klasifikasi Bakteri Berdasarkan Habitat

1. Bakteri Tanah

a. Ciri-ciri:

Hidup di tanah, baik di permukaan maupun dalam lapisan tanah. Bakteri ini sering terlibat dalam dekomposisi bahan organik dan siklus biogeokimia seperti siklus nitrogen.

b. **Contoh bakteri:** *Bacillus subtilis*, *Nitrosomonas spp.*, *Clostridium spp.*

2. Bakteri Air

a. Ciri-ciri:

Hidup di lingkungan perairan, baik air tawar, air asin, maupun air payau. Beberapa bakteri air bersifat fotosintetik dan mendukung rantai makanan akuatik.

b. **Contoh bakteri:** *Cyanobacteria* (penghasil oksigen), *Vibrio cholerae* (patogen).

3. Bakteri Halofilik

a. Ciri-ciri:

Hidup di lingkungan dengan kadar garam tinggi, seperti danau garam atau tambak garam. Mereka sering memiliki adaptasi khusus untuk mempertahankan osmoregulasi.

b. **Contoh bakteri:** *Halobacterium spp.*, *Salinibacter spp.*

4. Bakteri Termofilik

a. Ciri-ciri:

Toleran terhadap suhu tinggi, biasanya ditemukan di sumber air panas atau lingkungan vulkanik. Mereka sering menghasilkan enzim termostabil yang berguna dalam bioteknologi.

b. **Contoh bakteri:** *Thermus aquaticus*, *Geobacillus stearothermophilus*.

5. Bakteri Psikrofilik

a. Ciri-ciri:

Tumbuh optimal pada suhu rendah, ditemukan di lingkungan dingin seperti daerah kutub atau dasar laut.

b. Contoh bakteri: *Psychrobacter spp.*, *Shewanella spp.*

6. Bakteri Asidofilik

a. Ciri-ciri:

Hidup di lingkungan dengan pH rendah (asam), seperti tambang asam atau tanah asam.

b. Contoh bakteri: *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

7. Bakteri Alkalifilik

a. Ciri-ciri:

Tumbuh di lingkungan dengan pH tinggi (basa), seperti tanah alkali atau air soda.

b. Contoh bakteri: *Bacillus alcalophilus*.

8. Bakteri Endofitik

a. Ciri-ciri:

Hidup di dalam jaringan tanaman tanpa menyebabkan kerusakan. Mereka sering memiliki hubungan mutualisme dengan inangnya.

b. Contoh bakteri: *Rhizobium spp.* (fiksasi nitrogen di akar tanaman).

9. Bakteri Patogen

a. Ciri-ciri:

Hidup di tubuh inang manusia, hewan, atau tumbuhan, menyebabkan penyakit.

b. Contoh bakteri: *Salmonella typhi* (penyebab tifus), *Mycobacterium tuberculosis* (penyebab tuberkulosis).

Signifikansi Klasifikasi Berdasarkan Habitat

1. Ekologi Mikroba

Memahami peran bakteri dalam lingkungan tertentu membantu menjelaskan dinamika ekosistem, seperti peran bakteri tanah dalam dekomposisi dan daur nitrogen.

2. Aplikasi Bioteknologi

Bakteri dari habitat ekstrem seperti termofilik atau halofilik sering digunakan untuk produksi enzim atau bahan kimia yang stabil dalam kondisi ekstrem.

3. Kesehatan dan Pengendalian Penyakit

Klasifikasi ini membantu mengidentifikasi patogen dan memahami cara mencegah atau mengobati infeksi.

H. Klasifikasi Berdasarkan Potensi Patogenik (Patogen vs. Nonpatogen)

Dalam dunia mikrobiologi, mikroorganisme dapat diklasifikasikan berdasarkan potensi patogeniknya menjadi dua kelompok utama, yaitu patogen dan nonpatogen. Klasifikasi ini penting untuk memahami kemampuan mikroorganisme dalam menyebabkan penyakit, serta untuk mengembangkan strategi pencegahan, pengendalian, dan pengobatan yang efektif.

1. Mikroorganisme Patogen

a. Definisi

Patogen adalah mikroorganisme yang memiliki kemampuan untuk menyebabkan penyakit pada inangnya, baik melalui infeksi langsung maupun produksi toksin. Mikroorganisme patogen meliputi bakteri, virus, jamur, dan parasit.

b. Mekanisme Patogenisitas

Patogenisitas adalah kemampuan mikroorganisme untuk menyebabkan penyakit, yang ditentukan oleh faktor-faktor berikut:

- 1) Faktor Virulensi: Molekul yang membantu mikroorganisme menginvasi inang, menghindari sistem imun, dan menyebabkan kerusakan jaringan, seperti toksin, enzim proteolitik, dan adhesin.
- 2) Kemampuan Invasi: Patogen dapat menembus lapisan pelindung tubuh, seperti kulit atau mukosa, untuk menginfeksi jaringan internal.

- 3) Kemampuan Replikasi: Patogen dapat berkembang biak dengan cepat di dalam inang, menyebabkan kerusakan jaringan yang meluas.

c. Contoh Patogen

- 1) Bakteri: *Escherichia coli* strain O157:H7, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica*.
- 2) Virus: Virus Dengue, HIV, Influenza.
- 3) Jamur: *Candida albicans* (dalam kondisi immunosupresi).
- 4) Parasit: *Plasmodium falciparum* (penyebab malaria).

2. Mikroorganisme Nonpatogen

a. Definisi

Nonpatogen adalah mikroorganisme yang umumnya tidak menyebabkan penyakit pada inang sehat. Sebagian besar mikroorganisme ini berperan dalam keseimbangan ekosistem atau memberikan manfaat bagi inang.

b. Peran Mikroorganisme Nonpatogen

- 1) Komensal: Mikroorganisme yang hidup di tubuh inang tanpa menyebabkan kerusakan, seperti sebagian besar flora normal tubuh (*Lactobacillus spp.* di usus atau *Staphylococcus epidermidis* di kulit).
- 2) Simbiosis: Mikroorganisme yang memberikan manfaat bagi inang, seperti bakteri probiotik (*Bifidobacterium spp.*) yang mendukung kesehatan pencernaan.
- 3) Pemecahan Limbah: Mikroorganisme yang digunakan dalam bioteknologi untuk mendaur ulang limbah atau menghasilkan produk industri.

c. Contoh Nonpatogen

- 1) *Lactobacillus acidophilus*: Mendukung kesehatan usus.
- 2) *Escherichia coli* (strain non-patogen): Bagian dari flora usus normal manusia.
- 3) *Bacillus subtilis*: Digunakan dalam produksi enzim industri.

3. Mikroorganisme Opportunistik

Beberapa mikroorganisme bersifat oportunistik, yang berarti biasanya nonpatogen tetapi dapat menjadi patogen dalam kondisi tertentu, seperti:

- 1) Inang dengan sistem imun lemah (misalnya, pada penderita HIV/AIDS).
- 2) Ketidakseimbangan flora normal akibat penggunaan antibiotik.
- 3) Trauma fisik atau luka yang memungkinkan mikroorganisme masuk ke jaringan steril.

Contoh mikroorganisme oportunistik: *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, dan *Klebsiella pneumoniae*.

4. Perbedaan Utama antara Patogen dan Nonpatogen

Tabel 2.1 Perbedaan Patogen dan Non Patogen

Aspek	Patogen	Nonpatogen
Kemampuan Menyebabkan Penyakit	Memiliki faktor virulensi dan dapat menyebabkan infeksi.	Tidak menyebabkan penyakit pada inang sehat.
Interaksi dengan Inang	Menginvasi dan merusak jaringan inang.	Hidup harmonis atau memberikan manfaat pada inang.
Contoh	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , Virus Dengue.	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> .

5. Signifikansi Klasifikasi

Klasifikasi mikroorganisme berdasarkan potensi patogeniknya penting dalam:

- a. **Diagnosis dan Pengobatan:** Membantu menentukan pendekatan terapi yang sesuai.
- b. **Pencegahan Penyakit:** Memahami cara penularan dan mekanisme patogenitas dapat membantu dalam pengembangan vaksin dan kebijakan kesehatan.

- c. **Pengembangan Bioteknologi:** Mikroorganisme nonpatogen digunakan dalam berbagai aplikasi, seperti probiotik dan bioremediasi.

I. Klasifikasi Berdasarkan Struktur Genetik dan Filogenetik

Klasifikasi organisme berdasarkan struktur genetik dan filogenetik merupakan pendekatan modern yang menggunakan analisis molekuler untuk memahami hubungan evolusi antar organisme. Pendekatan ini berkembang pesat seiring kemajuan teknologi genomik dan bioinformatika, memungkinkan peneliti untuk menyusun pohon filogenetik yang lebih akurat berdasarkan data genetik.

1. Struktur Genetik

Struktur genetik mengacu pada informasi yang terkandung dalam DNA atau RNA suatu organisme. Dengan mempelajari sekuens genetik, para ilmuwan dapat mengidentifikasi perbedaan dan persamaan gen antarspesies.

Teknologi yang Digunakan:

- a. **Pengurutan Genom:** Penggunaan teknologi seperti *next-generation sequencing* (NGS) untuk membaca seluruh genom suatu organisme.
- b. **Marker Genetik:** Penanda seperti gen ribosomal RNA (16S rRNA untuk bakteri dan arkea, serta 18S rRNA untuk eukariota) sering digunakan untuk analisis filogenetik.
- c. **Analisis Variasi Genetik:** Pendekatan seperti *single nucleotide polymorphism* (SNP) dan *indels* membantu memahami variasi genetik di tingkat populasi maupun spesies.

2. Filogenetik

Filogenetik adalah studi tentang hubungan evolusi antarorganisme berdasarkan data genetik, morfologi, atau molekuler lainnya. Hubungan ini digambarkan melalui pohon filogenetik (*phylogenetic tree*), yang menunjukkan bagaimana spesies berevolusi dari nenek moyang bersama.

Metode Utama:

- a. **Pendekatan Molekuler:** Analisis urutan gen, seperti mitokondria atau gen ribosom, untuk menyusun hubungan evolusi.
- b. **Pendekatan Komputasi:** Algoritma seperti *maximum likelihood* (ML), *neighbor joining* (NJ), dan *Bayesian inference* digunakan untuk membangun pohon filogenetik.
- c. **Konsep Monofili dan Polifili:** Filogenetik modern menekankan pentingnya klasifikasi monofiletik, di mana semua anggota kelompok berasal dari nenek moyang yang sama.

Penerapan

- a. **Taksonomi Modern:** Menggunakan filogenetik untuk memperbaiki sistem klasifikasi tradisional yang sering kali didasarkan pada ciri morfologi saja.
- b. **Ekologi dan Evolusi:** Memahami hubungan antarspesies dalam ekosistem serta pola evolusi tertentu.
- c. **Medis dan Bioteknologi:** Mengidentifikasi patogen atau mengembangkan organisme rekayasa genetik berdasarkan hubungan filogenetik.

Keunggulan

Pendekatan genetik dan filogenetik memberikan klasifikasi yang lebih objektif dan didukung oleh data kuantitatif. Hal ini membantu mengurangi subjektivitas dalam sistem klasifikasi tradisional.

Kelemahan

Namun, pendekatan ini juga memiliki keterbatasan, seperti kebutuhan akan data genom yang lengkap, biaya tinggi, dan kompleksitas analisis komputasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Baum, D. A., & Smith, S. D. (2013). *Tree Thinking: An Introduction to Phylogenetic Biology*. Greenwood Village, CO: Roberts and Company Publishers.
- Bergey, D. H., & Holt, J. G. (2000). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Casadevall, A., & Pirofski, L. A. (2000). Host-pathogen interactions: Redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and Immunity*, 68(8), 4525–4530.
- Hall, B. G. (2011). *Phylogenetic Trees Made Easy: A How-To Manual for Molecular Biologists*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2017). *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson Education.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2020). *Medical Microbiology*. 9th ed. Elsevier
- Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York, NY: Oxford University Press.
- Pelczar, M. J., Chan, E. C. S., & Krieg, N. R. (2005). *Microbiology: Concepts and Applications*. McGraw Hill.
- Ryan, K. J., & Ray, C. G. (2014). *Sherris Medical Microbiology*. 6th ed. McGraw-Hill Education
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2020). *Microbiology: An Introduction*. Pearson.
- Whitman, W. B., Goodfellow, M., & Kämpfer, P. (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer.
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4576-4579.

BIODATA PENULIS



Fitrotin Azizah, lahir di Nganjuk, Jawa Timur, Indonesia pada tanggal 7 Juni 1982. Jenjang Pendidikan D3 ditempuh di Prodi D3 TLM Universitas Muhammadiyah Surabaya. Pendidikan D4 ditempuh di Prodi D4 TLM Poltekkes Kemenkes Surabaya. Kemudian Pendidikan S2 ditempuh di Universitas Airlangga, Jurusan Ilmu Forensik. Saat ini menjabat sebagai Kaprodi pada Prodi D3 Teknologi Laboratorium Medis Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya sejak tahun 2017. Penulis merupakan dosen dibidang Mikrobiologi, Hematologi dan Imunologi.

Contact person: 081330376332,
ichafitrotin@um-surabaya.ac.id.

BAB 3

Taksonomi dan Nomenklatur Bakteri

* Michael Vallery Loueis Tumbol, S.Farm ,
M.Kes, Apt *

A. Latar Belakang

Dalam bidang taksonomi terdapat tiga bidang yang terpisah tetapi saling memiliki keterkaitan satu sama lainnya yaitu klasifikasi, nomenklatur, dan identifikasi. Secara umum klasifikasi merupakan pengelompokan organisme ke dalam kelompok taksonomi tertentu sehingga dalam melakukan klasifikasi bakteri memerlukan teknik eksperimen dan observasi yang berdasarkan sifat biokimia, fisiologi, genetik, dan morfologi bahkan sering kali diperlukan untuk mendeskripsi takson. Nomenklatur merupakan penamaan organisme menurut aturan internasional atau aturan baku yang secara sepakat telah ditetapkan bersama oleh kelompok profesional medis yang menurut karakteristiknya, sedangkan identifikasi adalah penggunaan praktis dari skema klasifikasi yang digunakan untuk (1) mengisolasi dan memurnikan organisme target dari organisme lainnya, (2) memverifikasi kemurnian atau sifat khusus dan sifat tertentu suatu kultur dalam lingkungan klinis, dan (3) mengisolasi dan mengidentifikasi agen penyebab suatu penyakit. (Brooks, 2010)

Skema identifikasi tidak sama dengan skema klasifikasi, walaupun ada beberapa aspek yang mungkin memiliki kesamaan. Skema identifikasi untuk sekelompok organisme dapat dirancang jika kelompok tersebut telah diklasifikasikan. Misalnya, literatur telah melaporkan *Escherichia coli* sebagai penyebab sindrom uremik hemolitik (HUS) pada bayi. Ada ratusan strain berbeda yang diklasifikasikan sebagai E coli, tetapi hanya sedikit yang terkait

dengan HUS. Strain ini dapat dibedakan dari banyak strain *E.coli* lainnya melalui reaktivitas antibodi dengan antigen O dan H, (*E. coli* O157:H7). Taksonomi, dan nomenklatur, adalah ilmu yang terus berkembang dan demikian pula kosakata mikrobiologi medis. Setiap profesional yang terkait dengan penyakit menular harus menyadari taksonomi mikroorganisme menular yang terus berkembang membentuk dasar organisasi bakteri. (Brooks, 2010)

Salah satu sistem klasifikasi tertua, yang disebut klasifikasi alami, mengatur organisme ke dalam kelompok yang anggotanya berbagi banyak karakteristik dan mencerminkan sebanyak mungkin sifat biologis organisme. Ahli botani Swedia *Carl von Linné*, atau sering disebut *Carolus Linnaeus* mengembangkan klasifikasi alami pertama yang didasarkan pada karakteristik anatomi, pada pertengahan abad kedelapan belas. Taksonomi Linnaeus adalah sistem yang paling dikenal oleh para ahli biologi. Sistem ini menggunakan tingkatan taksonomi formal kerajaan, filum, kelas, ordo, famili, genus, dan spesies. Dari tingkatan ini, famili, genus, dan spesies adalah yang paling bergunadan sering digunakan. (Willey et al, 2008)

B. Taksonomi

Taksonomi adalah bidang ilmu biologi yang mencakup tiga disiplin ilmu yang berbeda tetapi saling terkait, yaitu klasifikasi, nomenklatur (penamaan), dan identifikasi organisme. Taksonomi dapat diterapkan pada semua makhluk hidup dan mampu menyediakan cara yang konsisten untuk mengklasifikasikan, memberi nama, dan mengidentifikasi organisme. Konsistensi ini memungkinkan para ahli biologi di seluruh dunia untuk menggunakan label umum pada setiap organisme yang dipelajari dalam berbagai disiplin ilmu biologi. Bahasa umum yang disediakan taksonomi meminimalkan kebingungan tentang nama, sehingga lebih banyak perhatian dapat difokuskan pada isu dan fenomena ilmiah penting lainnya. Taksonomi penting tidak hanya dalam filogeni (sejarah evolusi organisme), tetapi juga dalam hampir setiap disiplin ilmu biologi lainnya, termasuk mikrobiologi. (Tille, 2015)

Sebagai hasil dari kemajuan biologi molekuler, taksonomi klasik kini menjadi apa yang disebut taksonomi polifasik. Metode klasifikasi ini menggabungkan hubungan genotipe, fenotipik, dan filogenetik atau evolusioner tradisional ke dalam tujuan umum sistem klasifikasi. Pada tingkat molekuler, proses ini memiliki banyak segi, menggunakan rangkaian asam ribonukleat ribosom (rRNA), rangkaian seluruh genom, dan faktor epigenetik (variasi yang tidak disebabkan oleh persamaan atau perbedaan rangkaian asam nukleat). Pendekatan taksonomi polifasik memberikan analisis yang lebih rinci namun sangat kompleks terhadap sistem klasifikasi saat ini. Tidak semua parameter menggambarkan secara jelas setiap organisme hingga tingkat spesies. Dengan kata lain, beberapa karakteristik dapat memperkuat organisasi genus, dan beberapa lainnya mungkin berguna pada tingkat spesies. (Brooks, 2010)

Keragaman genetik yang cukup besar di antara bakteri atau disebut taksonomi genomic. Karakterisasi DNA genom bakteri menunjukkan rentang komposisi basa nukleotida yang luas di antara galur bakteri yang berbeda. Kandungan guanin + sitosin (G + C) dari bakteri yang berkerabat dekat serupa, yang menunjukkan bahwa keterkaitan genetik DNA dari organisme yang serupa dapat digunakan sebagai ukuran keterkaitan taksonomi. (Thompson, et al, 2021)

Identifikasi spesies dapat didasarkan pada teknik hibridisasi DNA-DNA dengan keterkaitan 50% hingga 70% atau analisis komparatif dari sekuens 16s rDNA (95% hingga 97%). Kedua teknik memiliki keterbatasan yang mencakup variasi nilai batas antara spesies atau genera yang berbeda. (Munson, 2020)

Sekuens tunggal seperti 16s rDNA, kemungkinan transfer gen yang dapat mempengaruhi klasifikasi genotipe. Akhirnya, transfer gen lateral di antara organisme, terutama bakteri, menciptakan kesulitan dalam klasifikasi organisme menurut sifat fenotipik atau sifat biokimia dan kriteria genotipe seperti kandungan DNA G+C, yang merupakan ciri khas mikrobiologi diagnostik. (Tille, 2015) (Willey et al, 2008)

Gen 16S rRNA juga berperan penting dalam menyoroti sejumlah besar keragaman mikroba yang terlewatkan oleh metode kultur. Sekuens 16S rRNA yang diperoleh langsung dari lingkungan melalui penggunaan primer 'universal' yang sangat terkonservasi kemudian digunakan untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA dari DNA lingkungan genomik yang diekstraksi. Amplikon campuran kemudian dikloning dan diurutkan untuk memberikan profil komunitas mikroba in situ. Seiring dengan peningkatan teknologi sekuensing, langkah kloning dapat dihilangkan, dan ribuan sampel dapat dengan mudah diprofilkan, yang menghasilkan banyak basis data untuk menganalisis dan mengklasifikasikan sekuens gen 16S rRNA. (Hugenholtz, 2021).

Tabel 3.1. Persentase G-C dalam mikroorganisme

Organism	Percent G + C	Organism	Percent G + C	Organism	Percent G + C
Bacteria		<i>Rhodospirillum</i>	62–66	<i>Peridinium triquetrum</i>	53
<i>Actinomyces</i>	59–73	<i>Rickettsia</i>	29–33	<i>Physarum polycephalum</i>	38–42
<i>Anabaena</i>	39–44	<i>Salmonella</i>	50–53	<i>Plasmodium berghei</i>	41
<i>Bacillus</i>	32–62	<i>Spirillum</i>	38	<i>Scenedesmus</i>	52–64
<i>Bacteroides</i>	28–61	<i>Spirochaeta</i>	51–65	<i>Spirogyra</i>	39
<i>Bdellovibrio</i>	49.5–51	<i>Staphylococcus</i>	30–38	<i>Stentor polymorphus</i>	45
<i>Caulobacter</i>	62–65	<i>Streptococcus</i>	33–44	<i>Tetrahymena</i>	19–33
<i>Chlamydia</i>	41–44	<i>Streptomyces</i>	69–73	<i>Trichomonas</i>	29–34
<i>Chlorobium</i>	49–58	<i>Sulfobolus</i>	31–37	<i>Trypanosoma</i>	45–59
<i>Chromatium</i>	48–70	<i>Thermoplasma</i>	46	<i>Volvox carteri</i>	50
<i>Clostridium</i>	21–54	<i>Thiobacillus</i>	52–68	Fungi	
<i>Cytophaga</i>	33–42	<i>Treponema</i>	25–53	<i>Agaricus bisporus</i>	44
<i>Deinococcus</i>	62–70	Protists		<i>Amanita muscaria</i>	57
<i>Escherichia</i>	48–59	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	56–58	<i>Aspergillus niger</i>	52
<i>Halobacterium</i>	66–68	<i>Acetabularia mediterranea</i>	37–53	<i>Blastocladiella emersonii</i>	66
<i>Hyphomicrobium</i>	59–67	<i>Amoeba proteus</i>	66	<i>Candida albicans</i>	33–35
<i>Methanobacterium</i>	32–50	<i>Chlamydomonas</i>	60–68	<i>Claviceps purpurea</i>	53
<i>Micrococcus</i>	64–75	<i>Chlorella</i>	43–79	<i>Coprinus lagopus</i>	52–53
<i>Mycobacterium</i>	62–70	<i>Cyclotella cryptica</i>	41	<i>Fomes fraxineus</i>	56
<i>Mycoplasma</i>	23–40	<i>Dictyostelium</i>	22–25	<i>Mucor rouxii</i>	38
<i>Myxococcus</i>	68–71	<i>Euglena gracilis</i>	46–55	<i>Neurospora crassa</i>	52–54
<i>Neisseria</i>	48–56	<i>Lycogala</i>	42	<i>Penicillium notatum</i>	52
<i>Nitrobacter</i>	59–62	<i>Nitella</i>	49	<i>Polyporus palustris</i>	56
<i>Oscillatoria</i>	40–50	<i>Nitzschia angularis</i>	47	<i>Rhizopus nigricans</i>	47
<i>Prochloron</i>	41	<i>Ochromonas danica</i>	48	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36–42
<i>Proteus</i>	38–41	<i>Paramecium</i> spp.	29–39	<i>Saprolegnia parasitica</i>	61
<i>Pseudomonas</i>	58–69				

Wiley, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2008). *Prescott, Harley, and Klein's microbiology*. McGraw-Hill.

Metode molekuler telah seperti *plasmid profile analysis*; *restriction endonuclease analysis*; *ribotyping*; *pulsed field gel electrophoresis*; *PCR amplification and restriction endonuclease digestion of specific genes*; *arbitrarily primed PCR*; dan *nucleic acid sequence*

analysis telah mampu untuk mengidentifikasi genom inti yang digunakan dalam klasifikasi dan identifikasi spesies. Tetapi penting untuk menyadari bahwa ekspresi fenotipik dan klasifikasi organisme akan terus berubah oleh variasi genom sebagai akibat dari transfer gen lateral di antara organisme. (Brooks, 2010)

Selain analisis genomik yang lebih maju, metode kemotaksonomi lebih sering diterapkan untuk identifikasi dan klasifikasi mikroorganisme. Metode ini meliputi studi protein, analisis asam lemak, dan komposisi dinding sel. Spektrometri massa dan *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) yang lebih baru menggunakan pemisahan dan analisis peptida dengan kelimpahan tinggi untuk klasifikasi dan identifikasi isolat bakteri. Teknik yang lebih maju seperti *Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry* menggunakan chip susunan protein permukaan yang menangkap protein secara langsung tanpa kehilangan sampel dan penurunan sensitivitas seperti yang terjadi pada MALDI-TOF MS. Suatu teknologi biosensor baru (Bruker Daltonics, Inc., Billerica, MA) menggunakan kumpulan multipleks primer reaksi berantai polimerase (PCR) yang menargetkan urutan sekuens dalam genom bakteri yang digabungkan dengan spektrometri massa ionisasi elektro spray presisi tinggi untuk mengidentifikasi dan mengelompokkan organisme. Pendekatan polifasik dimaksudkan untuk menggunakan data dari MALDI-TOF MS bersama dengan analisis genomik dan karakteristik fenotipik untuk mengidentifikasi dan mengklasifikasikan organisme. (Tille, 2015)

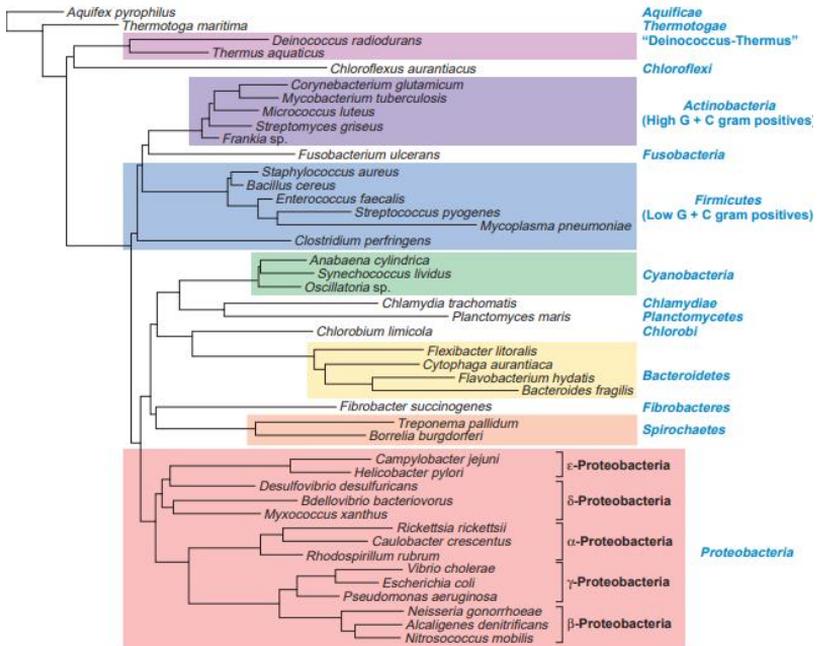
Seiring dengan kemajuan teknologi, klasifikasi dan identifikasi organisme tidak diragukan lagi akan terus berkembang seiring dengan perubahan populasi organisme. Dalam mikrobiologi diagnostik, klasifikasi, nomenklatur, dan identifikasi mikroorganisme memainkan peran penting dalam memberikan diagnosis penyakit menular yang akurat dan tepat waktu. Pembahasan singkat dan terperinci tentang komponen utama taksonomi penting untuk pemahaman dasar tentang identifikasi bakteri dan penerapannya pada diagnostik mikrobiologi. (Tille, 2015)

1. Klasifikasi

Upaya modern pertama untuk mengklasifikasikan bakteri secara sistematis berdasarkan sifat fenotipiknya dimulai dengan edisi pertama *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* pada tahun 1923, yang mengkategorikan bakteri ke dalam klasifikasi hierarki bertingkat untuk menunjukkan tingkat kekerabatan yang berbeda. (Parte et al, 2012). Awalnya, klasifikasi ini terdiri dari peringkat tertinggi hingga terendah; kelas, ordo, famili, suku, genera, dan spesies berdasarkan kunci identifikasi. Kunci tersebut sangat bergantung pada morfologi, kondisi kultur, dan karakter patogenik dengan tujuan utama identifikasi praktis isolat pada tingkat spesies daripada membangun kerangka evolusi. (Tille, 2015)

Kemajuan besar dalam taksonomi prokariotik sejak volume pertama Manual Bakteriologi Sistematis Bergey diterbitkan. Secara khusus, pengurutan rRNA, DNA, dan protein telah membuat analisis filogenetik prokariot. Klasifikasi mikroba dalam edisi pertama adalah fenetik, edisi kedua dari Bergey's Manual sebagian besar bersifat filogenetik. Meskipun sifat pewarnaan gram umumnya dianggap sebagai karakteristik fenetik, juga berperan dalam filogeneti klasifikasi mikroba. Sehingga perbedaan utama antara bakteri gram negatif, gram positif, dan mikoplasma dapat dijabarkan. Fitur umum edisi ke-2 dari Manual Bergey memiliki lebih banyak informasi ekologis tentang taksa individu. Hal ini tidak mengelompokkan semua procaryotes yang penting secara klinis bersama-sama seperti yang dilakukan edisi pertama. (Willey et al, 2008). Sebaliknya, spesies patogen ditempatkan secara filogenetik yang terdiri dari lima volume yaitu : volume 1 adalah *Archaea* dan *Phototrophic Bacteria*; volume 2 adalah *Proteobacteria*; volume 3 adalah Persentase rendah G-C dari bakteri Gram-Positive; volume 4 adalah Konsentrasi tinggi G-C bakteri Gram-Positive ; volume 5 adalah *Planctomycetes*, *Spirochaetes*, *Fibrobacteres*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Chlamydiae*, *Acidobacteria*, *Verrumicrobia*, and *Dictyoglomus*. (Parte et al, 2012)

Publikasi pada tahun 1859 Darwin's *On the Origin of Spesies*, ahli biologi mulai mengembangkan sistem klasifikasi filogenetik atau filetik (lihat **Gambar 3.1**) yang berusaha membandingkan organisme pada hubungan dasar evolusioner. Para ilmuwan menyadari bahwa ketika mereka mengamati perbedaan dan persamaan antara organisme sebagai hasil dari proses evolusi, mereka juga mendapatkan wawasan tentang sejarah kehidupan di Bumi. Namun, untuk sebagian besar ahli mikrobiologi pada abad kedua puluh, tidak dapat secara efektif menggunakan sistem klasifikasi filogenetik, disebabkan kurangnya catatan fosil yang organisme. (Willey et. al, 2008) (Owen, 2004)

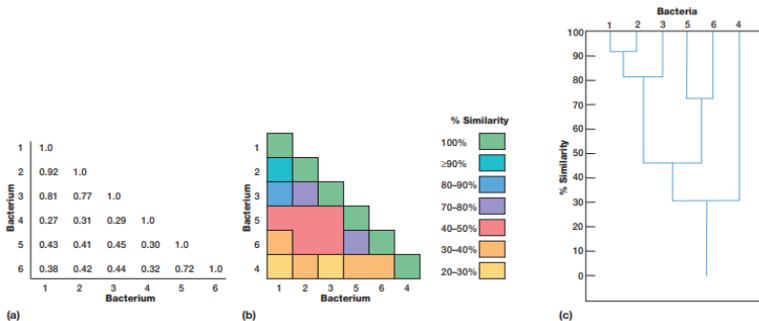


Gambar 3.1 Filogeni Bakteri. Pohon filogeni bakteri didasarkan pada perbandingan 16S rRNA ((Willey et. al, 2008)

Filogenetika, proses merekonstruksi kemungkinan hubungan evolusioner, menggunakan urutan nukleotida dari gen yang bertindak sebagai kronometer molekuler. Kombinasi

fenetik dan filogenetik disebut sebagai taksonomi polifasik, dan merupakan strategi yang direkomendasikan dalam deskripsi spesies dan genera baru. Analisis numerik gen RNA ribosom subunit kecil (rDNA) yang mengarah pada konstruksi pohon bercabang (**Gambar 3.1**). (Owen, 2004)

Taksonomi numerik, yang diusulkan oleh Sokal dan Sneath pada tahun 1962, memberikan dasar matematika untuk perbandingan kuantitatif sifat fenotipik antara bakteri. Pada prinsipnya, taksonomi numerik dapat menggabungkan informasi filogenetik, tetapi dalam praktiknya, informasi tersebut digunakan terutama untuk identifikasi dan tidak memiliki kerangka evolusi yang ketat. (Tille, 2015). Hasil analisis taksonomi numerik sering diringkas dengan diagram seperti pohon yang disebut dendrogram (**Gambar 3.2**), pengelompokan berdasarkan metode numerik taksonomi ke dalam taksa dari karakter organisme yang menyatakan informasi tentang sifat-sifat organisme dan diubah menjadi bentuk numerik. Klasifikasi yang dihasilkan didasarkan pada kesamaan umum yang dinilai dengan perbandingan banyak karakteristik, masing-masing diberi bobot yang sama. (Willey et. al, 2008).



Gambar 3.2. Pengelompokan dan Dendrogram dalam Taksonomi Numerik. (a) Matriks yang membandingkan enam strain bakteri. Tingkat kesamaan berkisar dari tidak ada (0,0) hingga kesamaan lengkap (1,0). (b) Bakteri telah disusun ulang dan bergabung untuk membentuk kelompok strain serupa. (c) Sebuah Dendrogram menunjukkan hasil analisis pada bagian (b). Strain 1 dan 2 adalah anggota 90-fenon, dan strain 1-3 membentuk 80-fenon. Sementara strain 1-3 mungkin merupakan anggota

dari satu spesies, sangat tidak memungkinkan strain 4-6 termasuk dalam spesies yang sama dengan 1-3 (Gambar dikutip dari Willey et. al, 2008).

Pengakuan sepenuhnya atas resolusi evolusi terbatas yang diberikan oleh karakteristik fenotipik dibuat oleh Stanier dan van Niel pada tahun 1940-an hingga 1960-an, di mana mereka menyimpulkan bahwa adalah tidak efisien bagi para ahli taksonomi untuk mencoba sistem klasifikasi alami (yaitu, yang berdasarkan evolusi) untuk bakteri. Namun, selama periode inilah jalan ke depan untuk memecahkan kebuntuan fenotipe diprediksi oleh Zuckerkandl dan Pauling melalui penggunaan informasi. (Hugenholtz, 2021).

Klasifikasi adalah suatu metode untuk mengelompokkan mikroorganisme ke dalam kelompok atau taksa berdasarkan kesamaan morfologi, fisiologi, dan sifat genetik. Sistem klasifikasi hierarkis terdiri dari sebutan taksa berikut: (Tille, 2015)

- Domain (Bakteri, Archaea, dan Eukarya)
- Kingdom (mengandung divisi atau filum yang serupa; taksa yang paling inklusif)
- Filum (mengandung kelas-kelas yang serupa; setara dengan taksa Divisi dalam botani)
- Kelas/ordo (mengandung ordo yang serupa)
- Ordo (mengandung famili yang serupa)
- Famili (mengandung genus yang sama)
- Genus (mengandung spesies serupa)
- Spesies (julukan khusus; kata sifat atau kata benda Latin huruf kecil; taksa paling eksklusif)

Secara historis, bakteri atau prokariota (prenukleus) termasuk dalam satu domain. Namun, dengan analisis yang lebih rinci menggunakan teknik modern, domain ini kini telah dipisahkan menjadi Bakteri dan Archaea (bakteri purba). Bakteri mengandung prokariota lingkungan (biru-hijau atau cyanobacteria) dan bakteri heterotrofik yang relevan secara medis. (Tille, 2015)

Famili mencakup sekelompok organisme yang berisi beberapa genus dan terdiri dari organisme dengan atribut yang sama. Nama famili dibentuk dengan menambahkan akhiran -aceae ke nama salah satu kelompok genus, yang disebut tipe genus misalnya, tipe genus famili *Streptococcaceae* adalah *Streptococcus*. Satu pengecualian terhadap aturan dalam mikrobiologi adalah famili Enterobacteriaceae, yang dinamai menurut kelompok bakteri "enterik" dan bukan spesies tipe *Escherichia coli*. Spesies atau galur tipe bakteri (prokariotik) ditentukan menurut pedoman yang diterbitkan oleh *International Committee for the Systematics of Prokaryotes*. Definisi spesies dibedakan menggunakan profil DNA, termasuk urutan 16S rRNA yang hampir lengkap dengan ambiguitas kurang dari 0% hingga 5% dalam kombinasi dengan sifat fenotipik. Tipe spesies juga harus dijelaskan secara rinci menggunakan metode diagnostik dan metode yang sebanding yang dapat direproduksi. (Tille, 2015)

Genus (genera), berisi spesies berbeda yang memiliki beberapa fitur penting yang sama. Setiap spesies dalam genus sangat berbeda untuk mempertahankan statusnya sebagai spesies individu. Penempatan spesies dalam genus tertentu didasarkan pada berbagai karakteristik genetik dan fenotipik yang dimiliki oleh spesies tersebut. Mikroorganisme tidak memiliki banyak fitur fisik yang ditunjukkan oleh organisme tingkat tinggi seperti tumbuhan dan hewan. Misalnya, mikroorganisme jarang meninggalkan catatan fosil, dan mereka menunjukkan kapasitas yang luar biasa untuk mencampur materi genetik di antara spesies dan genera yang tampaknya tidak terkait. Karena alasan ini, sulit untuk menetapkan dengan yakin keterkaitan mikroorganisme dalam taksa yang lebih tinggi di luar tingkat genus. Meskipun pengelompokan genera yang sama ke dalam famili umum dan famili yang sama ke dalam ordo umum digunakan untuk klasifikasi tumbuhan dan hewan, sebutan taksa yang lebih tinggi ini (yaitu, divisi, kelas, dan ordo) tidak dapat digunakan untuk mengklasifikasikan bakteri. (Tille, 2015)

Spesies (disingkat sp., tunggal, atau spp., jamak) adalah kelompok taksonomi paling dasar dan dapat didefinisikan sebagai kumpulan galur bakteri yang memiliki ciri fisiologis dan genetik yang sama dan sangat berbeda dari spesies mikroba lainnya. Kadang-kadang, subkelompok taksonomi dalam suatu spesies, disebut subspecies, yang dikenali. Lebih jauh, sebutan seperti biotipe, serotipe, atau genotipe dapat diberikan kepada kelompok di bawah tingkat subspecies yang memiliki ciri-ciri khusus tetapi relatif kecil. Misalnya, *Klebsiella pneumoniae* dan *Klebsiella oxytoca* adalah dua spesies berbeda dalam genus *Klebsiella*. *Serratia odorifera* biotipe 2 dan *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* adalah contoh sebutan biotipe dan subspecies. Suatu biotipe dianggap sebagai spesies yang sama dengan susunan genetik yang sama tetapi menunjukkan ciri fisiologis yang berbeda. Subspecies tidak menunjukkan perbedaan yang cukup signifikan untuk diklasifikasikan sebagai biotipe atau spesies baru. Meskipun subkelompok ini mungkin memiliki beberapa kepentingan taksonomi, kegunaannya dalam mikrobiologi diagnostic sangatlah terbatas. (Tille, 2015)

2. Tata nama (Nomenklatur)

Tata nama adalah penamaan mikroorganisme menurut aturan dan pedoman yang ditetapkan dalam *International Code of Nomenclature of Bacteria* (ICNB) atau *Bacteriological Code* (BC). Kode ini memberikan label pada organisme yang dikenali secara universal. Genus dan spesies adalah kelompok yang umum digunakan oleh ahli mikrobiologim, dalam sistem tata nama binomial (dua nama) ini, setiap organisme diberi genus dan spesies yang berasal dari bahasa Latin atau Yunani. Setiap organisme memiliki "label" ilmiah yang terdiri dari dua bagian: yaitu genus, di mana huruf pertama selalu ditulis dengan huruf kapital, dan spesies, di mana huruf pertama selalu ditulis dengan huruf kecil. Kedua komponen tersebut digunakan secara bersamaan dan dicetak dalam huruf miring atau digarisbawahi dalam tulisan. Misalnya, streptococcus termasuk *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, dan

Streptococcus bovis. Nama tersebut dapat disingkat dengan menggunakan bentuk huruf kapital dari huruf pertama penunjukan genus diikuti oleh titik (.) dan nama spesies lengkap, yang tidak disingkat (misalnya, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, dan *S. bovis*). Seringkali penunjukan informal (misalnya, *staphylococci*, *streptococci*, *enterococci*) dapat digunakan untuk memberi label pada kelompok organisme tertentu. Penunjukan ini tidak menggunakan huruf kapital atau huruf miring. (Tille, 2015)

Nama spesies disebut nama binominam, atau binomen, karena memiliki dua bagian. Ketika nama subspecies digunakan, trinomial maka nama dengan penambahan julukan subspecies ditambahkan. Contohnya adalah subspecies *Lactobacillus casei* yang disebut *Lactobacillus casei subsp. biovar rhamnosus*. Nama genus, seperti yang disebutkan di atas, adalah kata Latin, dan disebut subgenus (sekarang jarang digunakan) ditulis secara konvensional dalam tanda kurung setelah nama genus misalnya, *Bacillus (Aerobacillus)* yang menunjukkan subgenus *Aerobacillus* dari genus *Bacillus* Seperti dalam ketentuan subspecies. *Bacillus (Bacillus)* pada tingkat genus sebagian besar nama yang adalah kata sifat jamak, contoh, *Brucellaceae* berarti *Procarvotae Brucellaceae*. (Sneath, 2005)

Di laboratorium diagnostik, perubahan nomenklatur dilakukan secara bertahap sehingga dokter dan petugas laboratorium memiliki banyak kesempatan untuk mengenali bahwa patogen yang dikenal telah diberi nama baru. Hal ini biasanya dilakukan dengan menggunakan penunjukan genus baru sambil tetap memberikan penunjukan sebelumnya dalam tanda kurung; misalnya, *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* atau *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. (Tille, 2015)

3. Identifikasi

Identifikasi mikroba adalah proses dimana mikroorganisme dengan ciri-ciri utama organisme digambarkan. Setelah ciri-ciri tersebut ditetapkan, profilnya

dibandingkan dengan ciri-ciri mikroorganisme lain yang telah dikarakterisasi sebelumnya. Organisme tersebut kemudian dapat dimasukkan ke dalam taksa yang paling tepat (klasifikasi) dan dapat diberi nama genus dan spesies yang tepat (nomenklatur); keduanya merupakan aspek penting dari peran taksonomi dalam mikrobiologi diagnostik dan pengelolaan penyakit menular. (Tille, 2015)

Taksonomi mikroba modern menggunakan kombinasi fitur fenotipik dan genotipik utama yang menjadi dasar identifikasi mikroorganisme (Lihat Tabel 3.1). Hal ini tidak boleh diartikan bahwa identifikasi semua organisme yang relevan secara klinis mudah dan langsung. Ini juga tidak dimaksudkan untuk menyiratkan bahwa ahli mikrobiologi hanya dapat mengidentifikasi atau mengenali organisme yang telah dikarakterisasi dan diberi nama oleh ahli taksonomi. Sesungguhnya, laboratorium mikrobiologi klinik diakui sebagai tempat pertama kali ditemukannya agen-agen infeksius yang sebelumnya tidak dikenal atau belum dikarakterisasi, dan dengan demikian laboratorium ini mempunyai tanggung jawab yang semakin besar untuk menjadi sumber informasi dan pelaporan mengenai etiologi penyakit infeksius yang baru muncul.(Tille, 2015)

Tabel 3.2. Kriteria Identifikasi dan Karakteristik Identifikasi Mikroba. (Tille, 2015)(Schleifer, K. H. (2009)

Kriteria	Karakteristik
Fenotipik	
Morfologi makroskopis	Pola pertumbuhan mikroba pada media buatan yang diamati dan terlihat dengan mata telanjang. Contohnya ukuran, tekstur, dan pigmentasi koloni bakteri.
Karakteristik pewarnaan	Kemampuan suatu organisme untuk terwarnai dengan suatu warna tertentu menggunakan pewarna dan reagen tertentu. Pewarnaan digunakan bersamaan dengan karakteristik mikroskopis

	<p>morfologi untuk identifikasi bakteri. Misalnya, pewarnaan Gram untuk diferensiasi bakteri yang penting dalam dunia medis.</p>
Persyaratan lingkungan	<p>Kemampuan suatu organisme untuk tumbuh pada berbagai suhu, dengan adanya oksigen dan gas lainnya, pada berbagai tingkat pH, atau dengan adanya ion dan garam lainnya, seperti NaCl.</p>
Persyaratan nutrisi	<p>Kemampuan suatu organisme untuk memanfaatkan berbagai sumber karbon dan nitrogen sebagai substrat nutrisi ketika tumbuh dalam kondisi lingkungan tertentu.</p>
Profil resistensi	<p>Karakteristik resistensi bawaan terhadap antibiotik, logam berat, atau toksin tertentu.</p>
Sifat antigenik	<p>Profil mikroorganisme yang ditetapkan melalui berbagai metode serologis dan imunologis untuk menentukan keterkaitan di antara berbagai kelompok mikroba.</p>
Sifat subseluler	<p>Komponen molekuler sel yang merupakan ciri khas takson atau kelompok organisme tertentu, sebagaimana ditetapkan melalui berbagai metode analisis. Beberapa contohnya meliputi komponen dinding sel, komponen membran sel, dan kandungan enzimatis sel mikroba.</p>
Sifat kemotaksonomi	<p>Konstituen kimia sel, seperti struktur asam teikoat, analisis asam lemak, dan profil protein, sebagaimana ditentukan oleh metode analisis.</p>
Genotip	
Perbandingan komposisi DNA	<p>DNA terdiri dari empat basa (guanina, sitosin, adenina, dan timina). Sejauh mana DNA dari dua organisme terdiri dari</p>

	<p>sitosin dan guanin (yaitu, kandungan G + C) relatif terhadap kandungan basa totalnya dapat digunakan sebagai indikator keterkaitan atau tidak terkait. Misalnya, organisme dengan kandungan G + C sebesar 50% tidak berkerabat dekat dengan organisme dengan kandungan G + C sebesar 25%.</p>
<p>Karakteristik urutan DNA RNA, termasuk hibridisasi</p>	<p>Urutan basa di sepanjang untai DNA atau RNA dikenal sebagai urutan basa. Sejauh mana urutan tersebut homolog (mirip) antara dua mikroorganisme dapat ditentukan secara langsung atau tidak langsung dengan berbagai metode molekuler. Tingkat kesamaan dalam urutan tersebut dapat menjadi ukuran tingkat keterkaitan organisme, khususnya, urutan RNA ribosom (rRNA) yang tetap stabil dibandingkan dengan genom secara keseluruhan.</p>

Berbeda dengan virus dan sebagian besar parasit, banyak patogen bakteri dapat diisolasi pada media padat yang mengandung agar. Kultur pada sebagian besar bakteri memerlukan media yang kaya akan nutrisi metabolik. Media ini umumnya mencakup agar, sumber karbon, dan hidrolisat asam atau sumber bahan biologis yang terdegradasi secara enzimatik (misalnya, kasein). Karena komposisi yang terakhir tidak ditentukan, jenis media ini disebut sebagai media kompleks. Sampel klinis dari tempat yang biasanya tidak steril (misalnya, tenggorokan atau usus besar) mengandung berbagai spesies organisme, termasuk mikroba patogen potensial dan flora normal. Media dapat bersifat nonselektif atau selektif; dan media differensial dapat digunakan untuk membedakan berbagai bakteri dalam sampel klinis yang mengandung banyak organisme berbeda. (Tille, 2015)

Secara historis, pewarnaan Gram, bersama dengan visualisasi melalui mikroskop cahaya, telah menjadi salah satu metode yang paling informatif untuk mengklasifikasikan eubacteria. Teknik pewarnaan ini secara luas membagi bakteri berdasarkan perbedaan mendasar dalam struktur dinding selnya, metode ini biasanya merupakan langkah pertama dalam mengidentifikasi mikroba dalam specimen klinis yang bersifat Gram negatif atau Gram positif yang tumbuh dalam media kultur atau bahkan langsung dari spesimen pasien, misalnya urine. (Tille, 2015)

Uji karakteristik biokimia seperti uji oksidase, yang menggunakan akseptor elektron buatan, dapat digunakan untuk membedakan organisme berdasarkan ada atau tidaknya enzim pernapasan, sitokrom C. Demikian pula, aktivitas katalase dapat digunakan, untuk membedakan antara kokus gram positif; spesies stafilokokus bersifat katalase positif dengan spesies streptokokus yang bersifat katalase negatif. Jika organisme tersebut bersifat katalase positif (*Staphylococcus spp.*), maka spesies tersebut dapat dibagi lagi dengan uji koagulase menjadi *Staphylococcus aureus* (koagulase positif) atau *Staphylococcus epidermitidis* (koagulase negatif). Terdapat banyak jenis uji biokimia yang dapat memastikan keberadaan fungsi metabolisme yang khas dan dapat digunakan untuk mengelompokkan bakteri ke dalam takson tertentu. (Tille, 2015)

Penggunaan antibodi (poliklonal atau monoklonal) yang bereaksi dengan struktur permukaan sel bakteri tertentu seperti lipopolisakarida (LPS), flagela, atau antigen kapsul. Hal ini dikenal dengan istilah "serotipe", "serogroup", dan "serovar", dengan menggunakan spesifisitas antibodi tertentu, maka cara ini dapat digunakan untuk membagi galur spesies bakteri tertentu. (Tille, 2015)

Perkembangan dalam biologi molekuler kini memungkinkan untuk menyelidiki keterkaitan gen atau genom dengan membandingkan urutan di antara bakteri yang berbeda. Ketidakstabilan genetik dapat menyebabkan beberapa sifat menjadi sangat bervariasi dalam kelompok biologis atau bahkan

dalam kelompok taksonomi tertentu. Misalnya, gen resistensi antibiotik atau gen yang mengkode enzim (misalnya, pemanfaatan laktosa) dapat dibawa pada plasmid atau bakteriofaga, elemen genetik ekstrakromosom yang dapat ditransfer di antara bakteri. (Tille, 2015)

Peranan Taksonomi dalam Mikrobiologi Kedokteran yaitu : (Tille, 2015)

- a. Menetapkan dan memelihara catatan karakteristik utama mikroorganisme yang relevan secara klinis
- b. Memfasilitasi komunikasi antara teknisi laboratorium, ahli mikrobiologi, dokter, dan ilmuwan dengan memberikan nama universal untuk mikroorganisme yang relevan secara klinis. Hal ini penting untuk:
 - Menetapkan hubungan penyakit atau sindrom tertentu dengan mikroorganisme tertentu
 - Epidemiologi dan pelacakan wabah
 - Mengumpulkan pengetahuan mengenai manajemen dan hasil penyakit yang berhubungan dengan mikroorganisme tertentu
 - Menetapkan pola resistensi terhadap agen antimikroba dan mengenali perubahan pola resistensi mikroba
 - Memahami mekanisme resistensi antimikroba dan mendeteksi mekanisme resistensi baru dari mikroorganisme
 - Mengenali mikroorganisme patogen baru dan yang baru muncul
 - Mengenali perubahan jenis infeksi atau penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme karakteristik
 - Merevisi dan memperbarui teknologi yang tersedia untuk pengembangan metode baru untuk mengoptimalkan deteksi dan identifikasi resistensi senyawa antiinfeksi
 - Mengembangkan antiinfeksi baru untuk terapi.

DAFTAR PUSTAKA

- Tille, P. (2015). *Bailey & Scott's diagnostic microbiology-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Brooks G.F, Carroll C.K, Butel J. et.al (2010). Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 26th Edition E-Book. Mac Graw Hill Lange.
- Hugenholtz, P., Chuvochina, M., Oren, A., Parks, D. H., & Soo, R. M. (2021). Prokaryotic taxonomy and nomenclature in the age of big sequence data. *the ISME Journal*, 15(7), 1879-1892.
- Schleifer, K. H. (2009). Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. *Systematic and applied microbiology*, 32(8), 533-542.
- Thompson, C. C., Vidal, L., Salazar, V., Swings, J., & Thompson, F. L. (2021). Microbial genomic taxonomy. *Trends in the systematics of bacteria and fungi*, 168-178.
- Munson, E. (2020). Moving targets of bacterial taxonomy revision: what are they and why should we care?. *Clinical Microbiology Newsletter*, 42(14), 111-120.
- Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2008). *Prescott, Harley, and Klein's microbiology*. McGraw-Hill.
- Parte, A., Whitman, W. B., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., ... & Suzuki, K. I. (Eds.). (2012). *Bergey's manual of systematic bacteriology: volume 5: the Actinobacteria*. Springer Science & Business Media.
- Owen, R. J. (2004). *Bacterial taxonomics: finding the wood through the phylogenetic trees* (pp. 353-383). Humana Press.
- Sneath, P. H. (2005). Bacterial nomenclature. In *Bergey's manual® of systematic bacteriology* (pp. 83-88). Springer, Boston, MA.

BIODATA PENULIS



Michael Valleri Loueis Tumbol, S.Farm, M.Kes, Apt, kelahiran Gorontalo, 30 Mei 1980, adalah seorang Praktisi dan Akademisi yang memiliki riwayat pendidikan lulusan Sekolah Menengah Farmasi DepKes Manado (1995-1998), Sarjana Farmasi di Institut Sains dan Teknologi Nasional Jakarta (1998-2004), Progm Pendidikan Apoteker (2004-2005) dan Magister Ilmu Kedokteran Dasar Bidang Mikrobiologi dan Parasitologi Universitas Padjadjaran Bandung (2014-2016). Riwayat pekerjaan Dosen dan Peneliti di Poltekkes Kemenkes Manado (2008-sekarang)

BAB 4

MORFOLOGI BAKTERI

Endah Prayekti, S.Si., M.Si

A. Pendahuluan

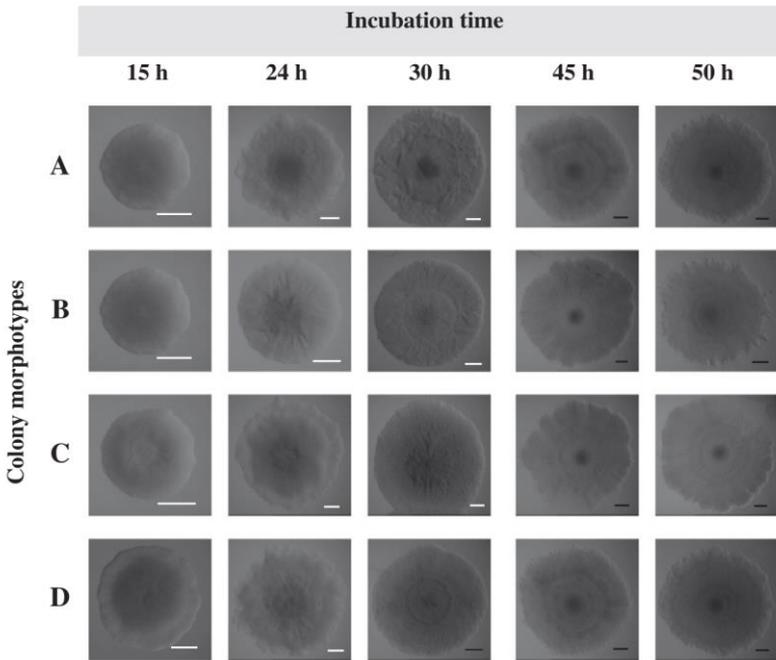
Morfologi bakteri memiliki keunikan tersendiri yang dapat menjadi penciri dari spesies bakteri. Perkembangan bakteri dari satu sel menjadi kumpulan sel yang kemudian menjadi bercak yang dapat dilihat oleh mata telanjang. Bercak tersebut kemudian disebut dengan koloni yang memiliki karakteristik tertentu dalam bentuknya. Satu koloni yang terlihat dapat diasumsikan berasal dari 1 sel bakteri sehingga jumlah koloni dapat mencerminkan jumlah sel bakteri pada sampel yang diperiksa.

Pengamatan morfologi bakteri dapat dilakukan secara mikroskopis dan makroskopis. Pengamatan mikroskopis menggunakan alat mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x. Sementara pengamatan morfologi bakteri menggunakan bantuan media pertumbuhan bakteri.

Morfologi koloni yang dihasilkan bakteri merupakan bentuk adaptasi bakteri pada lingkungan dan akan senantiasa berkembang seiring dengan waktu inkubasi pertumbuhan bakteri pada media tersebut. Selain itu bentuk asal sel bakteri (planktonic atau biofilm), jenis media, kepadatan sel bakteri, dan waktu inkubasi juga mempengaruhi morfologi bakteri (Sousa, Machado, Nicolau, & Pereira, 2013).

Pseudomonas aeruginosa yang diisolasi dari berbagai sampel klinis menunjukkan morfologi bakteri yang berbeda pada waktu inkubasi yang diujikan dalam penelitian (Sousa et al., 2013). Morfologi koloni tersebut berbeda pada waktu

inkubasi 15 jam, 24 jam hingga 30 jam. Adapun visualisasi koloni *P.aeruginosa* tersebut terilustrasi pada **Gambar 4.1** berikut ini.

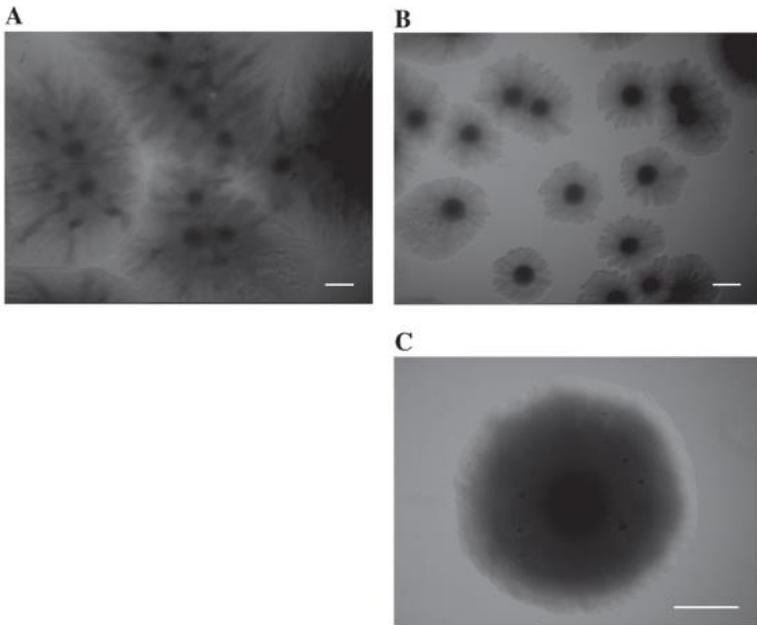


Gambar 4.1. Morfologi koloni *P. aeruginosa* pada waktu inkubasi yang berbeda (Sousa et al., 2013)

Pembentukan koloni bakteri pada sel campuran didukung oleh komunikasi antar sel sehingga memungkinkan untuk bergabung bersama. Sedangkan perkembangan pesat dari satu sel menjadi satu koloni disebabkan adanya produksi ekstraseluler matriks sebagai respon sel untuk membentuk koloni (Cobo et al., 2018)

Kepadatan sel bakteri pada media juga berpengaruh terhadap pembentukan koloni bakteri. Kepadatan sel bakteri lebih dari 20 sel per cawan agar akan berakibat dekatnya koloni satu sama lain yang akan mengarah pada menyatunya koloni bakteri sehingga sulit untuk diamati koloni tunggalnya(Cobo et al., 2018).

Adapun contoh visualisasinya adalah sebagai berikut :



Gambar 4.2. Pembentukan koloni bakteri dari kepadatan jumlah sel yang berbeda. A. kepadatan sel lebih dari 100 sel; B. Kepadatan sel sejumlah 30 sel; C. Kepadatan 20 sel atau kurang (Sousa et al., 2013).

Berdasarkan pengaruh yang telah disebutkan sebelumnya, dapat ditebak apabila morfologi bakteri akan sangat beragam. Adanya bentuk morfologi bakteri yang spesifik merupakan konsekuensi dari adaptasi bakteri untuk menjaga kehidupannya. Bentuk akan mempengaruhi fungsi kritis biologis dari sel, termasuk mendapatkan nutrisi, motilitas, penyebaran, ketahanan terhadap stress lingkungan dan interaksi dengan organisme lainnya (Teeseling, Pedro, & Cava, 2017).

B. Morfologi Sel Bakteri

Bakteri secara mikroskopis memiliki bentuk yang bermacam macam. Bentukan bakteri secara mikroskopis dapat menunjukkan kemurnian dari kultur bakteri yang diamati.

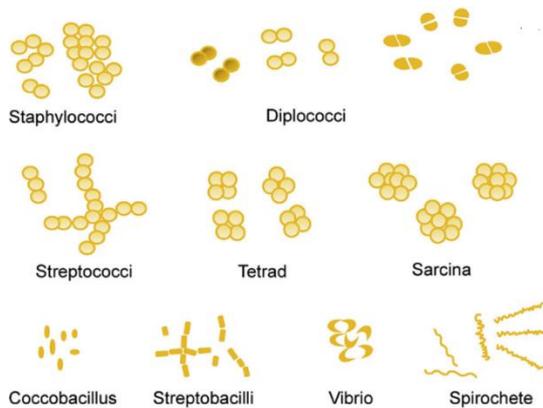
Selain itu, apabila dilakukan pengecatan sebelum pengamatan mikroskopis bakteri, juga memberikan gambaran kelompok bakteri.

Secara umum, bentuk bakteri secara mikroskopis dikategorikan sebagai berikut ini :

- a. Bulat atau coccus
- b. Batang atau basil
- c. Kokoid atau cocobacilus
- d. Koma
- e. Spiral

Sedangkan sel bakteri dapat tersusun Tunggal atau soliter dan tersusun bergerombol, adapun kategorinya adalah sebagai berikut ini :

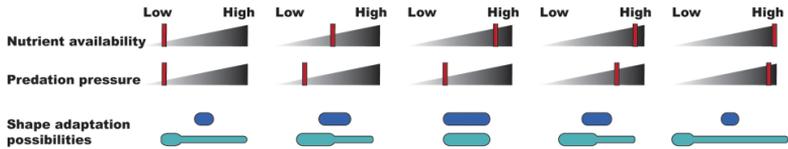
- a. Bergerombol seperti anggur
- b. Tersusun dua sel atau duplo
- c. Membentuk rantai
- d. Membentuk kubus atau tetrad
- e. Bergerombol membentuk bola



Gambar 4.3. Morfologi sel bakteri secara mikroskopis (Zhou & Li, 2015)

Penyesuaian bentuk sel bakteri juga dipengaruhi oleh kelimpahan nutrient dan organisme predator. Apabila nutrient dilingkungan sedikit namun tidak ada predator juga rendah,

maka bentuk yang ditunjukkan akan tetap seperti bentuk aslinya atau hanya ada sedikit penyesuaian dari segi ukuran, namun apabila nutrient berlimpah dan predator rendah maka sel bakteri akan membesar dari segi ukuran. Perubahan bentuk bakteri terilustrasi pada Gambar 4.4 berikut ini.



Gambar 4.4. Contoh adaptasi sederhana yang terpicu tekanan nutrient dan predasi di lingkungan. Dua baris paling atas merupakan 2 faktor yang memberikan tekanan kepada sel bakteri. Kondisi lingkungan yang berubah seperti yang diilustrasikan, bakteri akan memberikan respon dengan adaptasi morfologi (pada baris ketiga, warna biru tua dan muda) (Young, 2008).

C. Morfologi Koloni Bakteri

Ketika bakteri dikultur pada berbagai jenis media, akan terlihat perkembangan pertumbuhan yang berbeda dalam penampakan makroskopis (koloni) pada pertumbuhannya. Perbedaan yang terlihat tersebut disebut karakteristik kultural, dan lazimnya digunakan sebagai dasar untuk kategorisasi ataupun pengelompokan bakteri yang satu dengan yang lainnya. Karakteristik kultural untuk semua bakteri terdapat dalam *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.

Bakteri tersebut dapat diamati pertumbuhannya dengan menginokulasikan pada media agar cawan maupun tabung miring. Media yang bisa digunakan diantaranya *Nutrien Agar* (NA) miring di tabung reaksi dan *Nutrien Agar* (NA) datar di cawan petri, *Nutrien Broth* (NB), dan nutrien gelatin.

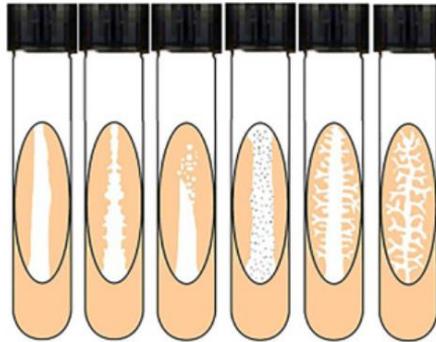
Pada media *Nutrien Agar* (NA) miring/*slant* pertumbuhan dapat diamati setelah penggoresan pada satu garis lurus inokulasi dibagian tengah pada permukaan agar. Inkubasi pada

suhu optimal selama 24 jam, hasil pertumbuhannya dapat dievaluasi dengan cara di bawah ini :

1. Kelimpahan pertumbuhan, yaitu banyaknya pertumbuhan bakteri pada wilayah yang digoreskan di media : dinyatakan sebagai *none* (tidak tumbuh), *slight* (lemah), *moderate* (sedang), dan *large* (lebar).
2. Letak pertumbuhan, yaitu kecenderungan bakteri tumbuh di media padat : dinyatakan pertumbuhan koloni di permukaan agar dan pertumbuhan koloni di bawah permukaan (di dalam) agar.
3. Pigmentasi, yaitu kemampuan koloni bakteri dalam menghasilkan pigmen intraseluler yang terlihat pada permukaan koloni ataupun pigmen ekstraseluler (bersifat larut) yang diekskresikan ke dalam medium dan juga menghasilkan warna.
4. Konsistensi, adalah karakteristik koloni bakteri yang dapat meneruskan cahaya pada intensitas tertentu. Dapat dibedakan berdasarkan banyak sedikitnya cahaya yang dilewatkan pada koloni yang tumbuh. Karakter yang dimaksud diantaranya : *opaque* (buram / tidak tembus cahaya), *translucent* (tembus cahaya sebagian / parsial), dan *transparent* (transparan / tembus cahaya penuh).
5. Bentuk, adalah karakter makroskopis bakteri yang terlihat pada media. Pengelompokan karakter bakterinya adalah sebagai berikut :
 - a. Bentuk *Filiform* : yaitu bentuk pertumbuhan sinambung / kontinyu, pertumbuhan seperti benang dengan tepian yang rata.
 - b. Bentuk *Echinulate* : yaitu bentuk pertumbuhan sinambung, pertumbuhan seperti benang dengan tepian tidak rata (*irregular*).
 - c. Bentuk *Beaded* : yaitu bentuk pertumbuhan tidak sinambung hingga semi sinambung.
 - d. Bentuk *Effuse* : yaitu bentuk pertumbuhan tipis, pertumbuhan menyebar.

- e. Bentuk *Arborescent* : yaitu bentuk pertumbuhan seperti pohon
- f. Bentuk *Rhizoid* : yaitu bentuk pertumbuhan seperti akar

Adapun visualisasi karakteristik bentuk pertumbuhan koloni bakteri pada media *Nutrien Agar* (NA) miring dapat dilihat pada **Gambar 4.5**.



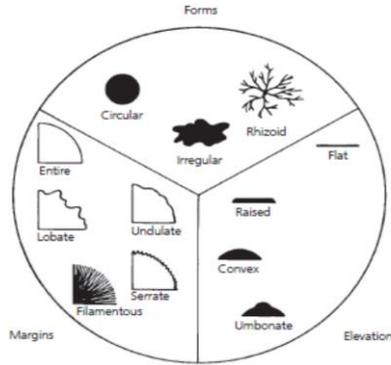
Gambar 4.5. Karakteristik bentuk pertumbuhan koloni bakteri pada media *Nutrien Agar* (NA) miring. Berdasarkan urutan dari kiri ke kanan : *filiform*, *echinulate*, *beaded*, *effuse*, *arborescent*, dan *rhizoid* (O. Erkmen, 2021)

Karakteristik bakteri yang tumbuh pada media agar cawan memiliki kategori yang berbeda dibandingkan koloni pada agar miring di tabung. Hal ini disebabkan jenis penggoresan saat inokulasi yang berbeda. Pada media *Nutrien Agar* (NA) datar di cawan petri, karakteristik koloni yang tumbuh terpisah dengan baik dapat dievaluasi dengan ciri-ciri sebagai berikut (Prasanna Kumar, 2023; Woolverton, Macdonald, & Robison, 2016):

1. Ukuran koloni dapat dikategorikan menjadi : *pinpoint* (titik sangat kecil), *small* (kecil), *moderate* (sedang), *large* (lebar).
2. Pigmentasi koloni bakteri menggambarkan warna koloni bakteri. Tidak berpigmen (yaitu putih, krem, coklat) dan Memiliki pigmen (yaitu ungu, merah, kuning).

3. Bentuk, adalah karakter makroskopis bakteri yang terlihat pada media, yang digambarkan sebagai berikut :
 - a. *Circular* : koloni bentuk bulat.
 - b. *Irregular* : koloni dengan bentuk tidak teratur.
 - c. *Rhizoid* : koloni dengan bentuk dengan pertumbuhan menyebar seperti akar
 - d. *Filamentous* : koloni dengan bentuk serabut tipis
 - e. *Spindle* : koloni dengan bentukan oval memanjang
4. Tepi koloni bakteri, yaitu penampakan tepian terluar koloni. Untuk pengamatan dapat dilihat secara tegak lurus, diatas koloni yang akan dikarakterisasi. Jenisnya adalah sebagai berikut:
 - a. Jenis tepi *Entire* , tepi koloni sangat rata.
 - b. Jenis tepi *Lobate* , tepi koloni lekukan yang jelas.
 - c. Jenis tepi *Undulate*, tepi koloni lekukan seperti gelombang.
 - d. Jenis tepi *Serrate* , tepi koloni bergerigi.
 - e. Jenis tepi *Filamentous*, tepi koloni seperti benang, tepian menyebar.
5. Elevasi, yaitu sudut penonjolan pertumbuhan koloni pada permukaan agar. Untuk pengamatan dilakukan dari samping cawan petri. Jenisnya adalah sebagai berikut :
 - a. Jenis elevasi *Flat* , elevasi datar, elevasi tidak nyata.
 - b. Jenis elevasi *Raised* , elevasinya sedikit menonjol.
 - c. Jenis elevasi *Convex* , elevasinya berbentuk kubah.
 - d. Jenis elevasi *Umbonate*, elevasinya menonjol dengan elevasi *convex* di bagian tengah.

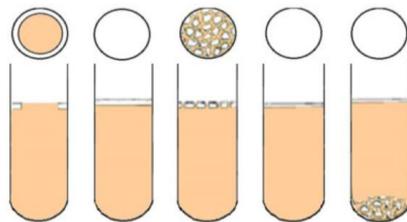
Beberapa karakteristik pertumbuhan koloni bakteri pada media *Nutrien Agar (NA)* datar di cawan petri dapat dilihat pada **Gambar 4.6.**



Gambar 4.6. Karakteristik pertumbuhan koloni bakteri pada media *Nutrien Agar* (NA) datar di cawan petri (Prasanna Kumar, 2023)

Pada media *Nutrien Broth* (NB) di tabung reaksi, karakteristik kultur bakteri dievaluasi berdasarkan posisi kultur dalam media pertumbuhan, adapun pengelompokannya adalah sebagai berikut :

1. Penyebaran yang rata : pertumbuhan yang tersebar rata dengan baik dalam seluruh medium.
2. Penyebaran jenis *Flocculant* : berbentuk agregat yang mudah terbelah yang tersebar di seluruh medium.
3. Penyebaran jenis *Pellicle* : bakteri tumbuh tebal, pertumbuhan yang membentuk blok di permukaan medium.
4. Penyebaran jenis *Sediment* : bakteri tumbuh terkonsentrasi pada bagian bawah kultur *broth*, dengan bentuk bervariasi yaitu bentuk granular, serpihan, atau *flocculant*.

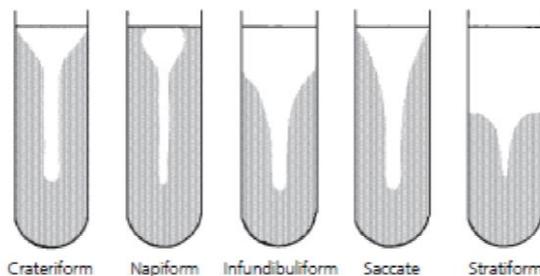


Gambar 4.7. Tipe pertumbuhan dipermukaan menggunakan nutrient broth. Berdasar urutan dari kiri ke kanan: *ring*, *pellicle*, *flocculent*, *membranous* dan *sediment* (O. Erkmen, 2021)

Media nutrien gelatin dapat digunakan untuk menampilkan kemampuan bakteri dalam mencairkan gelatin dengan membantuk gelatinase. Apabila gelatin disintesis bakteri, maka pada media gelatin akan didapatkan beberapa macam pola, yaitu sebagai berikut :

1. Bentuk pencairan *Crateriform* : Pertumbuhan pada permukaan yang mencair membentuk bentukan seperti mangkuk.
2. Bentuk pencairan *Napiform* : Pertumbuhan pada permukaan yang mencair membentuk bentukan seperti bulbus.
3. Bentuk pencairan *Infundibuliform* : Pertumbuhan pada permukaan yang mencair membentuk bentukan seperti corong.
4. Bentuk pencairan *Saccate* : Pertumbuhan pada permukaan yang mencair membentuk bentukan memanjang, seperti tabung.
5. Bentuk pencairan *Stratiform* : Pertumbuhan pada permukaan yang mencair hingga setengah bagian atas media

Adapun visualiasi karakter pertumbuhan bakteri pada media gelatin terilustrasi pada Gambar 4.8 berikut ini.



Gambar 4.8. Tipe pertumbuhan koloni bakteri menggunakan media gelatin (Prasanna Kumar, 2023)

DAFTAR PUSTAKA

- Cobo, M. P., Libro, S., Marechal, N., D'Entremont, D., Cobo, D. P., & Berkmen, M. (2018). Visualizing Bacterial Colony Morphologies Using Time-Lapse Imaging Chamber MOCHA. *Journal of Bacteriology*, 1-8.
- Erkmen, O. (2021). Practice 14 - Cultural characteristics of bacteria. In O. B. T.-L. P. in M. Erkmen (Ed.) (pp. 135-141). Academic Press. Retrieved from <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91017-0.00014-7>
- Prasanna Kumar, C. (2023). *Laboratory II: Microbiology*. Retrieved from <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.13669.47848>
- Sousa, A. M., Machado, I., Nicolau, A., & Pereira, M. O. (2013). Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling, 95, 327-335. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.09.020>
- Teeseling, M. C. F. Van, Pedro, M. A. De, & Cava, F. (2017). Determinants of Bacterial Morphology : From Fundamentals to Possibilities for Antimicrobial Targeting, 8(July), 1-18. Retrieved from <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01264>
- Woolverton, C., Macdonald, B., & Robison, R. (2016). Colony Morphology Protocol, (September 2007), 1-7.
- Young, K. D. (2008). Bacterial morphology : Why have different shapes ?, 10(6), 596-600.
- Zhou, X., & Li, Y. B. T.-A. of O. M. (Eds.). (2015). Chapter 1 - Basic Biology of Oral Microbes (pp. 1-14). Oxford: Academic Press. Retrieved from <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802234-4.00001-X>

BIODATA PENULIS



Penulis menyelesaikan studi program Sarjana pada 2007 dan Magister pada 2012. Kedua jenjang ditempuh di program studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi di Universitas Airlangga.

Saat ini berprofesi sebagai pengajar di Universitas Nahdlatul Ulama Surabaya. Bidang yang diajarkan meliputi Biologi Medik, Biologi Sel, Biologi Molekuler, Bakteriologi, dan Mikologi.

BAB 5

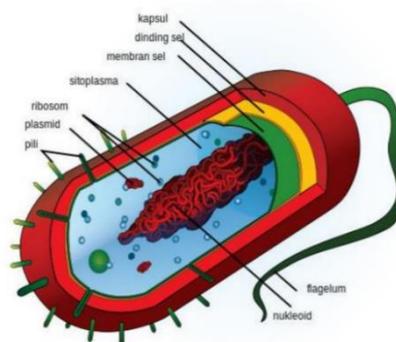
Struktur Bakteri

Nurbidayah, M.Pd

A. Pendahuluan

Bakteri adalah organisme uniseluler yang merupakan mikroorganisme yang hanya dapat dilihat dengan menggunakan mikroskop karena tidak bisa dilihat dengan mata telanjang yaitu berukuran antara 0,12 mikron. Bakteri juga suatu organisme yang memiliki jumlah paling banyak yaitu lebih dari seratus ribu jenis spesies pada habitatnya seperti di darat, udara, laut maupun tempat-tempat ekstrim. Bakteri termasuk sel prokariotik dengan struktur sel bakteri pada umumnya terdiri atas struktur dasar dan struktur khusus atau tambahan.

- Struktur dasar terdiri atas dinding sel, membran plasma, ribosom, sitoplasma, dan DNA merupakan organel yang terdapat pada hampir semua jenis bakteri.
- Struktur tambahan meliputi kapsul, flagell, pilus, fimbria, volutin dan endospora merupakan organel yang hanya dimiliki oleh beberapa jenis bakteri tertentu (Aliviameita & Puspitasari, 2020).



Gambar 5.1. Struktur umum Bakteri

B. Struktur Dasar

1. Dinding Sel

Dinding sel merupakan struktur paling luar yang transparan, kuat, dan kaku, serta memberikan bentuk sel (Biology & Microbes, 2015). Fungsi dinding sel yaitu memberi bentuk serta melindungi bagian dalam sel bakteri. Letak dari dinding sel secara umum berada diantara kapsul dan membran sitoplasma dengan rata-rata ketebalan dinding sel berkisar antara 15 – 35 nm. Dinding sel terdiri atas peptidoglikan, yaitu gabungan polisakarida dan protein.

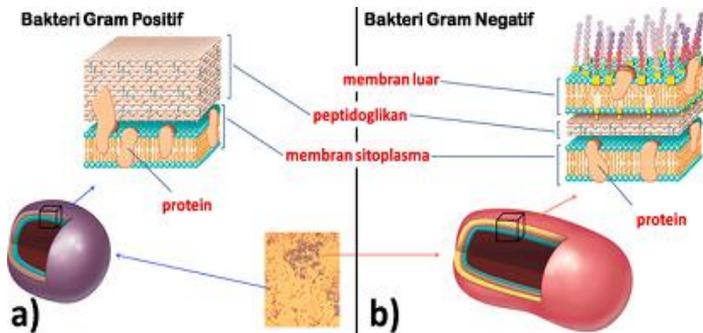
Bakteri dapat dibedakan berdasarkan perbedaan struktural dinding sel jenis bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif (Aliviameita & Puspitasari, 2020) seperti pada tabel berikut

Tabel 5.1. Perbedaan Susunan Dinding Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif (Rini & Rochmah, 2020)

No	Bakteri Gram Positif	Bakteri Gram Negatif
1	Ketebalan dinding sel antara 25-30 nm	Ketebalan dinding sel antara 10-15 nm
2	Lapisan terbesar berupa peptidoglikan dan tersusun atas 40 lapis rangka dasar murein	Lapisan dalam berupa rangka dasar murein dan Lapisan luar tersusun atas lipopolisakarida dan lipoprotein
3	Lisozim dapat melisiskan peptidoglikan	Lisozim dapat melunakkan dinding sel
4	Terdapat asam teikoat pada beberapa jenis bakteri	Tidak terdapat asam teikoat
5	Rentan terhadap antibiotik Penicilin	Kurang rentan

Struktur kimia dinding sel pada bakteri dengan sifat Gram positif lebih sederhana dibandingkan dengan Gram negatif (Willey, Sherwood, 2009). Komponen dinding sel bakteri Gram positif yaitu tersusun dari peptidoglikan yang lebih tebal sehingga struktur dinding sel kaku dan terdapat senyawa yaitu

asam teikhoat pada bagian luar dari petidoglikan. Sedangkan, struktur kimia bakteri Gram negatif lebih sedikit kandungan peptidoglikan, namun terdapat membran luar dengan komposisi lipoprotein, fosfolipid dan lipopolisakarida yang terdapat di bagian luar dari peptidoglikan. Oleh sebab itu, bakteri Gram positif dan Gram negatif memiliki ketahanan yang berbeda karena struktur dinding sel yang berbeda. Bakteri Gram positif mengandung peptidoglikan sehingga memiliki kerentanan terhadap antibiotika seperti penisilin antibiotika tersebut dapat merusak peptidoglikan.



Gambar 5.2. Struktur Dinding Sel Bakteri

a) Gram Positif b) Gram Negatif

(Sumber: Rini & Rochmah, 2020)

Pewarnaan diperlukan untuk mengetahui sifat Gram bakteri selanjutnya diamati dibawah mikroskop. Teknik pewarnaan untuk mengetahui sifat Gram suatu bakteri menggunakan pewarnaan Gram yang ditemukan oleh Hans Christian Gram di tahun 1884. Salah satu metode yang dapat dilakukan pada pewarnaan Gram yaitu Gram Stain dengan cara membuat preparat dari koloni bakteri, kemudian diwarnai menggunakan zat warna violet dan yodium, digenangi dengan alkohol, yang selanjutnya diberi zat warna safranin. Hasil pengamatan di bawah mikroskop menunjukkan apabila terlihat warna ungu digolongkan bakteri Gram positif, dan apabila

berwarna merah digolongkan bakteri Gram negatif. Berikut merupakan perbedaan sifat Gram bakteri.

Tabel 5.2. Perbedaan Sifat Bakteri Gram Positif dan Bakteri Gram Negatif

Perbeda	Bakteri Gram Positif	Bakteri Gram Negatif
Peptidoglikan	Tebal sekitar 1-4%	Lebih tipis sekitar 11-22%
Bentuk sel	Bulat, batang, filamen	Bulat, oval, koma
Toksin yang dibentuk	Eksotoksin	Endotoksin
Metabolisme	Kemoorganoheterotrof	fototrof
Endospore	Beberapa membentuk endospora	Tidak membentuk endospora
Motilitas	Non motil, namun ada beberapa yang motil	Motil dan non motil
Tipe flagel	Petritik	Bervariasi

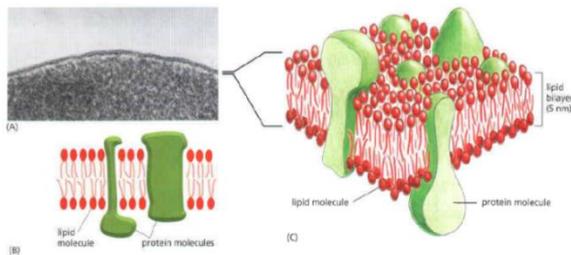
Terdapat perbedaan komponen dinding sel bakteri Gram positif pada bakteri *Mycobacterium tuberculosis* karena memiliki komposisi yang sangat kompleks yaitu bersifat tahan asam, karena dinding sel pada bakteri ini tersusun atas 60% lapisan lemak. Struktur utama penyusun dinding sel bakteri ini berupa asam mikolat berupa asam lemak dengan struktur rantai yang panjang yang dihubungkan dengan arabinogalaktan pada ikatan peptidoglikan dan glikolipid oleh fosfodiester. Selain itu, terdapat unsur berupa polisakarida.

Sifat khusus dari bakteri *Mycobacterium tuberculosis* adalah memiliki sifat tahan asam pada pewarnaan Zielh-Nelssen, sehingga dikatakan Basil Tahan Asam (BTA). Ketahanan bakteri tersebut didalam jaringan tubuh dapat bertahan lama (Ichwan, 2009).

2. Membran Plasma

Membran plasma terdiri atas lipid dan protein. Lipid yang menyusun membran adalah phosphoglyceride, sphingolipids, dan steroid. Lipid pada membran sel dapat

mengakibatkan membran memiliki sifat amfipatik dengan daerah kepala yang menyukai air (hidrofilik) dan daerah ekor yang tidak menyukai air (hidrofobik). Lapisan membran terdiri atas 2 lapisan molekul lipid yang disebut lipid bilayer. Terdapat tiga protein penyusun membran yaitu kategori yaitu protein terikat pada lemak, protein perifer, dan protein integral. Membran plasma berperan sebagai selaput sel yang bersifat semipermeabel. Tugas utamanya yaitu mengatur keluar dan masuk berbagai molekul dan ion-ion. Secara sederhana membran plasma dapat diistilahkan sebagai jalur masuk berbagai molekul dan ion-ion yang dibutuhkan oleh sel. Sebaliknya dapat juga berfungsi sebagai jalur ekskresi dari berbagai molekul dan ion-ion yang sudah tidak dibutuhkan lagi oleh sel. Membran plasma harus dalam keadaan semifluid sekitar 50% agar terjadi pertumbuhan sel secara terus menerus. Pada bakteri Gram positif, membran plasma membentuk lipatan disebut mesosom. Mesosom juga berfungsi sebagai jalur ekskresi dari berbagai molekul dan ion (Agustina, et al., 2021).



Gambar 5.3. Struktur Membran Plasma
(Sumber: Alberts, et al., 2014)

3. Sitoplasma
 - a. Nukleoid

Bakteri termasuk kedalam sle prokariotik sehingga tidak memiliki nukleus, sehingga untuk menyimpan informasi genetik berupa daerah disebut nukleoid. Nukleolid merupakan organel yang tidak dibatasi oleh membran dan tidak mengadakan pembelahan. Bentuk nukleolid adalah kurang beraturan terdiri dari banyak kromatin yang fibriler.

Nukleoid tersusun atas molekul berupa DNA yang dapat membentuk kromosom. DNA pada sel bakteri mengandung informasi genetika. Selain itu, beberapa bakteri juga terdapat plasmid yang mengandung materi genetika tidak penting bagi pertumbuhan sel.

b. Ribosom

Ribosom tersusun atas protein dan molekul RNA berbentuk partikel kecil. Fungsi dari ribosom yaitu berperan dalam proses sintesis protein pada tahap translasi. Dalam satu sel prokariotik dapat mengandung ribosom sampai 10.000, sehingga beratnya mencapai 40% dan berat total organel sel bakteri (Agustina, et al., 2021).

Ribosom dapat ditemukan pada jenis sel prokariotik (tidak memiliki membran inti) seperti bakteri dan sel eukariotik (memiliki membran inti). Struktur ribosom memiliki subunit berupa sub unit besar dan subunit kecil. Pada sel prokariotik yaitu sel bakteri memiliki ribosom 70S tersusun atas subunit 30S dan 50S dan ribosom 80S pada sel eukariotik. Pada setiap subunit pada ribosom mengandung protein ribosomal RNA atau rRNA. Ukuran ribosom pada sel prokariotik lebih kecil dibandingkan sel eukariotik.

Molekul RNA berfungsi untuk menyampaikan informasi genetik DNA dalam bentuk RNA messenger (mRNA) kepada ribosom. Ribosom yang mengandung RNA ribosom (rRNA) dan protein-protein menterjemahkan pesan melalui RNA transfer (tRNA)-aminoasil membentuk protein primer. Ukuran dari molekul RNA dari kurang lebih 100 basa dan mRNA memiliki beberapa ribu basa sehingga dapat membawa pesan genetik (Jawetz, et al., 2013).

c. Granula

Granula dimiliki oleh sel prokariotik merupakan organel yang terdapat pada sitoplasma. Fungsi granula adalah tempat penyimpanan cadangan makanan yang dibutuhkan oleh bakteri. Granula tersusun atas glikogen, asam polihidroksibutirat, metafosfat anorganik, belerang maupun senyawa dengan kandungan nitrogen yang

memiliki peran sebagai simpanan makanan bagi sel disebut badan inklusi. Inklusi hanya dimiliki oleh beberapa bakteri saja, sehingga inklusi berperan dalam melakukan identifikasi pada spesies bakteri.

d. Plasmid

Pada sebagian bakteri terdapat plasmid. Plasmid adalah molekul DNA ekstrasomosomal yang terpisah dari DNA kromosom dan dapat melakukan replikasi sendiri. Plasmid pada sel bakteri memiliki fungsi sebagai pembawa sifat yang tidak mutlak diperlukan untuk pertumbuhan bakteri, namun memiliki peran langsung dalam proses metabolisme maupun membantu dalam proses pertumbuhan bakteri.

4. DNA (deoxyribonucleic acid)

Asam deoksiribonukleat yang berperan sebagai pembawa informasi genetik termasuk pada bakteri. DNA pada bakteri berfungsi sebagai informasi genetik dan terdapat pada sitoplasma. DNA berbentuk sirkuler dan panjang disebut nukleoli. DNA bakteri hanya memiliki akson saja (Jawetz dkk., 2005).

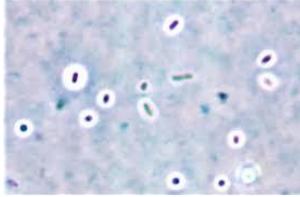
C. Struktur Khusus/Tambahan

1. Kapsul

Kapsul disebut sebagai selubung berlendir berupa bahan kental seperti lendir yang membentuk suatu lapisan pada permukaan luar dinding sel. Kapsul dapat ditemukan pada beberapa bakteri patogen (Boleng, 2020). Lapisan ini berfungsi untuk melindungi bakteri dari lingkungan luar seperti perlindungan terhadap pertahanan inang dan respon imun (Al-Mohanna, 2016). Selain itu kapsul juga berfungsi sebagai gudang makanan bagi kehidupan sel bakteri.

Kapsul pada suatu bakteri dapat menimbulkan sifat virulensi terhadap inangnya. Dapat dikatakan apabila bakteri kehilangan kapsul, maka bakteri tersebut dapat kehilangan sifat virulennya (Amelia, 2017). Secara mikroskopis bentuk kapsul pada sel bakteri dapat dilihat melalui metode pengecatan negatif

menggunakan reagen tinta cina atau nigrosine. Setelah dilakukan pewarnaan kapsul bakteri tampak transparan dengan latar gelap. Contoh bakteri yang memiliki kapsul yaitu *Pneumococcus* sp. dan *Bacillus* sp (Aliviameita & Puspitasari, 2020).



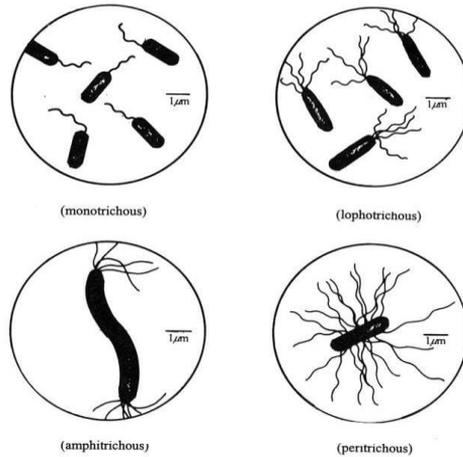
Gambar 5.4. Kapsul pada Bakteri Secara Mikroskopis
(Sumber: Rini & Rochmah, 2020)

2. Flagela

Flagela merupakan tonjolan filamentus seperti rambut memanjang pada dinding sel (Rohan et al., 2016) tersusun atas senyawa protein yang disebut flagellin dari dinding sel. Flagel ini berfungsi sebagai alat gerak sehingga memungkinkan bakteri untuk bergerak di atas permukaan dan membentuk kolonisasi. Ukuran flagel sangat kecil yaitu diameter sekitar 12 hingga 18 nm dan panjang >20 nm sehingga tidak dapat dilihat dengan mikroskop.

Flagel memiliki struktur yang tersusun atas tiga bagian yaitu filamen, sudut (hook), dan bagian dasar (basal body). Pada bagian dasar tersusun atas suatu tangkai serta rangkaian cincin disekelilingnya. Bagian dasar ini menempel pada membran plasma dan peptidoglikan untuk bakteri Gram positif dan menempel pada membran luar untuk bakteri Gram negatif.

Penggolakan bakteri berdasarkan ada tidaknya alat gerak, yaitu bakteri bersifat motil (bergerak) dengan menggunakan alat gerak berupa flagela dan non motil (tidak bergerak). Bakteri dapat dikelompokkan berdasarkan jumlah flagela dan letak flagela yaitu (Pelczar, 2004):



Gambar 5.5. Tipe-tipe Flagel Bakteri
(Sumber: Pelczar, 2004)

- a) Atrik, merupakan bakteri yang tidak mempunyai flagel seperti *Lactobacillus*, *Klebsiella* sp, dan *Shigella* sp.
- b) Monotrik, merupakan bakteri yang hanya memiliki satu flagela, seperti *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio* sp.
- c) Lofotrik, merupakan bakteri yang hanya salah satu sisi sel memiliki banyak flagela, seperti *Pseudomonas fluorescens*.
- d) Amfitrik, merupakan bakteri yang pada kedua ujung sel memiliki flagela, seperti *Aquaspirillum serpens*.
- e) Peritrik, merupakan bakteri dengan flagela yang terletak tersebar pada permukaan dinding sel, seperti *Salmonella typhi*.

Flagela pada sel bakteri dapat dilepaskan atau dipisahkan dengan menggunakan alat seperti sentrifugasi. Sel bakteri dapat tetap hidup dan bergerak dengan pertumbuhan flagela kembali pada sel. Sel bakteri yang mempunyai flagel dapat mendatangi sumber makanan dan menghindari racun dengan cara menarik leukosit atau menghindari zat atau senyawa yang berbahaya.

3. Pili dan Fimbriae

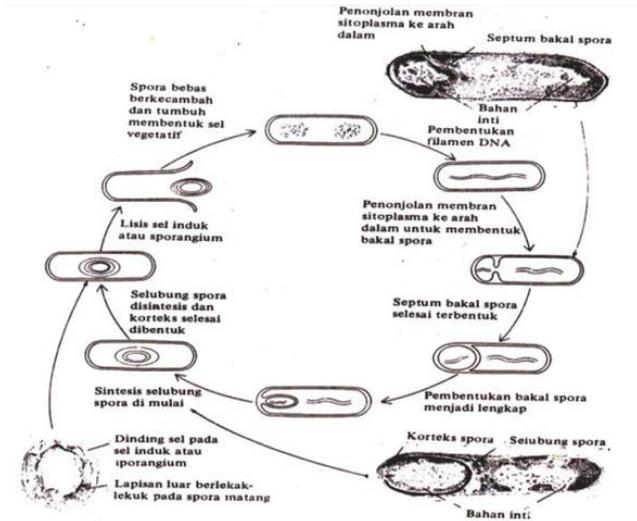
Pili dalam bahasa Latin berarti "rambut" dan fimbria berarti "rumbai" merupakan struktur tambahan berfilamen yang lebih tipis, pendek. Fimbriae memiliki jumlah yang lebih banyak dibandingkan pili. Pili tersusun atas protein struktural yang disebut pilin. Fimbriae berfungsi sebagai tempat pelekatan bakteri, dan pili berfungsi untuk terjadinya perpindahan DNA (konjugasi) (Harti, 2015), sehingga berperan dalam masuknya bahan genetik pada saat terjadinya reproduksi antarbakteri dan pili tersebut menyebabkan bakteri melekat satu sama lain. Pili dibagi dalam dua kelas: pili biasa yang berperan dalam perlekatan bakteri, dan pili seksual yang berperan pada proses konjugasi bakteri (Jawetz, et al., 2013).

4. Endospora

Endospora merupakan lapisan tubuh yang berbentuk bulat sampai oval. Endospora adalah tahap dimana bakteri yang mampu membentuk endospora menebalkan dinding selnya, sehingga lebih tebal dibandingkan sel vegetatifnya. Sel bakteri dapat membentuk pada bakteri ketika sel bakteri terpapar kondisi lingkungan yang buruk seperti suhu tinggi, kekeringan, zat kimia beracun (disinfektan, antibiotik) dan sinar UV. Endospora dapat dilihat dibawah mikroskop menggunakan pewarna khusus yaitu malachite green (Alivameita & Puspitasari, 2020). Contoh bakteri yang paling pada *Bacillus* yang termasuk golongan bakteri aerobik dan *Clostridium* yang termasuk golongan bakteri anaerobik (Alivameita & Puspitasari, 2020; Biology & Microbes, 2015).

Bakteri mengalami sebuah siklus perbedaan, karena respons terhadap kondisi lingkungan yang berbeda. Seperti kondisi sel bakteri kekurangan nutrisi, maka sel akan membentuk spora pada saat sel induk mengalami kerusakan. Spora merupakan sel dalam keadaan istirahat dan resistan terhadap keadaan ekstrim seperti kekeringan, panas, maupun bahan kimia. Pada saat kondisi tersebut membaik dan spora teraktivasi, spora akan tumbuh dan menghasilkan sel vegetatif kembali (Jawetz, et al., 2013). Endospora dapat melakukan

germinasi atau berbentuk kecambah ketika lingkungan telah sesuai untuk pertumbuhannya. Endospora pada bakteri juga tersusun atas materi inti berupa DNA dan ribosom sehingga mampu melakukan sintesis sendiri saat germinasi. Struktural selama sporulasi endospora dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 5.6. Perubahan-perubahan struktural selama sporulasi bakteri (Sumber : Pelczar, et al., 1986)

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, DK., Suharno, Z., Dede, CS., Feldha, F., dkk. 2021. *Teori Biologi Sel*. Yayasan Aceh: Penerbit Muhammad Zaini.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2014. *Fourth Edition Essential Cell Biology*.
- Aliviameita, A., & Puspitasari. (2020). *Buku Ajar Mata Kuliah*. In Umsida Press Sidoarjo Universitas (Vol. 1, Issue 1).
- Al-Mohanna, M. T. (2016). Morphology and Classification of Bacteria. Researchgate. 1-19. https://www.researchgate.net/publication/315803754_Morphology_And_Classification_Of_Bacteri_A.
- Amelia, T. 2017. *Buku Ajar Mikrobiologi*. Tanjungpinang.
- Ananthakumar, R. (2020). Types of DOfage Forms and Their Definitions. *Vels*, 1-15.
- Boleng, D. T. (2020). *Bakteriologi; Konsep-Konsep dasar*. UMM Press.
- Jawetz, E., Melnick, J.L. & Adelberg, E.A. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*, diterjemahkan oleh Mudihardi, E., Kuntaman, Wasito, E. B., Mertaniasih, N. M., Harsono, S., Alimsardjono, L., Edisi XXII, Penerbit Salemba Medika, Jakarta
- Jawetz, Melnick, Adelberg. 2013. *Medical Microbiology 26th Edition*. New York: McGraw. NewYork: Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Norman-McKay, L. 2019. *Microbiology: basic and clinical principles*. Pearson.
- Pelczar, M.J., Chan, C.S. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi 2*. Alih Bahasa: Ratna Siri Hadioetomo, dkk. Jakarta: UI Press.
- Pelczar, M. J dan Chan, E.C.S., Krieg, N.R. 2004. *Microbiology. Fifth Edition*. McGrawHill Book Company, Inc. New York.
- Rini, c. s., & Rochmah, j. 2020. *Bakteriologi Dasar*. Sidoarjo: UMSIDA Press.
- Willey, Sherwood, W. (McGraw-H. H. E. 2009. Prescott's Principles of Microbiology. *In Journal of Chemical Information and Modeling*.

BIODATA PENULIS



Nurbidayah, M.Pd, lahir di Kab. Hulu Sungai Tengah, 19 Februari 1991. Menyelesaikan pendidikan tinggi; Pendidikan Sarjana (S-1) pada Program Studi Pendidikan Biologi di Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin (2012); dan Pendidikan Magister (S-2) pada Program Studi Pendidikan Biologi di Universitas Negeri Malang, Malang (2014). Saat ini sedang tercatat sebagai dosen tetap pada Fakultas Ilmu Kesehatan dan Sains Teknologi, Universitas Borneo Lestari, Banjarbaru. Penulis telah beberapa menulis artikel, yang diterbitkan pada jurnal nasional. Penulis dapat dihubungi melalui email: day91queen@gmail.com atau HP/WA 081351418398.

BAB 6

Teori Pewarnaan, Reaksi Pewarnaan, Jenis-jenis Pewarnaan dan Prosedur Pewarnaan

Dian Rachma Wijayanti, M.Sc

A. Teori Pewarnaan

Sel bakteri berukuran sangat kecil sehingga tidak dapat dilihat dengan mata telanjang. Mikroskop dibutuhkan dalam pengamatan bakteri. Namun meskipun sudah dapat dilihat dengan mikroskop tubuh vegetatif bakteri tidak dapat terlihat dengan jelas karena bakteri akan tampak tidak berwarna. Bakteri pada umumnya tidak berwarna sehingga akan tampak transparan pada saat diamati dengan mikroskop. Oleh karenanya ilmuwan banyak mengembangkan teknik pewarnaan agar lebih mudah mengamati mikroorganisme ataupun struktur makhluk hidup. Sel bakteri yang tidak diwarnai tidak akan nampak jelas terlepas besar perbesaran atau daya pisah mikroskop. Proses "mengembangkan" pewarna untuk menciptakan kontras dan membuat fitur yang tidak mencolok menonjol membutuhkan pewarnaan. Pewarnaan adalah prosedur apa pun yang menerapkan bahan kimia berwarna yang disebut pewarna pada spesimen. Pewarna memberi warna pada sel atau bagian sel melalui reaksi kimia. Secara umum, pewarna diklasifikasikan sebagai pewarna basa (kationik), yang memiliki muatan positif, atau pewarna asam (anionik), yang memiliki muatan negatif (Madigan et al., 2021).

Pewarnaan akan membuat sel bakteri memiliki kontras dengan latar belakang. Pewarnaan meningkatkan kontras

mikroskop medan terang Pewarna dapat digunakan untuk mewarnai sel dan meningkatkan kontrasnya sehingga dapat lebih mudah dilihat di mikroskop medan terang. Setiap jenis pewarna memiliki afinitas terhadap bahan seluler tertentu. Banyak pewarna yang digunakan dalam mikrobiologi bermuatan positif, oleh karenanya pewarna dikenal pewarna basa. Contoh pewarna basa meliputi metilen biru, kristal violet, dan safranin. Pewarna basa mengikat kuat komponen sel bermuatan negatif, seperti asam nukleat dan polisakarida asam. Pewarna ini juga mewarnai permukaan sel karena permukaan sel cenderung bermuatan negatif. Sifat-sifat ini membuat pewarna basa berguna sebagai pewarna serbaguna yang secara nonspesifik mewarnai sebagian besar sel bakteri (Talaro & Chess, 2018).

B. Jenis-jenis Pewarnaan

Jenis-jenis pewarnaan dapat dikelompokkan menjadi tiga. Pewarnaan sederhana, pewarnaan negatif dan pewarnaan diferensial. Pewarnaan tersebut secara kimiawi berpadu dengan protoplasma bakteri; jika sel tersebut belum mati, proses pewarnaan itu sendiri akan membunuh bakteri (Carroll et al., 2019).

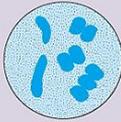
1. Pewarnaan Sederhana

Teknik pewarnaan yang sangat mudah digunakan adalah pewarnaan sederhana. Pewarnaan sederhana termasuk ke dalam jenis pewarnaan positif. Pewarnaan ini hanya menggunakan satu jenis pewarna, dan semua jenis bakteri akan nampak sesuai dengan pewarna yang berikan di bawah mikroskop. Beberapa pewarna yang umum digunakan untuk pewarnaan sederhana meliputi kristal violet, safranin, dan biru metilen. Pewarnaan sederhana hanya dapat digunakan untuk menentukan morfologi dan susunan koloni bakteri. Bakteri hidup umumnya transparan, dan tidak memberikan kontras yang cukup dengan air tempat mereka tersuspensi agar dapat terlihat jelas. Tujuan pewarnaan adalah untuk meningkatkan

kontras antara organisme dan latar belakang sehingga lebih mudah dilihat di mikroskop cahaya. Dalam pewarnaan sederhana, apusan bakteri diwarnai dengan larutan pewarna tunggal yang mewarnai semua sel dengan warna yang sama tanpa membedakan jenis atau struktur sel. Pewarna tunggal yang digunakan di lab kami adalah biru metilen, pewarna basa. Pewarna basa, yang bermuatan positif, mengikat kuat komponen sel yang bermuatan negatif seperti asam nukleat bakteri dan dinding sel (Petersen & McLaughlin, 2016; Petersen & McLaughlin, 2021).

2. Pewarnaan Negatif

Sebagian besar prosedur melibatkan pewarnaan positif, di mana pewarna benar-benar menempel pada sel dan memberi mereka warna. Pewarnaan negatif merupakan kebalikannya. Pewarna tidak mewarnai spesimen tetapi mewarnai latar belakang di sekitar batas luar sel, membentuk siluet (Gambar 8.1). Nigrosin (pewarna biru-hitam) dan tinta India (suspensi hitam partikel karbon) adalah pewarna yang paling umum digunakan untuk pewarnaan negatif. Sel-sel itu sendiri tidak terwarnai karena pewarna ini bermuatan negatif dan ditolak oleh permukaan sel yang bermuatan negatif. Nilai lebih pewarnaan negatif ada pada kesederhanaan teknik dan penyusutan atau distorsi sel yang berkurang. Hal ini disebabkan karena pada pewarnaan negatif apusan bakteri tidak difiksasi dengan panas. Pewarnaan ini memiliki waktu lebih cepat untuk melihat ukuran, bentuk, dan susunan sel. Pewarnaan negatif juga dapat digunakan untuk menonjolkan kapsul yang mengelilingi bakteri dan ragi tertentu. Selain itu bentuk bakteri spiral juga nampak lebih jelas dengan pewarnaan ini (Talaro & Chess, 2018).

	Positive Staining	Negative Staining
Appearance of cell	Colored by dye	Clear and colorless
		
Background	Not stained (generally white)	Stained (dark gray or black)
Dyes employed	Basic dyes: Crystal violet Methylene blue Safranin Malachite green	Acidic dyes: Nigrosin India ink
Subtypes of stains	Several types: Simple stain Differential stains Gram stain Acid-fast stain Spore stain Structural stains One type of capsule stain Flagella stain Spore stain Granules stain Nucleic acid stain	Few types: Capsule Spore Negative stain of <i>Bacillus anthracis</i> , showing its capsule
		

(bottom): Source: Larry Stauffer, Oregon State Public Health Laboratory/CDC

Gambar 6.1 Perbedaan pewarnaan positif dan negatif (Talaro & Chess, 2018)

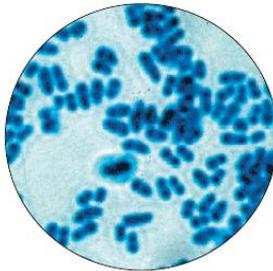
3. Pewarnaan Diferensial

Pewarnaan diferensial merupakan kebalikan dari teknik pewarnaan sederhana. Pewarnaan diferensial menggunakan lebih dari satu jenis zat warna. Teknik pewarnaan diferensial lebih sering digunakan daripada pewarnaan sederhana sebagai sarana pengumpulan informasi tentang bakteri (Ahern, 2018b). Teknik pewarnaan diferensial biasanya memerlukan lebih dari satu pewarnaan dan beberapa Langkah. Penamaan pewarnaan diferensial disebut demikian karena memungkinkan diferensiasi jenis sel atau struktur sel tertentu. Pewarnaan ini termasuk pewarnaan Gram, tahan asam, kapsul dan pewarnaan spora. Zat warna yang digunakan dibedakan menjadi zat warna utama dan zat warna tandingan (Ahern, 2018).

C. Prosedur Pewarnaan

1. Prosedur Pewarnaan Sederhana

Pewarnaan sederhana dimulai dengan preparat sel yang telah dikeringkan. Kaca objek bersih yang berisi suspensi sel yang telah dikeringkan digenangi selama satu atau dua menit dengan larutan encer pewarna basa, dibilas beberapa kali dalam air, dan dikeringkan dengan cara ditepuk-tepuk. Preparat yang sudah siap diamati biasanya preparat sel yang telah dikeringkan dan diwarnai dengan lensa berdaya tinggi (minyak imersi). Hasil pewarnaan berupa bakteri dengan satu jenis warna (**Gambar 6.2**).



Gambar 6.2 *Corynebacterium* diwarnai dengan *methylene blue* (Talaro & Chess, 2018)

2. Prosedur Pewarnaan Negatif

Pertama buatlah preparat ulas tanpa fiksasi. Setelah itu kering udarakan. Kemudian berikan larutan zat pewarna negatif. Biarkan zat warna selama 30 detik sampai 60 detik. Amati dengan mikroskop. Sel nampak tidak berwarna dengan latar belakang gelap seperti pada **Gambar 6.3** (Brown & Smith, 2017).



Gambar 6.3 Bakteri berbentuk spiral dengan pewarnaan negatif (Talaro & Chess, 2018)

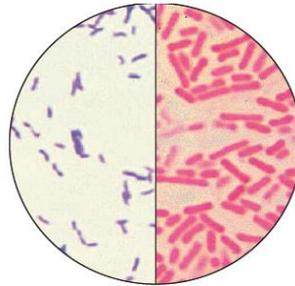
3. Prosedur Pewarnaan Diferensial: Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram terdiri dari pembuatan apusan bakteri, fiksasi panas yang lembut dan penambahan empat komponen zat warna secara berurutan sebagai berikut (**Gambar 6.4**): kristal violet (pewarnaan primer, 1 menit), Iodium (mordan atau fiksatif, 1 menit), alkohol atau larutan alkohol aseton (penghilang warna, aktif dan bilas cepat), dan safranin (counterstain, 30 detik). Waktu yang digunakan dapat bervariasi sesuai dengan aturan pakai yang ada pada set pewarnaan Gram. Setelah preparat selesai dibuat, amati dengan mikroskop pada perbesaran 1000x dan tambahkan minyak imersi (**Gambar 6.4**) (Mahon & Lehman, 2019).

Step	Microscopic Appearance of Cell		Chemical Reaction in Cell (very magnified view)	
	Gram (+)	Gram (-)	Gram (+)	Gram (-)
1 Crystal violet (primary dye)				
2 Gram's iodine (mordant)				
3 Alcohol (decolorizer)				
4 Safranin (red dye counterstain)				

Gambar 6.4 Prosedur pewarnaan Gram (Talaro & Chess, 2018)

Hasil akhir pewarnaan Gram akan menunjukkan bakteri warna ungu dan merah. Bakteri yang bersifat Gram positif dinding selnya akan terwarnai dengan warna ungu kristal violet. Sedangkan, bakteri yang Gram negatif dinding selnya akan terwarnai warna merah dengan pewarna safranin (**Gambar 6.5**).

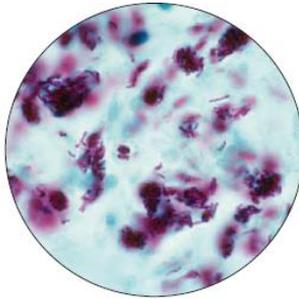


Gram stain
Purple cells are gram-positive.
Red cells are gram-negative
(1,000×).

Gambar 6.5 Hasil pewarnaan Gram bakteri (Talaro & Chess, 2018)

4. Prosedur Pewarnaan Diferensial: Pewarnaan Tahan Asam

Prosedur pewarnaan tahan asam adalah sebagai berikut: Pertama buatlah preparat ulas. Selanjutnya berikan larutan zat warna primer yaitu larutan karbol fukhsin. Setelah apusan tergenangi pewarna panaskan di atas api selama lima menit, jangan sampai mendidih atau terlalu kering. Setelah lima menit, dinginkan kaca objek. Kaca objek yang sudah dingin dapat dibilas dengan air mengalir, sampai air bilasan bersih. Lanjutkan dengan dekolorasi dengan alkohol asam, teteskan asam alkohol pada kaca objek. Lakukan sampai air bilasan mengandung sedikit warna merah karbol fukhsin. Setelah itu bilas dengan air mengalir. Berikan laurat zat warna tandingan, *methylene blue*, diamkan selama dua menit. Bilas dengan air mengalir. Tiriskan dan keringkan kaca objek, setelah kering amati dengan mikroskop (**Gambar 6.6**).

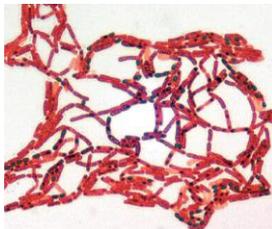


Gambar 6.6. Hasil pewarnaan tahan asam. Sel bakteri tahan asam berwarna merah (Talaro & Chess, 2018).

5. Prosedur Pewarnaan Diferensial: Pewarnaan Spora

Metode pewarnaan spora Schaeffer-Fulton menggunakan dua pewarna. Pewarna utama hijau malasit (green malachite) dan pewarna tandingan safranin. Hasil akhir pewarnaan akan menunjukkan endospora berwarna warna hijau malasit, sehingga tampak hijau (kadang-kadang sedikit kebiruan), dan sel vegetatif akan berwarna merah kecokelatan atau merah muda seperti pada **Gambar 6.7** (Brown & Smith, 2017; Cappuccino & Welsh, 2017).

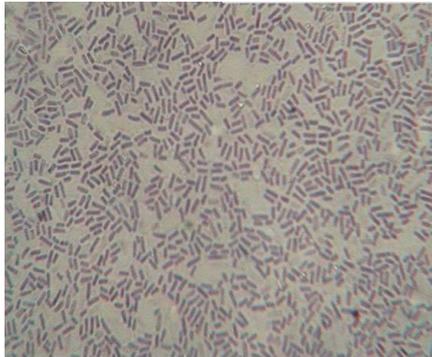
Metode pewarnaan spora Schaeffer-Fulton adalah sebagai berikut (Brown & Smith, 2017) Pertama siapkan apusan bakteri, fiksasi dan biarkan kering udara. Teteskan pewarna utama hijau malasit, panaskan di atas uap air mendidih selama lima menit. Selanjutnya bilas dengan air bersih selama 30 detik. Lanjutkan dengan meneteskan pewarna safranin selama 30 detik. Terakhir bilas dengan air bersih, keringkan dengan kertas serap. Periksa preparate pada perbesaran 1000x, tambahkan minyak imersi.



Gambar 6.7 Hasil pewarnaan spora Schaeffer-Fulton (Brown & Smith, 2017).

6. Prosedur Pewarnaan Diferensial: Pewarnaan Kapsul

Prosedur pewarnaan kapsul sangat beraneka ragam. Prosedur pewarnaan yang akan dibahas adalah pewarnaan kapsul metode Anthony. Prosedur ini menggunakan larutan tembaga sulfat sebagai pembilas. Pertama buatlah preparat ulas tanpa difiksasi panas, biarkan kering udara. Selanjutnya beri larutan zat warna primer, larutan kristal ungu selama dua menit. Lanjutkan dengan membilas preparat dengan larutan tembaga sulfat (20%). Tiriskan dan keringkan kaca objek, setelah kering amati dengan mikroskop. Hasil pewarnaan kapsul akan menunjukkan tubuh bakteri berwarna ungu. Kapsul akan nampak transparan berwarna ungu tipis atau kebiruan. Latar akan nampak berwarna ungu tipis (**Gambar 6.8**)



Gambar 6.8 Hasil pewarnaan kapsul pada *Clostridium perfringens* (Sikander et al., 2017)

DAFTAR PUSTAKA

- Ahern, H. (2018a). Differential Staining Techniques. *Microbiology: A Laboratory Experience*, 49–57.
- Ahern, H. (2018b). *Differential Staining Techniques – Microbiology: A Laboratory Experience*.
<https://milnepublishing.geneseo.edu/suny-microbiology-lab/chapter/differential-staining-techniques/>
- Brown, A. E., & Smith, Heidi. (2017). *Benson's microbiological applications, laboratory manual in general microbiology*. McGraw-Hill Education.
- Cappuccino, J. G., & Welsh, C. (2017). *Microbiology, A Laboratory Manual*. In *Pearson Education Limited*.
- Carroll, K. C., Butel, J., & Morse, S. (2019). *Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology 27 E*.
<https://books.google.com/books?id=PumOCgAAQBAJ>
- Madigan, M. T., Blener, K., Buckley, D. H., Sattley, M., & Stahl, D. A. (2021). *Brock Biology of Microorganisms, 16th Edition*. (16th ed.). Pearson Education.
- Mahon, C. R., & Lehman, D. C. (2019). *Textbook of Diagnostic Microbiology Sixth Edition*. In *Laboratory Medicine* (6th ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1309/u0mb-0p7r-rrwf-4bth>
- Petersen, J., & Mclaughlin, S. (2016). *Laboratory Exercises in Microbiology: Discovering the Unseen Laboratory Exercises in Microbiology: Discovering the Unseen World Through Hands-On Investigation World Through Hands-On Investigation*.
<https://academicworks.cuny.edu>
- Petersen, J., & McLaughlin, S. (2021). *4.1: Introduction to Staining - Biology*. LibreTexts.
[https://bio.libretexts.org/Courses/North_Carolina_State_University/MB352_General_Microbiology_Laboratory_2021_\(](https://bio.libretexts.org/Courses/North_Carolina_State_University/MB352_General_Microbiology_Laboratory_2021_()

Lee)/04%3A_Staining_Techniques/4.01%3A_Introduction_t
o_Staining

- Sikander, P., Habib Wani, A., Hussain, I., Maqbool, R., Dar, P. S., India, S., Ganaie, M. Y., Wani, S. A., Wani, A. H., Hussain, I., Kashoo, Z. A., & Qureshi, S. (2017). Isolation, identification and molecular characterization of *Clostridium perfringens* from poultry in Isolation, identification and molecular characterization of *Clostridium perfringens* from poultry in Kashmir valley, India. *JOURNAL OF ENTOMOLOGY AND ZOOLOGY STUDIES*, 5(5), 409–414. <https://www.researchgate.net/publication/319651311>
- Talaro, K. P., & Chess, B. (2018). *Foundation in Microbiology, Tenth Edition* (L. Breithaup, Ed.; 10th ed.). McGraw Hill Education.

BIODATA PENULIS



Dian Rachma Wijayanti, adalah dosen pada Program Studi D-IV Teknologi Laboratorium Medis, Binawan University. Jakarta Timur. Pada tahun 2007 penulis menyelesaikan pendidikan S1 Biologi di IPB University. Penulis melanjutkan studi S2 Mikrobiologi di King Saud University dan lulus pada tahun 2010. Penulis gemar mengajar, membaca, dan menulis. Selain mengajar dan menulis buku penulis juga aktif sebagai dewan redaksi, editor dan reviewer pada beberapa jurnal nasional. Beberapa buku yang sudah diterbitkan oleh penulis antara lain Buku Ajar Biologi Molekuler, Buku Ajar Metode Penelitian, Buku Bakteriologi Untuk Mahasiswa Kesehatan, Buku Pengantar Bakteriologi, Bunga Rampai: Bakteriologi Teknologi Laboratorium Medik, dan Mikrobiologi Pangan dan Kesehatan: Prinsip dan Aplikasi. Penulis dapat dihubungi di email: drwijayanti22@gmail.com

BAB 7

Pewarnaan Sederhana

Rohayati, S.ST, M.Si

A. Pendahuluan

Pewarnaan sederhana merupakan teknik dasar dalam mikrobiologi yang meningkatkan visibilitas sel bakteri di bawah mikroskop cahaya dengan menggunakan satu pewarna bermuatan positif. Metode ini bergantung pada interaksi antara pewarna dan komponen sel bakteri yang bermuatan negatif, sehingga menghasilkan kontras yang jelas antara sel yang diwarnai dan latar belakang yang tidak berwarna. Pewarnaan sederhana menggunakan pewarna dasar seperti biru metilen atau kristal ungu, yang mengikat asam nukleat dan dinding sel bakteri karena muatan positifnya (Moyes, Reynolds, and Breakwell 2009). Teknik ini memberikan warna yang seragam pada sel bakteri, sehingga memudahkan pengamatan morfologinya di bawah mikroskop medan terang. (Shen and Zhang 2022) Tujuan utama pewarnaan sederhana adalah untuk menentukan morfologi (bentuk), ukuran, dan pengaturan sel bakteri, seperti bentuk bulat (kokus), batang (basil), atau spiral (spirillum). Teknik ini tidak memberikan informasi spesifik tentang struktur internal sel, tetapi sangat bermanfaat sebagai langkah awal untuk identifikasi mikroorganisme dalam berbagai konteks, termasuk pendidikan, penelitian, dan diagnostik klinis. (Moyes, Reynolds, and Breakwell 2009) Pewarnaan sederhana juga banyak digunakan sebagai alat pendidikan untuk memperkenalkan konsep dasar mikrobiologi dan metode laboratorium. Selain itu, teknik ini diterapkan dalam

industri dan pengendalian kualitas lingkungan, misalnya untuk mendeteksi kontaminasi mikroba dalam makanan, air, atau produk farmasi. (Ogodo et al. 2022) Penggunaannya yang cepat dan mudah menjadikannya salah satu metode paling umum dalam laboratorium mikrobiologi.

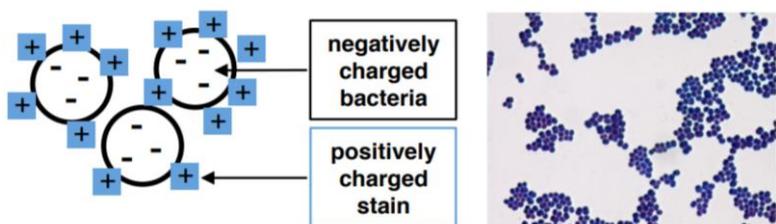
B. Jenis Pewarnaan Sederhana

Teknik pewarnaan sangat penting dalam mikrobiologi untuk memvisualisasikan sel bakteri, yang sering kali tidak berwarna dan sulit diamati di bawah mikroskop cahaya. Pewarnaan sederhana, menggunakan pewarna tunggal, memungkinkan penentuan morfologi dan susunan bakteri, sementara teknik pewarnaan diferensial memberikan wawasan yang lebih dalam tentang struktur dinding sel dan karakteristik lainnya. Metode ini, meskipun efektif untuk menentukan bentuk dan pengelompokan sel (misalnya, rantai atau kelompok), tidak memiliki kemampuan untuk memberikan informasi terperinci tentang karakteristik bakteri tertentu seperti struktur dinding sel atau keberadaan kapsul dan flagela. Pewarnaan umum yang digunakan dalam pewarnaan sederhana meliputi kristal violet, safranin, dan metilen biru (Moyes, Reynolds, and Breakwell 2009).

Apek Penting dalam Pewarnaan Sederhana

Morfologi, pewarnaan sederhana memungkinkan pengamatan bentuk bakteri (kokus, basil, spirila) dan susunan (tunggal, berpasangan, kelompok) (Moyes, Reynolds, and Breakwell 2009).

Proses Pewarnaan, proses ini melibatkan penerapan pewarna bermuatan positif yang mengikat komponen dinding sel bakteri yang bermuatan negatif, meningkatkan visibilitas di bawah mikroskop (Moyes, Reynolds, and Breakwell 2009).



Gambar 7.1 Metilen blue adalah pewarna kation mewarnai sel warna biru. Molekul bermuatan negatif (DNA & RNA) menyebabkan sel berwarna biru. Gambar kanan menunjukkan morfologi sel kokus dan susunannya berkelompok. Sumber (1.9: Simple Stain - Biology LibreTexts n.d.)

Jenis-jenis Pewarnaan

1. Pewarnaan Positif (*Positive Staining*)

Pewarnaan Positif (*Positive Staining*) adalah teknik pewarnaan mikrobiologi yang menggunakan pewarna bermuatan positif (kationik) untuk menargetkan komponen sel bakteri bermuatan negatif, seperti asam nukleat dan molekul di dinding sel. Dalam teknik ini, pewarna akan menempel langsung pada sel bakteri, sehingga bakteri terlihat berwarna dengan latar belakang tetap transparan atau tidak berwarna. Pewarna kationik, seperti metilen biru, kristal violet, dan safranin, memiliki muatan positif yang tertarik oleh muatan negatif pada permukaan bakteri. Interaksi elektrostatis ini memungkinkan pewarna menempel pada dinding sel bakteri, menghasilkan kontras yang tinggi di bawah mikroskop.

Pewarna Umum: Biru metilen, kristal violet, dan safranin merupakan pewarna kationik yang sering digunakan.

Mekanisme: Pewarna ini mengikat komponen sel bakteri yang bermuatan negatif, sehingga memungkinkan visualisasi yang jelas di bawah mikroskop (Moyes et al., 2009).

Pentingnya dalam Identifikasi

Detail Morfologi: Pewarnaan positif menonjolkan bentuk dan susunan bakteri, yang penting untuk identifikasi (Sizar & Unakal, 2019). Relevansi Klinis: Mengidentifikasi kokus gram positif, seperti *Staphylococcus* dan *Streptococcus*,

sangat penting dalam mikrobiologi klinis untuk mendiagnosis infeksi (Gillespie, 1994).

Metode Pewarnaan Alternatif

Pewarna Makanan: Penelitian terkini telah mengeksplorasi penggunaan pewarna makanan sebagai alternatif hemat biaya untuk pewarnaan bakteri, yang menunjukkan potensi efektivitasnya (Risandiansyah et al., 2020).

Meskipun pewarnaan positif banyak digunakan karena efektivitasnya dalam memvisualisasikan sel bakteri, penting untuk mempertimbangkan keterbatasan dan potensi toksisitas pewarna tradisional, yang mendorong eksplorasi alternatif yang lebih aman.

Tujuan Pewarnaan Positif

Menentukan morfologi, mengidentifikasi bentuk sel (seperti kokus, basil, atau spirillum). Mengamati susunan sel: menentukan apakah sel tersusun dalam rantai, pasangan, atau kelompok. Skrining awal dalam identifikasi, pewarnaan ini sering digunakan sebagai langkah awal untuk identifikasi mikroorganisme sebelum teknik pewarnaan lebih kompleks diterapkan, seperti pewarnaan Gram.

2. Pewarnaan Negatif (Negative Staining)

Pewarnaan negatif, termasuk teknik seperti pewarnaan tinta Cina, merupakan metode penting dalam mikrobiologi untuk memvisualisasikan struktur bakteri tanpa mengubah morfologinya. Teknik ini menggunakan berbagai zat pewarna untuk memberikan kontras terhadap latar belakang, sehingga memungkinkan pengamatan bentuk dan susunan bakteri secara mendetail. Bagian berikut menguraikan aspek-aspek utama pewarnaan negatif pada bakteri.

Pewarnaan negatif merupakan pewarnaan yang tidak menembus sel bakteri tetapi malah mewarnai latar belakang, sehingga menciptakan siluet bakteri (Nguyen et al. 2024) . Pewarna, biasanya garam uranil, mengelilingi struktur,

memberikan tampilan garis besar pada resolusi sekitar 20 Å (Nguyen et al. 2024) Dalam perbandingan antar bakteri, bakteri gram negatif seperti *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*, dapat diamati dengan baik dibandingkan dengan kokus gram positif seperti *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus pyogenes*.

Visualisasi, pewarnaan negatif sangat efektif untuk mengamati detail struktur halus, seperti dinding sel dan flagela, baik pada bakteri Gram-negatif maupun Gram-positif (Minami and Takase 2017). Pengikatan bakteri ke permukaan pewarnaan dapat mengubah strukturnya, sehingga memerlukan penanganan yang hati-hati dan protokol pewarnaan yang dioptimalkan (Nguyen et al., 2024). Reagen pewarnaan yang berbeda menghasilkan hasil yang bervariasi dalam hal kejelasan dan detail, yang menyoroti pentingnya memilih pewarna yang tepat untuk jenis bakteri tertentu (Minami and Takase 2017).

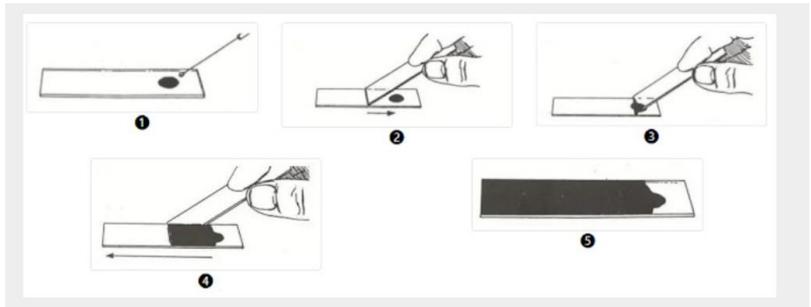


Gambar 7.2 Hasil pewarnaan negative (sumber:(Current Protocols in Microbiology 2005))

Prosedur Pewarnaan:

- a. Teteskan satu tetes kecil larutan Nigrosin pada ujung gelas obyek. Kemudian ulaskan satu ose isolat bakteri pada tetesan larutan Nigrosin hingga tercampur. Usahakan jangan terlalu menyebarkan larutan Nigrosin.
- b. Gunakan obyek gelas lainnya untuk meratakan larutan Nigrosin dengan cara meletakkannya di bagian tengah gelas obyek pertama.

- c. Tarik gelas obyek ke arah belakang hingga menyentuh larutan Nigrosin.
- d. Tarik gelas obyek ke arah depan hingga mencapai ujung gelas obyek.
- e. Tunggu ulasan hingga kering dengan sendirinya.
- f. Tutup ulasan dengan penutup gelas obyek lalu amati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000X yang telah diberi minyak imersi.



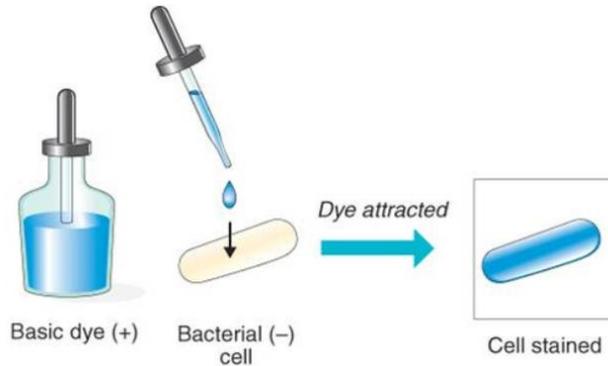
Gambar 7.3 Prosedur Pewarnaan Sederhana (Current Protocols in Microbiology 2005)

Interpretasi hasil dari pewarnaan negatif adalah sel bakteri yang terlihat saat pengamatan di bawah mikroskop adalah berwarna transparan dengan latar belakang gelap. Titik kritis prosedur ini adalah karena apusan tidak difiksasi, kemungkinan besar bakteri masih pathogen sehingga perlu di ikuti dan diterapkan protocol keselamatannya.

1) Pewarnaan Dasar (*Basic Stains*)

Beberapa teknik pewarnaan melibatkan penerapan hanya satu pewarna pada sampel; yang lain memerlukan lebih dari satu pewarna. Dalam **pewarnaan sederhana**, satu pewarna digunakan untuk menekankan struktur tertentu dalam spesimen. Pewarnaan sederhana umumnya akan membuat semua organisme dalam sampel tampak memiliki warna yang sama, bahkan jika sampel tersebut mengandung lebih dari satu jenis organisme. Pewarna dipilih untuk pewarnaan

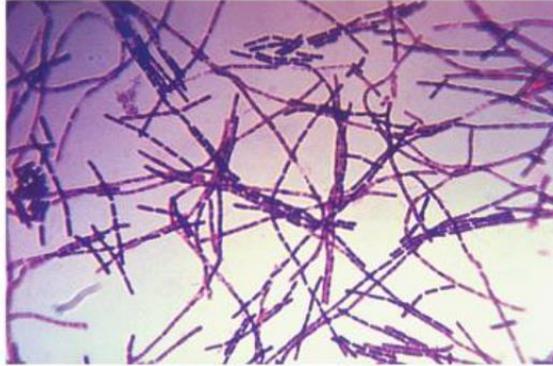
berdasarkan sifat kimia pewarna dan spesimen yang diamati, yang menentukan bagaimana pewarna akan berinteraksi dengan spesimen. Dalam kebanyakan kasus, lebih baik menggunakan pewarna **positif**, pewarna yang akan diserap oleh sel atau organisme yang diamati, menambahkan warna pada objek yang diinginkan untuk membuatnya menonjol terhadap latar belakang. Karena sel biasanya memiliki dinding sel bermuatan negatif, kromofor positif dalam pewarna basa cenderung menempel pada dinding sel, sehingga menjadi pewarna positif. Jadi, pewarna basa yang umum digunakan seperti fuchsin basa, kristal violet, hijau malachite, biru metilen, dan safranin biasanya berfungsi sebagai pewarna positif.



Gambar 7.4 Pewarnaan dasar /basic

Prosedur pewarnaan dasar/basic

1. Buatlah olesan sampel bakteri Anda yang dikeringkan di udara dan diberi panas.
2. Pewarnaan dengan pewarna dasar (methylene blue) selama 3 menit.
3. Bilas, keringkan, dan amati dengan pembesaran Total 1000x



Gambar 7.5 Contoh Pewarnaan sederhana menggunakan Kristal Violet

Interpretasi dari hasil pewarnaan dasar/basic adalah Pewarnaan positif memberikan kontras yang jelas antara bakteri yang diwarnai dan latar belakangnya, sehingga memudahkan identifikasi (Moyes et al., 2009). Interpretasi sel yang diwarnai dapat dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti ukuran dan struktur sel, yang menyebabkan kesalahpahaman tentang organisasi seluler. Meskipun pewarnaan sederhana merupakan metode untuk memvisualisasikan sel, penting untuk mengenali keterbatasannya dan potensi salah interpretasi, terutama dalam struktur seluler yang kompleks.

C. Aplikasi Pewarnaan Sederhana dalam Diagnostik

Penerapan teknik pewarnaan sederhana dalam diagnostik berperan penting dalam mengidentifikasi berbagai patogen dan struktur seluler. Metode ini dicirikan oleh kemudahan penggunaan, hasil yang cepat, dan efektivitas dalam meningkatkan visibilitas komponen tertentu dalam sampel biologis. Pewarnaan sederhana melibatkan penggunaan pewarna bermuatan positif untuk mewarnai sel bakteri, sehingga lebih mudah untuk mengamati detail seluler (Moyes et al., 2009). Pewarnaan Sederhana (Pewarnaan Dasar), menggunakan zat pewarna basa (pewarna dasar) seperti metilen

biru, kristal violet, atau safranin, yang bermuatan positif dan berinteraksi dengan dinding sel bakteri yang bermuatan negatif.

Aplikasi dalam diagnostic:

1. Identifikasi Morfologi Bakteri, seperti bentuk bakteri (kokus, basil, spiral), susunan bakteri (berantai, berkelompok, tunggal).
2. Pemeriksaan cepat spesimen klinis, misalnya, mendeteksi bakteri di dahak pasien untuk skrining awal penyakit seperti tuberkulosis.,
3. Mengevaluasi Keberhasilan Kultur, untuk memastikan bakteri tumbuh di medium kultur sebelum dilakukan pengujian lebih lanjut.

Pewarnaan negatif menggunakan zat pewarna asam (pewarna asam) seperti nigrosin atau tinta Cina, yang tidak menempel pada bakteri, tetapi mewarnai latar belakang. Bakteri akan tampak transparan dengan latar belakang gelap.

Deteksi Kapsul:

1. Mengidentifikasi bakteri berkapsul seperti *Klebsiella pneumoniae* atau *Streptococcus pneumoniae*. Kapsul terlihat sebagai area transparan di sekitar bakteri.

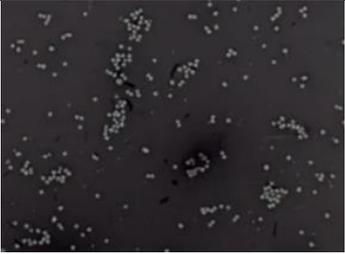
2. Pengamatan Bakteri yang Rentan Terhadap Pewarnaan:

Contohnya *Treponema pallidum* (penyebab sifilis), yang sulit diwarnai dengan pewarnaan konvensional. Tidak merusak struktur bakteri karena tidak menggunakan panas (tidak ada fiksasi panas).

Tabel 7.1 Pewarnaan sederhana

Nama Pewarnaan	Jenis Pewarna	Tujuan	Hasil
Dasar	Metilen Blue, Kristal Violet, Malachit green, Fuchsin,	Pewarnaan molekul dan struktur bermuatan negatif	Bakteri terwarnai seluruhnya sehingga terlihat bentuknya



Negatif	Tinta India, Nigrosin	Mewarnai latar belakang, bukan spesimen	Latar belakang gelap, specimen terang (kontras)	
---------	-----------------------	---	---	--

1. Kelebihan dan Kekurangan Pewarnaan Sederhana

Dalam konteks teknik pewarnaan sederhana, pewarnaan dasar dan pewarnaan negatif memiliki tujuan utama untuk meningkatkan visibilitas mikroorganisme patogen. Namun, masing-masing metode memiliki kelebihan dan kekurangan yang memengaruhi penerapannya dalam studi mikrobiologi:

Pewarnaan sederhana

- **Kelebihan:** Dapat digunakan untuk membedakan sel target dari sel lain, mengukur ukuran sel, dan memeriksa morfologi dan struktur sel. Pewarnaan dasar menggunakan pewarna bermuatan positif yang menempel pada sel bakteri bermuatan negatif, sehingga menghasilkan kontras dan detail yang jelas (Moyes, Reynolds, and Breakwell 2009). Prosesnya mudah dan cepat, sehingga cocok untuk penilaian cepat keberadaan mikroba
- **Kekurangan:** Hanya memberikan informasi terbatas tentang ciri morfologi saja, sehingga tidak membantu dalam mengidentifikasi klasifikasi bakteri. Pewarnaan dasar mungkin tidak memberikan wawasan struktural yang terperinci, karena pewarnaan ini terutama menyoroti permukaan sel tanpa memperlihatkan fitur internal (Moyes, Reynolds, and Breakwell 2009). Proses pewarnaan dapat mengubah morfologi alami sel, yang menyebabkan kesalahan interpretasi hasil.

Pewarnaan negative

- **Kelebihan:** Dapat melihat bakteri dalam keadaan paling murni, tanpa gangguan pewarna. Pewarnaan negatif juga dapat digunakan untuk memeriksa karakteristik morfologi bakteri dan virus, terutama pada spesies yang sulit diwarnai. Pewarnaan negatif meningkatkan visibilitas partikel kecil, seperti virus dan makromolekul, dengan memberikan latar belakang gelap yang membuat spesimen menonjol (Hendricks, Sena-Esteves, and Gao 2020) (Chambers 2020). Metode ini sering kali mempertahankan morfologi alami struktur halus, sehingga memungkinkan representasi bentuk aslinya dengan lebih baik (Nguyen et al. 2024)
- **Kekurangan:** Keterbatasan utama teknik ini adalah akibat dari langkah pengeringan udara. Teknik ini memerlukan penanganan yang hati-hati, karena paparan substrat yang terlalu lama dapat mengganggu struktur sensitif (Nguyen et al., 2024). Terbatas pada Spesimen Tertentu: Pewarnaan negatif kurang efektif untuk jenis sampel tertentu yang tidak melekat dengan baik pada lapisan pendukung atau terlalu fleksibel (Hendricks et al., 2020).

2. Update Teknologi di bidang Pewarnaan Sederhana

Pembaruan teknologi dalam teknik pewarnaan sederhana dalam mikrobiologi telah memperkenalkan metode inovatif yang meningkatkan efisiensi, mengurangi limbah, dan meningkatkan visualisasi. Kemajuan terkini berfokus pada pemanfaatan sistem mikrofluida, pewarna baru, dan volume reagen yang dikurangi, yang secara kolektif menyederhanakan proses pewarnaan sambil mempertahankan akurasi.

Pewarnaan Terbaru

Teknik Pewarnaan Mikro, pendekatan ini menggunakan volume reagen mikroliter, yang secara signifikan meminimalkan limbah berbahaya dan biaya sambil menghasilkan hasil yang sebanding dengan metode tradisional (Siguenza et al. 2019).

Chip Mikrofluida yang Digerakkan Secara Magnetik, metode baru menggunakan teknologi mikrofluida untuk pewarnaan sederhana, yang memungkinkan pewarnaan yang murah dan efisien dengan pengurangan limbah beracun (Kosker, Aydin, and Icoz 2022).

Reagen Pewarna Baru dan Aplikasinya

Pewarna Karbosiyanin Kationik, pewarna ini menunjukkan metakromasia, yang memungkinkan pewarnaan yang berbeda pada berbagai mikroorganisme, termasuk bakteri Gram-negatif dan Gram-positif, sehingga meningkatkan identifikasi melalui mikroskop fluoresensi (Umeda 1987).

Pewarna edible dan tidak beracun terhadap mikroorganisme, sebuah metode yang menggunakan pigmen yang dapat dimakan yang tidak beracun untuk pewarnaan mikroorganisme telah dikembangkan, yang menyediakan alternatif yang aman dan efektif (Rasooly 2013).

DAFTAR PUSTAKA

- "1.9: Simple Stain - Biology LibreTexts."
[https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_Laboratory_Manual_\(Hartline\)/01%3A_Labs/1.09%3A_Simple_Stain](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_Laboratory_Manual_(Hartline)/01%3A_Labs/1.09%3A_Simple_Stain) (November 26, 2024).
- Chambers, Melissa. 2020. "Negative Stain of Small Molecules and Protein Complexes." *Microscopy and Microanalysis* 26(S2): 2092–2092. doi:10.1017/S1431927620020413.
- "Current Protocols in Microbiology." 2005. *Current Protocols in Microbiology*. doi:10.1002/9780471729259.
- Hendricks, Gregory, Miguel Sena-Estevés, and Guangping Gao. 2020. "Analysis of Recombinant Adeno-Associated Virus (RAAV) Sample Morphology Using Negative Staining and High-Resolution Electron Microscopy." *CSH Protocols* 2020(8): 095661. doi:10.1101/PDB.PROT095661.
- Kosker, Fatma Betül, Omer Aydin, and Kutay Icoz. 2022. "Simple Staining of Cells on a Chip." *Biosensors* 12(11): 1013–1013. doi:10.3390/BIOS12111013.
- Minami, Masaaki, and Hiroshi Takase. 2017. "Comparative Investigation of Alternative Negative Staining Reagents in Bacterial Morphological Study." *Journal of Biosciences and Medicines* 05(10): 17–24. doi:10.4236/JBM.2017.510002.
- Moyes, Rita B., Jackie Reynolds, and Donald P. Breakwell. 2009. "Preliminary Staining of Bacteria: Simple Stains." *Current protocols in microbiology* 15(1). doi:10.1002/9780471729259.MCA03ES15.
- Nguyen, Vu, Arun Kumar Somavarapu, Ruchi Gautam Sharma, Debabrata Dutta, Roger Craig, and Raul Padron. 2024. "A Rapid Automated System for Negative Staining EM." *Biophysical Journal* 123(3): 132a–33. doi:10.1016/J.BPJ.2023.11.916.

- Ogodo, Alloysius Chibuikwe, Dawn Ify Agwaranze, Morumda Daji, and Rufus Emamoge Aso. 2022. "Microbial Techniques and Methods: Basic Techniques and Microscopy." *Analytical Techniques in Biosciences: from Basics to Applications*: 201–20. doi:10.1016/B978-0-12-822654-4.00003-8.
- Rasooly, Reuven. 2013. "Method for Staining Microorganisms." *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 49(2): 261–65. doi:10.1111/J.1574-695X.2007.00188.X.
- Shen, Cangliang, and Yifan Zhang. 2022. "Preparation of Smears and Simple Stain Practice." *Introductory Microbiology Lab Skills and Techniques in Food Science*: 11–16. doi:10.1016/B978-0-12-821678-1.00014-9.
- Siguenza, Nicole, Aditya Jangid, E. Brandon Strong, John Merriam, Andres W. Martinez, and Nathaniel W. Martinez. 2019. "Micro-Staining Microbes: An Alternative to Traditional Staining of Microbiological Specimens Using Microliter Volumes of Reagents." *Journal of Microbiological Methods* 164: 105654–105654. doi:10.1016/j.mimet.2019.105654.
- Umeda, Masaru. 1987. "A Simple Metachromatic and Fluorescent Staining Method for Microorganisms Using Carbocyanine Dye." *Microbiology and Immunology* 31(2): 113–21. doi:10.1111/J.1348-0421.1987.TB03074.X.

BIODATA PENULIS



Rohayati, M.Si. lahir di kabupaten Bandung, pada 13 Sreptember 1981. Jenjang Pendidikan D 3 dan D4 TLM ditempuh di Poltekkes Kemenkes Bandung, lulus tahun D4 tahun 2011. Pendidikan S2 Farmasi ITB, lulus tahun 2014 dan sedang on going S3 Farmasi ITB dari tahun 2021. Saat ini sebagai Dosen di Jurusan Teknologi laboratorium Medis Poltekkes

Kemenkes Bandung. Beberapa buku chapter yang sudah di terbitkan Buku Bakteriologi 1, Bakteriologi 2, Bakteriologi 3, Mikrobiologi Kesehatan, Immunologi, Panduan Kingdraw Sebagai Media Pembelajaran Kimia, Toksikologi Klinik. Korespondensi bisa lewat email atau hp, E-mail : rohayati.tlm@staff.poltekkesbandung.ac.id No HP : 081511299772

BAB 8

Pewarnaan Gram

* Rima Agnes Widya Astuti, S.Tr.AK., M.Kes. *

A. Pendahuluan

Pewarnaan Gram merupakan teknik pewarnaan yang paling penting dalam bidang mikrobiologi. Pewarnaan Gram adalah salah satu jenis pewarnaan diferensial yang dapat membantu mengidentifikasi spesies bakteri. Pewarnaan Gram pertama kali diperkenalkan pada tahun 1884 oleh seorang ahli bakteriologi asal Denmark, Hans Christian Gram pada saat mengidentifikasi organisme penyebab pneumonia (Cowan et al., 2022; Kenneth et al., 2022).

Pewarnaan Gram juga memungkinkan penentuan morfologi dan susunan sel. Pewarnaan ini biasanya merupakan uji diferensial pertama yang digunakan pada spesimen yang dibawa ke laboratorium untuk identifikasi. Pada pewarnaan Gram bakteri dikelompokkan menjadi dua yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Membedakan antara bakteri Gram positif dan Gram negatif sangat penting terutama dalam menentukan pengobatan atau terapi antibiotik akibat infeksi bakteri. (Cowan et al., 2022).

Prinsip Dasar Pewarnaan Gram

Struktur, komponen, dan fungsi (Tabel 8.1) dinding sel pada bakteri Gram positif dari bakteri Gram negatif memiliki perbedaan. Perbedaan penting pada dinding sel bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif dapat dilihat dalam Tabel 8.2. Perbedaan paling utama bakteri Gram positif dan Gram negatif adalah pada peptidoglikan (Murray et al., 2021; Vijayakumar et al., 2023).

Tabel 8.1 Struktur Dinding Sel Bakteri Gram Positif dan Negatif

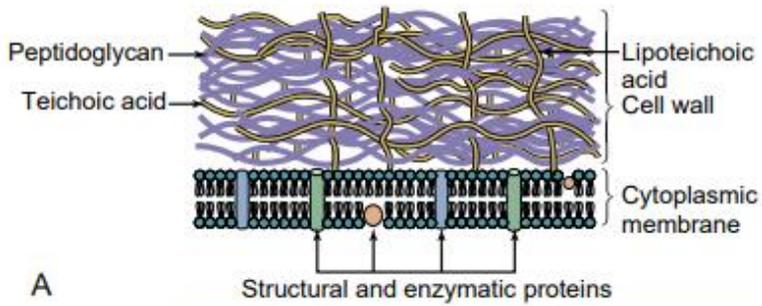
Tabel 8.2 Pebandingan Bakteri Gram Postif dan Negatif

Struktur Dinding Sel	Komponen Kimia	Fungsi
Bakteri Gram Positif		
Peptidoglikan	Beberapa lapisan rantai glikana GlcNAc dan MurNAc saling terikat oleh jembatan peptida	Bentuk dan struktur sel; perlindungan dari lingkungan dan pembunuhan komplemen
Asam Teikoat	Poliribitol fosfat atau gliserol fosfat terikat silang dengan peptidoglikan	Memperkuat dinding sel; penyerapan ion kalsium
Asam Lipoteikoat	Asam teikoat yang terikat lipid	Aktivator perlindungan host bawaan
Protein	Terikat pada peptidoglikan atau asam teikoat	Menghindari sistem imun, adhesi, dll.
Bakteri Gram Negatif		
Peptidoglikan	Lebih tipis dari yang ditemukan pada bakteri Gram positif	Bentuk dan struktur sel
Ruang Periplasma	Protein pengangkut, enzim	Enzim yang terlibat dalam pengangkutan, degradasi, dan sintesis
Membran Luar	Fosfolipid, Lipopolisakarida, protein, enzim	Struktur sel; perlindungan dari lingkungan inang
Protein	Saluran porin Alat sekretori (tipe I-V)	Permeasi molekul hidrofilik kecil; membatasi beberapa antibiotik Menembus dan mengirimkan protein melintasi membran, termasuk virulensi
Karakteristik	Gram Positif	Gram Negatif

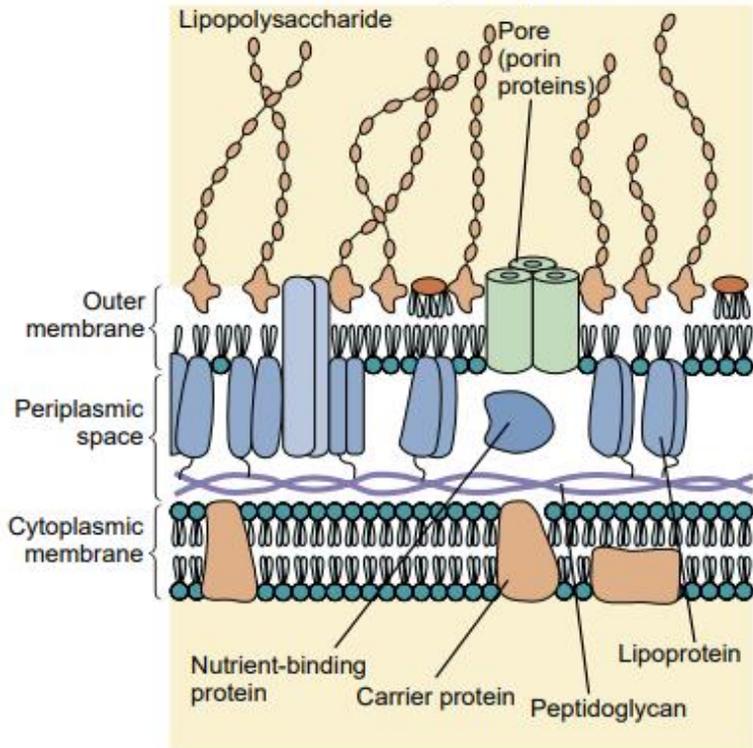
Lipopolisakarida	Lipoprotein Lemak A, polisakarida inti, antigen O	Penghubung membran luar ke peptidoglikan Struktur membran luar; perlindungan, Aktivator respons host bawaan
Fosfolipid	Dengan asam lemak jenuh	Struktur
Membran luar	Tidak ada	Ada
Membran sel	Tebal	Tipis
Peptidoglikan	Tebal	Tipis
Lipopolisakarida	Tidak ada	Ada
Kandungan lemak	Rendah	Tinggi
Ruang periplasma	Tidak ada	Ada
Endotoksin	Tidak ada	Ada
Asam teikoat	Ada	Tidak ada
Saluran porin	Tidak ada	Ada
Lisozim	Sensitif	Resisten
Aktivitas antibakteri penisilin	Lebih rentan	Lebih resisten

Bakteri Gram positif memiliki dinding sel tebal berlapis-lapis. Dinding sel bakteri Gram positif sebagian besar tersusun dari peptidoglikan yang mengelilingi membran sitoplasma (**Gambar 8.1** dan **Gambar 8.2**). Peptidoglikan adalah rangka luar seperti jaring yang cukup berpori, berfungsi untuk memungkinkan difusi metabolit ke membran plasma (Cowan et al., 2022; Kenneth et al., 2022; Murray et al., 2021).

Peptidoglikan sangat penting untuk struktur, replikasi, dan kelangsungan hidup bakteri dalam kondisi yang biasanya tidak bersahabat untuk bakteri tumbuh. Peptidoglikan dapat didegradasi oleh lisozim. Lisozim adalah enzim dalam air mata dan lendir manusia, tetapi juga diproduksi oleh bakteri dan organisme lain. Tanpa peptidoglikan, bakteri tidak akan tahan pada perbedaan tekanan osmotik yang besar di seluruh membran sitoplasma dan mengalami lisis (Murray et al., 2021).

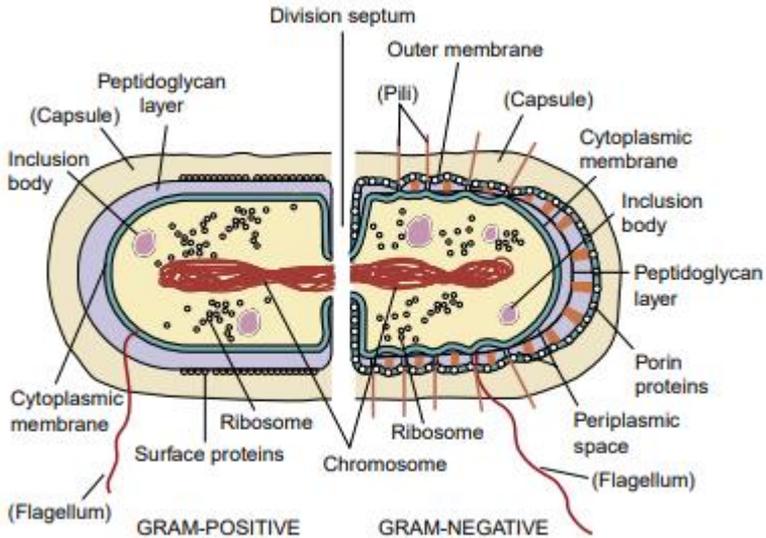


A



B

Gambar 8.1 Perbandingan dinding sel bakteri Gram positif dan Gram negatif. (A) Bakteri Gram positif. (B) Bakteri Gram negatif (Murray et al., 2021).



Gambar 8.2 Perbandingan dinding sel bakteri Gram positif dan Gram negatif (Murray et al., 2021).

Terdapat empat komponen pewarnaan Gram yaitu pewarna primer, mordan, dekolorisasi atau penghilang warna, dan pewarna sekunder atau pewarna tandingan.

1. Pewarna primer adalah pewarna dasar bermuatan positif yang mengandung kromatofora. Pewarna dasar ini mewarnai semua sel bakteri sebagai hasil dari daya tarik antara kromatofora dan bakteri. Beberapa pewarna dasar yang dapat digunakan sebagai pewarna primer adalah kristal violet, metil violet, dan gentian violet.
2. Mordan yaitu larutan iodium yang bertindak sebagai mordan dan ditambahkan untuk meningkatkan afinitas antara bakteri dan pewarna. Mordan adalah zat yang digunakan untuk mengikat atau menstabilkan pewarna. Zat ini membentuk kompleks dengan kristal violet (kristal violet-iodium), zat yang tidak larut dalam sitoplasma, dan dengan demikian mengikat pewarna dengan sel bakteri. Biasanya menggunakan larutan iodium atau lugol.

3. Penghilang warna atau dekolorisasi merupakan zat yang menghilangkan pewarna primer dari sel yang diwarnai. Aseton adalah larutan penghilang warna yang paling cepat digunakan, etanol juga bisa digunakan, biasanya larutan yang digunakan sebagai penghilang warna adalah aseton alkohol.
4. Pewarna sekunder atau pewarna pembanding adalah zat pewarna dasar dengan warna kontras terhadap pewarna primer. Safranin dan karbol fuchsin, dapat digunakan sebagai pewarna sekunder (Miller, 2024; Miraglia, 2024; Vijayakumar et al., 2023)

Pada pewarnaan Gram ketika bakteri yang diwarnai berwarna ungu disebut sebagai bakteri gram Positif, dan ketika bakteri yang diwarnai berwarna merah disebut sebagai bakteri gram Negatif. Hasil yang berbeda warna dalam pewarnaan Gram disebabkan oleh perbedaan struktur dinding sel bakteri dan bagaimana dinding sel bakteri bereaksi terhadap serangkaian komponen pewarnaan Gram yang diaplikasikan pada sel bakteri. Bakteri Gram positif karena memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal yang mengandung asam teikoat dan lipoteikoat sehingga menyerap dengan kuat pewarna primer dan ketika diberikan penghilang warna, dinding sel masih tetap menyerap pewarna primer, sehingga ketika diberikan pewarna sekunder dinding sel tidak bisa terwarnai karena telah menyerap pewarna primer terlebih dahulu. Berbeda dengan bakteri Gram negatif yang memiliki lapisan peptidoglikan tipis dan membran luar yang mengandung lipopolisakarida, fosfolipid, dan protein ketika diberikan penghilang warna, pewarna primer pada dinding sel akan luntur dan menyerap pewarna sekunder sehingga bakteri berwarna merah (Gambar 8.3 dan Gambar 8.4) (Cowan et al., 2022; Kenneth et al., 2022; Lee, 2021; Li et al., 2020; Murray et al., 2021; Pakpour & Horgan, 2024; Vijayakumar et al., 2023)

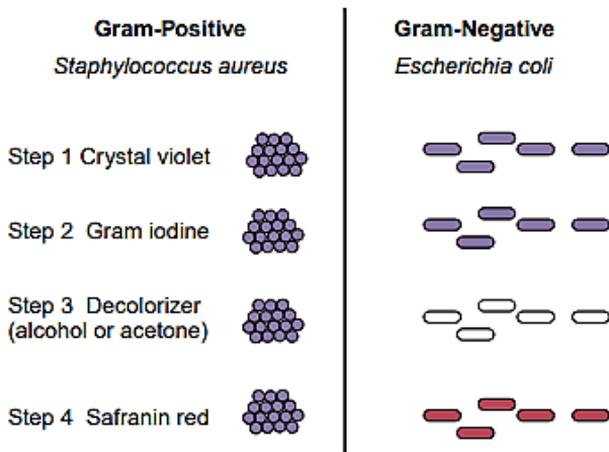
Tahapan Pewarnaan Gram

Hal yang harus dilakukan sebelum melakukan pewarnaan Gram adalah fiksasi apusan. Fiksasi dilakukan sebelum pewarnaan untuk membunuh mikroorganisme dengan mengentalkan protoplasma sel dan agar apusan melekat pada kaca objek, sehingga

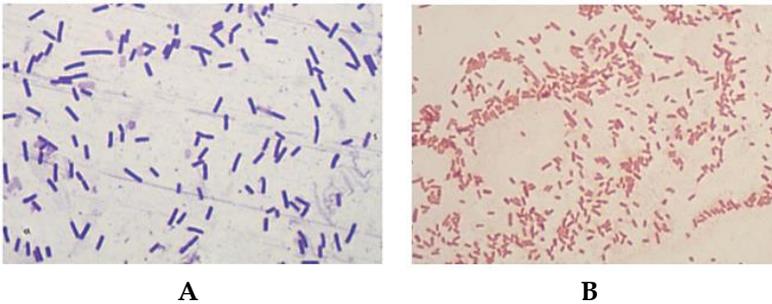
sampel dapat segera diwarnai. Fiksasi dapat dilakukan dengan memegang kaca objek 3-5 kali selama 3-4 detik di atas api bunsen, atau dengan membiarkan kaca objek mengering di udara selama 15-30 menit (Vijayakumar et al., 2023).

Prosedur pewarnaan Gram terdapat beberapa tahapan antara lain:

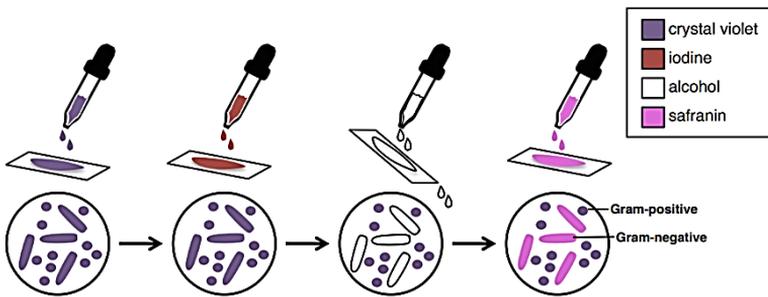
1. Apusan harus diwarnai dengan kristal violet selama 1 menit, setelah itu pewarna yang tersisa dibuang dan dibilas dengan air mengalir.
2. Iodin atau lugol ditambahkan ke apusan dan didiamkan selama 1 menit, kelebihan pewarna dibuang, dan dibilas dengan air mengalir.
3. Apusan ditambahkan alkohol atau aseton selama 30 detik sehingga terjadi dekolorisasi. Apusan dicuci dengan air mengalir hingga bersih.
4. Terakhir, apusan diwarnai tandingan atau dengan pewarna sekunder dengan karbol fuchsin atau safranin selama 30 detik dan dicuci dengan air mengalir.
5. Apusan dikeringkan dan dilihat di bawah mikroskop menggunakan minyak imersi dengan perbesaran 1000x, seperti pada **Gambar 8.5** (Pakpour & Horgan, 2024; Vijayakumar et al., 2023).



Gambar 8.3 Pewarnaan Gram bakteri Gram positif dan Gram negatif (Murray et al., 2021)



Gambar 8.4 Hasil pewarnaan Gram bakteri Gram positif (A) dan Gram negatif (B) (Miraglia, 2024)



Gambar 8.5 Prosedur pewarnaan Gram (Pakpour & Horgan, 2024)

Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Hasil Pewarnaan Gram

Faktor yang mempengaruhi pewarnaan Gram antara lain:

1. Usia kultur bakteri: Kultur dengan sel yang lebih tua (yang telah ada selama lebih dari 24 jam) menyebabkan sel tampak Gram-negatif.
2. Panas: Panas yang berlebihan selama fiksasi dapat menyebabkan kerusakan dinding sel. Mikroorganisme Gram-positif akan menyerupai mikroorganisme Gram-negatif.
3. Kepadatan sel: Kepadatan sel dapat menyebabkan dekolonisasi yang tidak tepat, yang berdampak pada proses pewarnaan Gram. Apusan tipis berubah warna lebih cepat daripada apusan tebal saat sel penuh dan banyak, yang memicu perubahan warna.

4. Kesalahan dalam membaca interpretasi hasil (Gram positif dibaca sebagai Gram negatif dan sebaliknya).
5. Kultur campuran.
6. Dekolorisasi berlebihan (McDonough, 2021; Vijayakumar et al., 2023).

Kesalahan Umum yang Sering Terjadi pada Pewarnaan Gram

1. Konsentrasi kristal violet rendah: Konsentrasi kristal violet hingga 2% efektif, tetapi pada tingkat yang lebih rendah, sel yang diwarnai tampak mengalami dekolorisasi relatif cepat.
2. Pencucian berlebihan: Air cenderung menghilangkan pewarna kristal violet (tetapi bukan kompleks kristal violet-iodin). Jangan membilas apusan lebih dari 5 detik setiap kali melakukan prosedur.
3. Paparan iodium tidak mencukupi: Jumlah mordan yang diperlukan untuk pembentukan kompleks kristal violet-iodin sangat berpengaruh. Konsentrasi yang lebih rendah (biasanya digunakan 0,33%- 1%) lebih mudah mengalami dekolorisasi. Selain itu, paparan udara dan suhu tinggi mempercepat hilangnya iodium Gram dari larutan, sehingga kontrol kualitas reagen menjadi penting.
4. Dekolorisasi yang lebih lama: Dekolorisasi terlalu lama menyebabkan kesalahan interpretasi dalam pewarnaan Gram.
5. Pewarnaan tandingan yang berlebihan: Setelah terpapar pewarna tandingan yang merupakan pewarna basa secara berlebihan, ada kemungkinan kompleks kristal violet-iodin dalam sel Gram positif akan digantikan oleh pewarna tandingan. Pewarna tandingan tidak boleh dibiarkan pada apusan lebih dari 30 detik (Vijayakumar et al., 2023).

Aplikasi Pewarnaan Gram

1. Membedakan bakteri Gram-positif dan Gram-negatif merupakan langkah pertama dalam identifikasi bakteri yang dapat digunakan untuk memilih uji biokimia yang sesuai untuk digunakan lebih lanjut guna konfirmasi.
2. Pewarnaan Gram dapat digunakan untuk menetapkan keberadaan infeksi dan mengidentifikasi etiologi mikrobiologis.

3. Pewarnaan Gram membantu dalam identifikasi awal organisme yang sulit seperti *Haemophilus* yang memerlukan waktu untuk tumbuh dalam kultur.
4. Pewarnaan Gram memberikan petunjuk awal tentang mikroorganisme yang ada sehingga pengobatan empiris dengan antibiotik spektrum luas dapat dimulai bahkan sebelum laporan kultur tersedia.
5. Pewarnaan Gram dapat digunakan untuk menyaring kualitas spesimen klinis seperti dahak yang seharusnya mengandung banyak sel nanah dan sedikit sel epitel.
6. Pewarnaan Gram juga membantu dalam mengidentifikasi jamur tertentu seperti *Candida* dan *Cryptococcus* yang tampak sebagai Gram-positif (Vijayakumar et al., 2023).

DAFTAR PUSTAKA

- Cowan, M. K., Smith, H., & Lusk, J. (2022). *Microbiology Fundamentals A Clinical Approach*.
- Kenneth, J. R., Ahmad, N., Alspaugh, J. A., Drew, W. L., Pottinger, P., Reller, L. B., Reller, M. E., Steinbrink, J. M., Sterling, C. R., Vedantam, G., & Weissman, S. (2022). *Medical Microbiology*.
- Lee, A. (2021). *Mb352 General Microbiology Laboratory 2021*.
<https://libretexts.org>
- Li, H., Li, L., Chi, Y., Tian, Q., Zhou, T., Han, C., Zhu, Y., & Zhou, Y. (2020). Development Of A Standardized Gram Stain Procedure for Bacteria and Inflammatory Cells using An Automated Staining Instrument. *MicrobiologyOpen*, 9(9), 1-10.
<https://doi.org/10.1002/mbo3.1099>
- McDonough, C. (2021). Assessing Gram-Stain Error Rates within The Pharmaceutical Microbiology Laboratory. *European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Sciences*, 25(1), 1-7.
<https://doi.org/10.37521/ejpps>
- Miller, E. (2024). *Microbiology Laboratory Manual*.
- Miraglia, S. (2024). *Microbiology Lab Manual*.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2021). *Medical Microbiology*.
<http://evolve.elsevier.com/Murray/microbiology/>
- Pakpour, N., & Horgan, S. (2024). *General Microbiology Lab Manual*.
- Vijayakumar, T., Divya, B., Vasanthi, V., Narayan, M., Kumar, A. R., & Krishnan, R. (2023). Diagnostic Utility of Gram Stain for Oral Smears - A Review. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 11(3), 130-134. https://doi.org/10.4103/jmau.jmau_108_22

BIODATA PENULIS



Rima Agnes Widya Astuti, S.Tr.AK., M.Kes. lahir di Pangkalan Bun, Kalimantan Tengah pada tanggal 11 September 1995. Pada tahun 2017 lulus Diploma IV Analis Kesehatan dari Poltekkes Banjarmasin. Melanjutkan magister pada Program Studi Sains Laboratorium Medis atau Ilmu Laboratorium Klinis di Universitas Muhammadiyah Semarang dan lulus pada tahun 2023. Saat ini aktif menjadi dosen pada Program Studi Diploma III Analis Kesehatan di Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Borneo Cendekia Medika, Pangakalan Bun dari tahun 2023.

BAB 9

Pewarnaan Ziehl Neelsen

* Fera Sartika, S.KM., M.Si *

A. Pewarnaan Ziehl Neelsen

Pewarnaan ziehl neelsen adalah suatu metode pewarnaan yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri asidorezisten (tahan asam) seperti *Mycobacterium* termasuk *Mycobacterium tuberculosis* dan *Mycobacterium Leprae*. metode ini pertama kali diperkenalkan oleh Paul Ehrlich pada tahun 1882 kemudian dikembangkan oleh Franz Ziehl dan Friedrich Neelsen pada akhir abad ke 19 . Ziehl mencoba menggunakan pewarnaan karbol fuksin untuk mengidentifikasi bakteri asidorezisten dalam sampel jaringan tubuh manusia. seorang ilmuwan Jerman lainnya, kemudian mengembangkan metode ini lebih lanjut dengan memperkenalkan penggunaan pemanasan dalam proses pewarnaan. Neelsen menemukan bahwa pemanasan membantu dalam menembus dinding sel bakteri yang keras, yang memungkinkan pewarnaan lebih efektif. Metode ini kemudian dikenal dengan pewarnaan Ziehl Neelsen. Pewarnaan ini termasuk pewarnaan diferensial, karena dapat membedakan bakteri yang tahan asam (tahan pencucian asam) atau *acid fast*, dan bakteri yang tidak tahan asam (tidak tahan terhadap pencucian asam).

Prinsip Dasar Pewarnaan Ziehl-Neelsen adalah pemanfaatan panas untuk membantu pewarnaan bakteri yang tahan asam. Langkah-langkah dalam prosedur ini mengandalkan prinsip bahwa bakteri yang memiliki dinding sel yang mengandung asam mycolic akan tetap mempertahankan warna setelah dilakukan pencucian dengan alkohol asam.

Pewarnaan ini untuk bakteri seperti *Mycobacterium*, *Actinomyces* dan genus *Nocardia* yang dinding selnya mengandung lipida dalam jumlah yang tinggi, pada beberapa spesies dapat mencapai 60% dari berat dinding sel. Kandungan lipida yang tinggi menyebabkan sel bakteri sulit untuk diwarnai, dan membuatnya lebih tahan terhadap dekolonisasi dengan alkohol atau asam setelah pewarnaan awal (Karbolfuksin). Oleh sebab itu bakteri ini akan mempertahankan warna merah cerah dari karbolfuksin setelah diberikan larutan asam atau alkohol.

Pewarnaan Ziehl Neelsen, terdiri dari *Carbol fuchin* (karbolfuksin), asam Alkohol dan *Methylen Blue*. Zat warna pertama adalah Carbol fuchin yaitu fuksin basa yang dilarutkan dalam fenol 5%. Fenol digunakan sebagai pelarut yang berfungsi untuk membantu masuknya zat warna kedalam sel bakteri sewaktu proses pemanasan. Sehingga bakteri tahan asam akan tampak berwarna merah. Selanjutnya larutan Asam Alkohol 3%, komposisi asam alkohol yaitu HCL (asam klorida) pekat dan alkohol 96%. Asam alkohol berperan sebagai dekolonisasi atau peluntur zat warna dari carbol fuchin jika bakteri bersifat tidak tahan terhadap asam maka zat pertama akan luntur dan menyebabkan sel bakteri menjadi tidak berwarna. Zat warna kedua adalah Biru metilin (*Methylen blue*) yang akan mengikat bakteri yang tidak tahan asam (tidak berwarna), sehingga sel bakteri akan berwarna biru.

B. Prosedur Pewarnaan Ziehl Neelsen

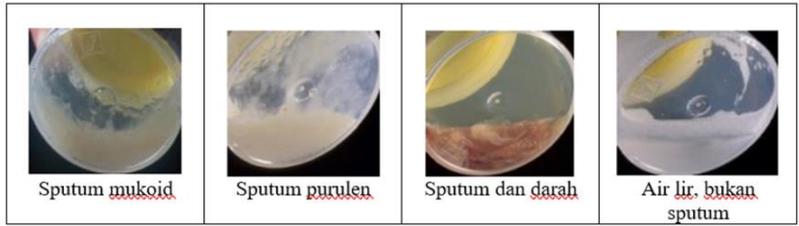
1. Tahap Pra Analitik

a) Prosedur pengumpulan Dahak

- 1) Memberikan edukasi kepada pasien tentang cara pengumpulan dahak, waktu pengumpulan dahak, lokasi pengumpulan dahak



- Bersih dan Kering
- Bermulut lebar (diameter 4-5 cm)
- Bahan kuat, tidak mudah bocor
- Bertutup ulir minimal 3 dan dapat menutup rapat



Gambar 9.1. Spesimen Dahak (Sumber : <https://fk.uui.ac.id/mikrobiologi>)

b) Persiapan alat dan bahan

- 1) Mikroskop
- 2) Lampu spritus
- 3) Lidi
- 4) Kaca slide
- 5) Tempat pembungan limbah
- 6) Pewarnaan ziehl neelsen
- 7) Sampel sputum (dahak)



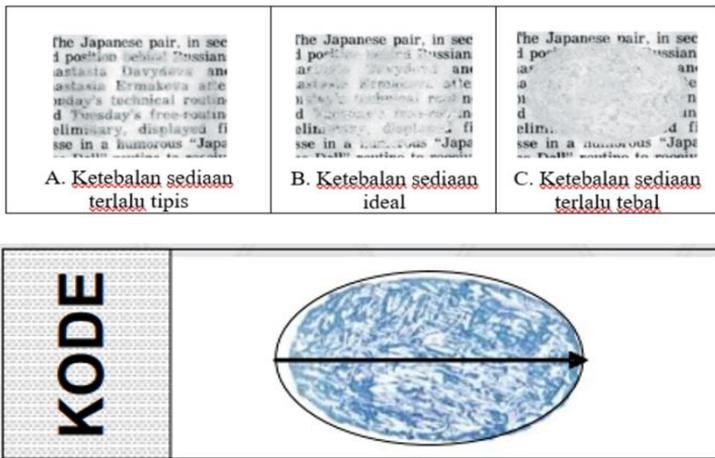
Gambar 9.2. Alat dan Bahan Pemeriksaan Spesimen Dahak

2. Tahap Analitik

a) Prosedur pembuatan sediaan

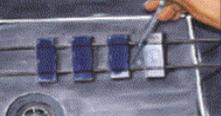
- 1) Bersihkan kaca slide dari kotoran dan lemak
- 2) Tulis identitas pada bagian *frosted*
- 3) Ambil sputum (dahak) yang purulen dengan menggunakan lidi.

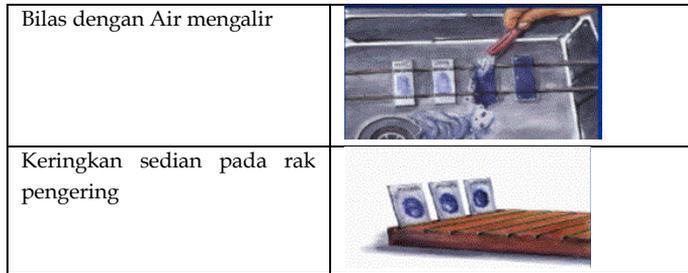
- 4) Ratakan apusan dahak bentuk oval 2x3 cm dengan gerakan spiral kecil-kecil
- 5) Buang lidi yang telah digunakan ke tempat limbah medis
- 6) Keringkan ddalam suhu kamar
- 7) Jika sediaan sudah kering, tidak diperbolehkan membuat gerakan spiral kembali karena akan menyebabkan aerosol
- 8) Setelah kering, fiksasi dengan lewatkan sediaan diatas api spiritus/bunsen biru sebanyak 2-3 kali selama 1-2 detik. Jika terlalu lama dipanaskan dapat menyebabkan rusaknya sediaan.



Gambar 9.3. Sediaan Dahak yang baik (<https://fk.uui.ac.id/mikrobiologi>)

b) Prosedur Pewarnaan

<p>Letakkan sedian yang sudah kering dan difiksasi pada rak pewarnaan masing-masing berjarak sekitar 1 jari.</p>	
<p>Genangi sedian dengan zat warna carbol fuchin</p>	
<p>Panaskan dari bawah masing-masing sedian dengan api bunsen, sampai keluar uap tidak diperbolehkan sampai mendidih karena akan menimbulkan endapan kristal</p>	
<p>Dinginkan sekitar 5-10 menit lalu Bilas dengan air mengalir</p>	
<p>Genangi sedian dengan asam alkohol elama 10-20 detik sampai warna merah carbol fuchin hilang atau tidak tampak.</p>	
<p>Bilas dengan air Mengalir</p>	
<p>Genangi sedian dengan zat warna Methylen blue selama 20-30 detik</p>	



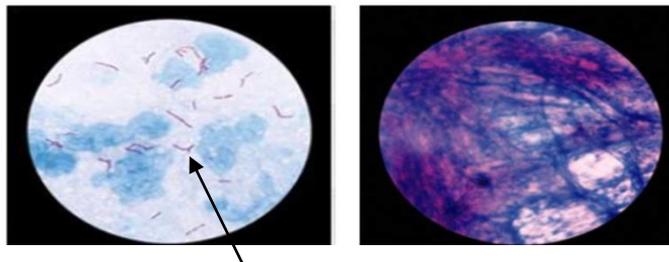
Gambar 9.4. Tahap Pewarnaan BTA

(Sumber : <https://www.scribd.com/document/369061203/Pewarnaan-Ziehl-Neelsen>)

2. Tahap Pasca Analitik

a) Interpretasi Hasil

Sediaan yang baik dari hasil pewarnaan Ziehl Neelsen akan ditunjukkan dengan adanya kontras antara Basil Tahan asam (BTA) dengan warna latar. Jika warna latar yang mengandung *Methylene blue* pemberiannya terlalu lama, maka sediaan akan tampak bewarna dominan biru.



Gambar 9.5. Basil Tahan Asam (BTA)

(Sumber : <https://fk.uui.ac.id/mikrobiologi>)

Bentuk : Basil/Batang
 Warna : Merah
 Sifat : Tahan asam
 Latar belakang : Biru

Tabel 9.1. Skala *International Union Against Tuberculosis Lung Diseases (IUTLD)*

Apa Yang Terlihat	Hasil	Yang ditulis
Tidak ditemukan BTA dalam 100 lapang pandang	Negatif	Negatif
Ditemukan 1-9 BTA dalam 100 lapang pandang (Tulis jumlah BTA yang ditemukan)	Scanty	Tulis Jumlah BTA yang ditemukan
Ditemukan 10-99 BTA dalam 100 lapang pandang	+1	+1
Ditemukan 1-10 BTA per lapang pandang (minimal 50 lapang pandang)	+2	+2
Ditemukan >10 BTA per lapang pandang (minimal 20 lapang pandang)	+3	+3

DAFTAR PUSTAKA

- Grover, S., & Kumar, D. (2018). Ziehl-Neelsen Staining Method for the Diagnosis of Mycobacterial Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(4)
- Iwari, S., & Ghosh, S. (2020). Laboratory Diagnosis of Tuberculosis: Conventional Methods. In *Emerging and Reemerging Infectious Diseases* (pp. 101-112). Springer.
- Kurniawan F.B., & Sahli I. Taufik. (2017). Bakteriologi 1 (Praktikum Teknologi Laboratorium Medik). EGC
- Moubasher, A. H., & Mahmoud, S. S. (2014). *Tuberculosis: An Overview of Current Trends in Diagnosis and Treatment*. Springer.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2017). *Medical Microbiology* (9th ed.). Elsevier Health Sciences.
- Nisar, M., & Ahmed, S. (2019). Ziehl-Neelsen Staining and its Application in the Diagnosis of Acid-Fast Bacterial Infections. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 7(1), 1-6.
- Raja, S., & Verma, P. (2017). A Study on the Ziehl-Neelsen Method for Diagnosis of Mycobacterium Tuberculosis in Sputum Specimens. *International Journal of Current Research and Review*, 9(5), 21-25.

BIODATA PENULIS



Fera Sartika, SKM., M.Si, lahir di Pegatan, Kalimantan Tengah pada tahun 1989. Penulis meraih gelar Diploma dari Universitas Muhammadiyah Palangkaraya, di Palangkaraya, pada bidang ilmu Analis Kesehatan, Sarjana Kesehatan masyarakat dari Universitas Islam Kalimantan Muhammad Arsyad Al-Banjary, Banjarmasin pada bidang ilmu Kesehatan Masyarakat dan gelar *Master of Science* pada bidang Ilmu Kedokteran Dasar minat studi Ilmu Kedokteran Laboratorium dari Universitas Airlangga, Surabaya dengan pembiayaan Beasiswa dari Universitas Muhammadiyah Palangkaraya. Sejak tahun 2016, aktif mengajar di Program Studi DIII Analis Kesehatan, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Palangkaraya hingga sekarang.

Narahubung : 081255466068

Surel:sartikafera3@gmail.com

Alamat kantor : Gedung E, Lt. 2 Jl. RTA Milono Km 1,5 Palangka Raya, Kalimantan Tengah, 73111

BAB 10

Pewarnaan Kinyoun Gabbet

* Suryani M. Florence Situmeang, S.Pd.,
M.Kes *

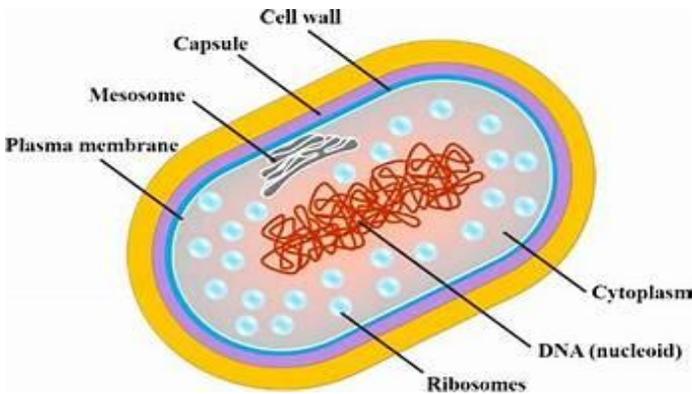
A. Pendahuluan

Bakteri sulit diamati jika tidak diwarnai, oleh sebab itu dilakukan pewarnaan terhadap sel bakteri dengan tujuan memberi warna kontras bakteri terhadap latar belakang bakteri. Warna yang diberikan adalah warna dasar seperti merah, biru dan violet. Zat warna tersebut secara kimiawi berikatan dengan protoplasma bakteri, proses ini dengan sendirinya dapat mematikan bakteri (Amin et al., 2023; Asfiya et al., 2024).

Komposisi sel bakteri mengandung banyak asam nukleat yang mengandung muatan-muatan negatif sebagai gugus-gugus fosfat. Muatan negatif ini akan mudah bereaksi dengan zat warna bersifat basa yang bermuatan positif. Zat warna bersifat asam sulit diserap oleh dinding sel bakteri, zat warna yang bersifat asam dapat dipakai untuk mewarnai latar belakang bakteri (Rafiah Mahmudah et al., 2016).

Umunya semua bakteri mempunyai lapisan membran sel, berupa pembungkus plasma, dinding sel mengandung protein dan polisakarida. Dinding sel family Mycobacterium terdiri mengandung peptidoglikan, arabinogalactan, lipid, lilin/wax dan 50% dari dinding sel tersebut terdiri dari asam mikolat. Perbedaan komposisi dinding sel tersebut menyebabkan perlunya perlakuan yang berbeda untuk mewarnai bakteri family Mycobacterium (Hasna Gita Savira & Guntur Trimulyono, 2021).

Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* termasuk kedalam ordo ordo *Actinomycetales* familia *Mycobacteriaceae*, dan genus *Mycobacterium* yang mempunyai banyak spesies, antara lain *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae*, yang juga dikenal sebagai Bakteri Tahan Asam (BTA). *Mycobacterium tuberculosis* ini adalah basil tuberkel yang merupakan batang kurus, dapat berbentuk lurus ataupun bengkok yang panjangnya sekitar 01-10 mikron dan lebar 0,2-0,6 mikron (Hasnidahlana, 2023).



Gambar 10.1. *Mycobacterium tuberculosis* labeled diagram

Mycobacterium tuberculosis tidak termasuk sebagai bakteri gram positif atau bakteri gram negatif, karena apabila diwarnai sekali dengan zat warna basa, warna tersebut tidak dapat dihilangkan dengan alkohol, meskipun dibubuhi iodium (Hasnidahlana, 2023). Oleh sebab itu bakteri ini termasuk dalam kelompok bakteri gram positif maupun gram negatif.

Bakteri tahan asam (BTA) ini mampu mempertahankan zat warna utama setelah diwarnai dengan zat warna utama basic fuchsin meskipun sudah dilunturkan dengan asam alkohol. Bakteri ini memiliki karakteristik berbentuk batang dan dapat menyebabkan penyakit infeksi menular, seperti tuberkulosis (TB) dan kusta

Untuk mewarnai BTA ada beberapa metode seperti metode *Kinyoun*, *Gabbet*, *Konyoun Gabbet* dan pewarnaan *zihl Neelsen*. Metode *Kinyoun Gabbet* adalah modifikasi metode pewarnaan *Kinyoun* dan *Gabbet* yang dikemukakan oleh *Tan Thian hock* dengan prinsip menonjolkan kelebihan dan meminimalisasi kekurangan metode *Kinyoun* dan *Gabbet* (Asfiya et al., 2024).

Metode pewarnaan Bakteri tahan asam digolongkan menjadi 2 yaitu metode *cold* (dingin) dan metode *Hot* (panas). Metode dingin menggunakan pewarnaan *Kinyoun Gabbet* sedangkan metode panas menggunakan metode *Zihl Nelsen* yang mana proses pewarnaan membutuhkan pemanasan untuk melunakkan dinding sel supaya zat warna dapat menembus dinding sel BTA. Apabila BTA sudah menyerap zat warna utama sulit dilunturkan dengan asam alkohol 3%. Sedangkan metode *kinyoun-gabbet* termasuk metode dingin karena tidak memerlukan pemanasan (Damayanti, 2023).

Pewarnaan Kinyoun Gabbet

Pewarnaan BTA metode *Kinyoun-Gabbet* adalah pewarnaan tidak memerlukan pemanasan karena zat warna pada *Kinyoun* mengandung basic fuchsin (bersifat basa) dengan konsentrasi yang tinggi, sehingga meskipun tanpa pemanasan dapat melarutkan lapisan lilin pada dinding sel bakteri tahan asam. Komposisi *Kinyoun* antara lain: basic fuchsin, fenol, alkohol 95%, dan aquades. Sebagai pewarna tandingan adalah *Gabbet*, yang memiliki komposisi antara lain : methylene blue, asam sulfat 96%, alkohol murni, dan aquades. Sama seperti pada metode *Ziehl-Neelsen*, bakteri tahan asam akan berwarna merah, sedangkan bakteri tidak tahan asam akan berwarna biru, karena bakteri tahan asam mempertahankan zat warna utama (basic fuchsin) setelah dilunturkan dengan asam alkohol (Anwar et al., 2023).

1. Prinsip

Dinding sel bakteri tahan asam memiliki lapisan asam mycolat dan lipoid yang sulit ditembus zat warna. Menggunakan Fenol sebagai pelarut zat warna utama bersifat

basa (basic fuchsin) kadar tinggi dapat menembus lapisan dinding sel bakteri tersebut. Setelah pencucian sediaan, lapisan asam mycolate dan lipoid terbuka akan merapat kembali. Pada pencucian dengan asam alkohol warna utama basic fuchsin dipertahankan. Bakteri tidak tahan asam akan luntur setelah dilunturkan dengan asam alkohol dan tidak berwarna lagi dan akan menyerap zat warna penutup methylen blue. Dengan demikian bakteri tahan asam berwarna merah dan bakteri yang tidak tahan asam berwarna biru. (Asfiya et al., 2024; Hasna Gita Savira & Guntur Trimulyono, 2021)

2. Komposisi zat warna

B.1. Kinyoun

- Basic fuchsin : 4 gram
- Fenol : 8 ml
- Alkohol 96% : 20 ml
- Aquadest : 100 ml

B.2. Gabbet

- Methylen blue : 1 gram
- Asam sulfat (H_2SO_4) 5% : 25 ml
- Alkohol 97% : 30 ml
- Aquadest : 45 ml

3. Alat

- Objek gelas (baru)
- Tangkai aplikator dari bambu/kayu
- Botol berisi pasir alcohol (untuk membersihkan tangkai aplikator)
- Lampu spiritus
- Rak sediaan
- Masker
- *Hand scoon*
- Ember pembuangan berisi desinfektan

4. Bahan Pemeriksaan

Bahan pemeriksaan adalah Sputum (dahak). Bahan pemeriksaan dahak harus berkualitas baik seperti, mukoid, purulent dan bercampur darah. Bahan pemeriksaan kualitas

jelek adalah encer seperti air saliva atau Sebagian besar terdiri dari gelembung gelembung.

Bahan pemeriksaan ditolak apabila:

- Pot dahak pecah atau retak
- Bahan pemeriksaan encer/air saliva
- Data pada pot tidak sesuai dengan formulir permohonan
- Bahan pemeriksaan diberi pengawet

5. CARA KERJA

- a. Menulis identitas pasien diujung atas objek gelas. Ambil specimen dahak dari bagian purulent, mucoid menggunakan tangkai aplikator, hapuskan ditengah objek gelas melingkar dengan ukuran 2 cm x 3 cm
- b. Memasukkan tangkai aplikator kedalam botol berisi pasir akohol.
- c. Mengeringkan sediaan pada suhu kamar, kemudian fiksasi secara fisik diatas api dengan cara melewatkan diatas lidah api 3x berturut dengan cepat.
- d. Meletakkan sediaan diatas rak, jangan terbalik.
- e. Meneteskan Larutan Kinyoun pada sediaan, biarkan selama 3 meinit
- f. Membilas sediaan dengan air mengalir sampai tidak ada lagi zat warna yang keluar.
- g. Menetesi sediaan dengan larutan Gabbet, biarkan seilama 1 menit.
- h. Membilas sediaan dengan air mengalir pelan. Keringkan pada suhu kamar
- i. Meneteskan sediaan dengan minyak imersi, amati menggunakan mikroskop objektif 100x dan okuler 10x sehingga pembesaran 1000x.

6. SEDIAAN YANG BAIK

Sediaan yang baik adalah :

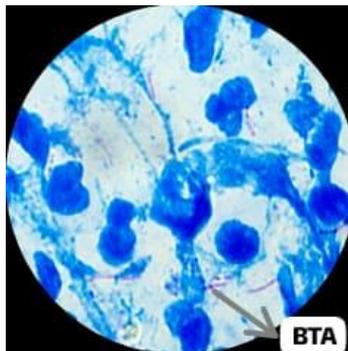
- a. Berbentuk spiral-spiral kecil berulang yang tersebar merata, ukuran 2 x 3 cm. Tidak terkelupas

- b. Tidak terlalu tebal atau tipis.
 - c. Setelah dikeringkan sebelum diwarnai, tulisan pada surat kabar 4 - 5 cm di bawah sediaan apus masih terbaca.
 - d. Ditemukan adanya makrofag atau leukosit > 25 LP dengan pembesaran 100x
 - e. Tidak terdapat sisa zat warna agar tidak mengganggu pembacaan
7. Cara penanganan dahak yang bercampur darah
- a. Dahak dengan darah sedikit:
Pilih bagian dahak yang tidak mengandung darah, dan buat sediaan seperti biasa
 - b. Dahak dengan darah sedang.
Buat sediaan, kemudian fiksasi, genangi dengan air bersih/aquades lalu digoyang-goyang sampai warna merah darah hilang.

8. Pelaporan Hasil Pemeriksaan

BTA positif jika ditemukan basil warna merah

BTA negatif jika tidak ditemukan basil warna merah (hanya warna biru)



Gambar 10.2. Hasil Pewarnaan *Kinyoun-Gabbet*. BTA berwarna merah, yang bukan BTA berwarna biru

Sediaan diperiksa paling sedikit 10 lapangan pandang dengan cara menggeserkan sediaan dari kiri ke kanan atau dari kanan ke kiri pada garis lurus.

Menghitung jumlah BTA yang ditemukan dan bandingkan dengan menggunakan skala IUATLD (*International Union Against TB and Lung Diseases*) sebagai berikut:

Jika ditemukan jumlah BTA:

Interpretasi BTA Hasil dilihat dibawah lensa objektif 100 x (+ minyak emersi).

Minimum diperiksa sebanyak 300 LP, sebelum dinyatakan negatif (-)

Intepretasi BTA (quantitative report) menurut Kemenkes / Union Against Tuberculosis and Lung Diseases (IUATLD) :

- a. Tidak ada BTA : 0 / 100 LP
- b. Meragukan = 1-9/100 LP
- c. 1 + = 10-99/100 LP
- d. 2 + = 1-10/LP
- e. 3 + = > 10 BTA dalam 1 LP, periksa minimal 20 LP
(Willey et al., 2020)

DAFTAR PUSTAKA

- Amin, S. S., Ghozali, Z., Rusdiana, M., & Efendi, S. (2023). Identifikasi Bakteri Dari Telapak Tangan Dengan Pewarnaan Gram Identification Of Bacteria From Palms With Gram Stain. <https://doi.org/10.56071/Chemviro.V1i1.563>
- Anwar, A. Y., Handayani, M. T. P., Nurdin, E., Irma Berliana, H. L., & Artati, A. (2023). Comparison Of Tuberculosis Examination Using Ziehl-Neelsen Method And Molecular Rapid Test. *Jurnal Kesehatan Manarang*, 9(3), 215–221. <https://doi.org/10.33490/Jkm.V9i3.848>
- Asfiya, N. A., Novalina, D., & Astuti, T. D. (2024). *Potensi Dan Uji Stabilitas Ekstrak Lawsonia Inermis Sebagai Cat Penutup Pada Gram Staining Dengan Variasi Suhu. Potency And Stability Test Of Lawsonia Inermis Extract As Counterstain On Gram Staining With Temperature Variation.* <http://journal.umpalangkaraya.ac.id/index.php/bjmlt>
- Damayanti, E. (2023). Identifikasi Bakteri Tahan Asam Pada Sampel Sputum Menggunakan Metode Pewarnaan Kinyoun Gabbet Identification Of Acid-Fast Bacteria In Sputum Samples Using The Kinyoun Gabbet Staining Method. *Jurnal Ilmiah Kesehatan*, 12(1), 294–298. <https://doi.org/10.35816/jiskh.V12i1.1181>
- Hasna Gita Savira, & Guntur Trimulyono. (2021). View Of Uji Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Yang Diisolasi Dari Umbi Porang (*Amorphophallus muelleri*) Terhadap *Escherichia coli* Fnc 0091 Dan *Staphylococcus aureus* Fnc 0047. *Lentera Bio*. <https://journal.unesa.ac.id/index.php/lenterabio/article/view/13270/7179>
- Hasnidahlana, H. (2023). Uji Sensitivitas Dan Spesifisitas Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Sputum Bta Terhadap Tes Cepat

Molekuler (TCM) Pada Suspek Tuberkulosis Paru Di Rsud Bangkinang.

Rafiah Mahmudah, Maswati Baharuddin, & Sappewali. (2019). Identifikasi Isolat Bakteri Termofilik Dari Sumber Air Panas Lejja, Kabupaten Soppeng. *Al-Kimia*, 4(1), 31-42.

Willey, J. M. ., Sandman, K. M. ., & Wood, D. H. . (2020). *Prescott's microbiology (11th ed.)*. McGraw-Hill Education.

BAB 11

Pewarnaan Schaeffer-Fulton

Mazidah Noer Inayah, S.Si., M.Si

A. Kemampuan Adaptasi Bakteri

Bakteri merupakan mikroorganisme uniseluler, prokariot, dan bereproduksi dengan pembelahan biner. Berdasarkan cara memperoleh karbon dan energi, bakteri digolongkan kedalam kelompok kemoheterotrof, kemoautotrof, dan fototrof. Berdasarkan kebutuhan akan oksigen untuk melakukan metabolisme, bakteri terbagi menjadi dua kelompok yaitu aerob (membutuhkan oksigen) dan anerob (tidak membutuhkan oksigen). Bagi bakteri anaerob kebutuhan oksigen dapat diganti dengan senyawa lain seperti sulfat dan nitrat (Nuryady et al., 2022).

Bakteri adalah jenis mikroorganisme dengan habitat yang sangat luas dan beragam. Populasi bakteri sebagian besar dijumpai di tanah. Selain itu, bakteri dapat ditemukan pada batu, lumpur, lautan, perairan tawar, udara, salju, tubuh organisme lain, bahan pangan, bahkan lingkungan ekstrem seperti sumber air panas dengan asam tinggi (Fim, 2022); (Hauptmann et al., 2014); (Jaffe et al., 2023); (Yi et al., 2021). Disamping itu, bakteri juga dapat hidup dalam tubuh tanaman, yang dikenal dengan bakteri endofit. Beberapa peranan bakteri endofit yaitu melindungi tanaman dari penyakit dengan mensekresikan senyawa tertentu, meningkatkan kemampuan tanaman dalam mentoleransi stres, dan memproduksi metabolit yang bermanfaat sebagai obat (Afzal et al., 2019); (White et al., 2019), sehingga beberapa penelitian menyebutkan bahwa khasiat suatu tanaman untuk pengobatan karena kandungan

senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh bakteri endofit yang terdapat dalam tanaman tersebut (Wu et al., 2021).

Diversitas bakteri yang sangat tinggi pada lingkungan yang bermacam-macam didukung oleh kemampuan bakteri dalam beradaptasi dengan lingkungan sekitarnya. Kemampuan bakteri untuk merasakan dan merespon berbagai rangsangan eksternal tidak hanya terjadi pada tingkatan individu sel bakteri, tetapi juga pada tingkatan komunitas bakteri seperti pembentukan *quorum sensing* (Ramsey et al., 2009). Meskipun diklaim sebagai salah satu bentuk kehidupan paling sederhana di bumi, bakteri mampu menggunakan berbagai strategi untuk berkembang di lingkungan yang berubah-ubah serta beradaptasi dengan cepat melalui mutasi genetic (Moreno-Gómez, 2022).

Bakteri diketahui memiliki program regulasi gen yang canggih. Dengan kemampuan tersebut, sel bakteri yang sederhana mampu mengontrol ratusan gen untuk mengekspresikan perubahan fisiologis yang besar, sehingga dapat bertahan dalam lingkungan ekstrim. Tidak hanya beradaptasi terhadap satu jenis cekaman, suatu penelitian melaporkan bahwa bakteri menunjukkan kemampuan toleransi terhadap banyak cekaman atau kombinasi stres yang terjadi secara bersamaan. Toleransi multi-stres ini dapat dicapai melalui regulasi global dari beberapa gen yang saling berkaitan, misalnya faktor sigma dan chaperon. Faktor sigma merupakan protein yang berperan penting dalam proses inisiasi ekspresi gen pada sel prokariot. Faktor sigma akan mengarahkan RNA polimerase untuk mengenali promotor spesifik dari gen-gen yang sesuai dengan stres lingkungan (Haruta & Kanno, 2015).

Kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan mengakibatkan sel bakteri tidak dapat tumbuh optimal dan beralih ke fase letargi, yaitu mengalami perlambatan pertumbuhan (fase stasioner). Setelah itu, sel bakteri akan memulai mekanisme perlindungan untuk mempertahankan diri. Terdapat beberapa jenis cekaman dilingkungan yang diketahui dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan

sel bakteri, diantaranya kekurangan nutrisi, perubahan tekanan osmotik, perubahan kelembapan, temperatur ekstrim, perubahan pH, adanya senyawa antimikroba, serta faktor lainnya (Dawan & Ahn, 2022); (Esbelin et al., 2018).

Bakteri memiliki beberapa kemampuan untuk mengatasi kondisi stres guna mempertahankan hidupnya. Beberapa aksi yang dilakukan oleh bakteri saat berada dalam lingkungan yang tidak menguntungkan antara lain membentuk kista (pada *Azotobacter*, *Myxococcus*, dan *Sporocytophaga*) dan spora (eksospora pada *Actinobacteria*, *Metylosinus* dan *Rhodomicrobium*, endospora pada *Bacillus* dan *Clostridium*), melakukan perubahan pada membran sel, mengekspresikan enzim perbaikan untuk kerusakan sel, menyintesis molekul tertentu, membentuk biofilm, melakukan transfer gen horizontal, saling memberi makanan (*cross-feeding*), dan lain sebagainya (Alnahhas & Dunlop, 2024); (Culp & Goodman, 2023); (Gao et al., 2011); (Willdig & Helmman, 2021).

B. Endospora

Istilah 'endospora' tersusun atas dua kata yaitu 'endo' dan 'spora', artinya spora yang terdapat dibagian dalam. Pada awalnya kata 'endospora' dimaknai seperti 'biji' (*seed-like form*), akan tetapi, hal tersebut dinilai kurang tepat karena fungsi endospora tidak seperti fungsi biji dari suatu tanaman, yaitu sebagai alat perkembangbiakan, melainkan sebagai bentuk dorman dari sel bakteri (Gould, 2006). Endospora merupakan struktur sel bakteri yang keras, dorman, dan bersifat non-reproduktif. Pembentukan endospora bukan sebagai mekanisme perkembangbiakan sel, melainkan sebagai bentuk pertahanan sel bakteri saat berada dalam kondisi stres atau lingkungan yang tidak menguntungkan misalnya suhu tinggi, kekeringan, terdapat senyawa kimia toksik (disinfektan, antibiotik) dan radiasi sinar ultraviolet (UV) dan sinar gamma (Atrih & Foster, 2002).

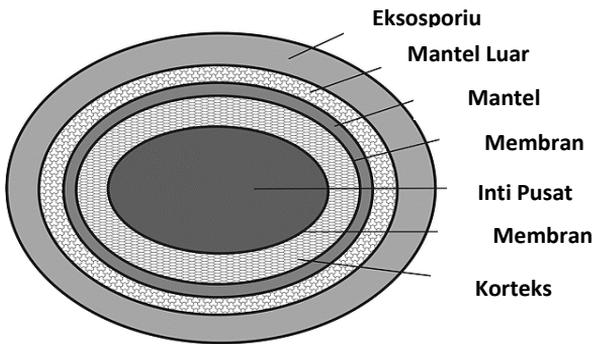
Endospora bakteri dikenal sebagai struktur hidup paling tahan terhadap kondisi lingkungan. Penelitian menyebutkan

struktur tersebut bisa bertahan hingga ratusan bahkan ribuan tahun dan akan kembali berkecambah saat lingkungan sekitarnya mendukung (Gould, 2006). Resistensi endospora dalam cekaman disebabkan oleh adanya lapisan pelindung protein dan peptidoglikan khusus yang sangat tebal. Lapisan tersebut mampu mendetoksifikasi bahan kimia reaktif yang ada disekitarnya. Disamping itu, membran dalam spora yang relatif tidak tembus air dapat membatasi akses senyawa kimia beracun yang berpotensi merusak kestabilan DNA yang terdapat dalam inti endospora. Kandungan air yang rendah dan tingkat asam dipikolinat yang tinggi di inti spora juga berfungsi untuk melindungi makromolekul inti dari efek panas, pengeringan, bahan kimia genotoksik, serta radiasi (Setlow, 2016); (Shrestha et al., 2023).

Kemampuan membentuk endospora tidak dimiliki oleh semua jenis bakteri. Penelitian menyebutkan bahwa sebagian besar bakteri yang dapat membentuk endospora termasuk dalam kelompok Gram positif berbentuk batang (*Gram-positive Bacilli*) kecuali *Sporosarcina* (berbentuk kokus). Bakteri dari genus *Bacillus* dan *Clostridium* merupakan contoh pembentuk endospora yang paling banyak dipelajari (Flores & Popham, 2020). Selain kedua genus tersebut, beberapa contoh bakteri pembentuk endospora diantaranya *Thermoactinomyces*, *Sporolactobacillus*, *Desulfotomaculum*, *Oscillospira*, dan *Lysinibacillus sphaericus* (Rahmaninezhad et al., 2023).

Masing-masing-masing jenis bakteri memiliki bentuk atau tipe endospora yang berbeda. Selain itu, posisi endospora dalam sel induk sering kali berbeda antar spesies. Beberapa morfologi endospora bakteri antara lain berbentuk bulat, lonjong atau silindris, terletak di tengah (sentral), salah satu ujung (subterminal) dan terminal, bahkan terdapat endospora dengan diameter yang lebih besar dari diameter sel bakteri sehingga menyebabkan pembengkakan sel. Perbedaan morfologi dan posisi endospora bakteri tersebut sangat penting dan berharga dalam identifikasi bakteri (Flores & Popham, 2020).

Berbeda dengan tipe dan letaknya yang berbeda-beda dalam sel induk, struktur endospora bakteri pada umumnya memiliki kesamaan antara tipe endospora yang satu dengan yang lainnya. Dalam *article review* yang ditulis oleh (Romero-Rodríguez et al., 2023), struktur spora dewasa biasanya terdiri dari beberapa lapisan yang mengelilingi inti yang mengandung informasi genetik (**Gambar 11.1**). Lapisan terluar dari endospora adalah eksosporium. Lapisan-lapisan berikutnya tersusun atas mantel, membran luar, korteks, dinding sel peptidoglikan, dan membran dalam. Terakhir, lapisan paling dalam yang dikelilingi oleh semua lapisan pelindung adalah inti, dengan kandungan air sangat rendah dan tingkat asam dipikolinat (DPA) yang tinggi, berbagai kation divalen dan protein spora berukuran kecil yang larut dalam asam untuk menstabilkan bahan genetik yaitu *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) (Setlow, 2016).



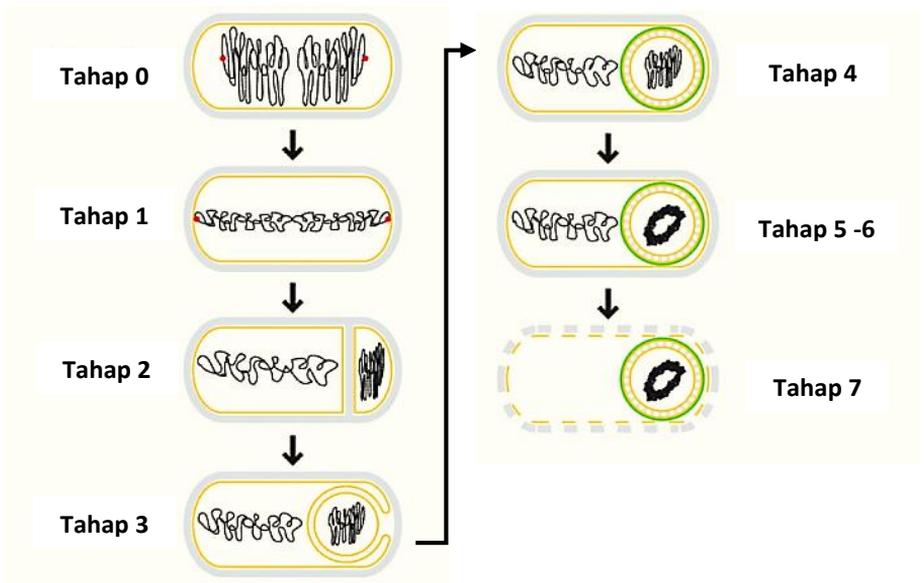
Gambar 11.1 Struktur endospora bakteri (Kim & Schumann, 2009)

Struktur endospora memiliki peran penting dalam membentuk ketahanan spora. Hal ini didukung oleh lapisan-

lapisan penyusun endospora yang memainkan peran spesifik dalam ketahanan terhadap berbagai cekaman dari lingkungan. Lapisan terluar, yaitu eksosporium dilaporkan tidak terdapat pada semua endospora bakteri, seperti pada *Bacillus subtilis*, namun lapisan tersebut dapat dijumpai pada endospora bakteri *Bacillus anthracis*. Lapisan tersebut tersusun atas glikoprotein dan berfungsi sebagai pelindung paling luar, tetapi belum ada bukti bahwa eksosporium memainkan peran yang signifikan dalam ketahanan spora. Lapisan berikutnya adalah mantel (selubung endospora). Lapisan mantel mengandung sebagian besar total protein endospora dan bertindak sebagai penghalang permeabilitas yang membatasi akses molekul besar seperti enzim lisis ke target sensitif potensial di lapisan dalam endospore. Lapisan membran luar tersusun atas lipid dan protein, sedangkan korteks tersusun atas peptidoglikan. Kedua lapisan tersebut berguna dalam menjaga dormansi, mengatur kadar air (tingkat dehidrasi), serta ketahanan panas. Tidak berbeda dari membran luar, membran dalam endospora juga tersusun atas lipid dan protein yang berfungsi sebagai pelindung dari senyawa kimia. Lapisan terdalam endospora yaitu inti atau *germ cell*. Lapisan ini merupakan lapisan paling penting karena mengandung kromosom (bahan genetik), enzim-enzim, ribosom, Ca^{2+} , DPA, serta memiliki peran penting dalam ketahanan spora diantaranya resistensi panas, radiasi (UV dan gamma), serta senyawa biosida (Romero-Rodríguez et al., 2023); (Setlow, 2016).

Para ahli telah banyak mempelajari proses pembentukan endospora (endosporulasi) dari suatu sel bakteri pada saat mengalami cekaman atau stres. Gambar 11.2 dibawah ini merupakan tahapan endosporulasi pada bakteri *Bacillus subtilis* (Tan & Ramamurthi, 2014). Tahap awal endosporulasi dimulai dengan proses replikasi kromosom (tahap 0). Kemudian pada tahap 1 terjadi kondensasi kromosom dan penambatan asal replikasi bahan genetik ke kutub ekstrim sel. Pada tahap 2 dan 3, septum atau sekat (dinding pemisah) semakin jelas terbentuk, membran plasma melipat, menciptakan septum forespor (cikal

bakal endospora) yang memisahkan segmen kromosom dari yang lainnya. Membran sel induk 'menelan' forespor dan menciptakan ruang antar membran sehingga terdapat dua membran plasma. Pada tahapan ke-4 dan 5, terjadi pembentukan korteks dan mantel endospora termasuk Ca^{2+} dan asam dipikolinat. Setelah itu, terjadi proses pematangan endospora. Pada tahapan ini, sel menjadi tidak aktif secara metabolik dan inti sel mengering (dehidrasi). Ketika endospora matang selanjutnya, sel induk akan memproduksi enzim yang berfungsi menghancurkan sel vegetatif, sehingga sel induk bakteri mengalami lisis dan melepaskan endospora dewasa yang bersifat dorman ke lingkungan.



Gambar 11.2 Proses pembentukan endospora bakteri (Warna abu-abu : peptidoglikan, kuning: membran sel, hitam: DNA, hijau: lapisan endospora, titik merah: posisi asal replikasi kromosom) (Tan & Ramamurthi, 2014).

Endospora bakteri yang berada di lingkungan bersifat resisten terhadap berbagai cekaman. Untuk merusak struktur atau menonaktifkan endospora memerlukan suatu perlakuan khusus antara lain penggunaan autoklaf, pembakaran, radiasi pengion, insinerasi, penyinaran dengan sinar biru (*blue light*), perlakuan tekanan tinggi, serta penggunaan senyawa kompleks tembaga-tripeptida (Cui et al., 2020); (Denis et al., 2013); (Romero-Rodríguez et al., 2023). Sifat resisten endospora terhadap cekaman disekitarnya menciptakan masalah baru bagi kehidupan, terutama dalam bidang kesehatan. Terlebih jika endospora tersebut dimiliki oleh bakteri penyebab penyakit. Sebagian besar bakteri patogen berendospora termasuk dalam kelompok Filum Firmicutes Genus *Bacillus* (aerob) dan *Clostridium* (anaerob). Beberapa jenis bakteri berendospora yang menyebabkan penyakit yaitu *Bacillus cereus* (penyebab penyakit gastrointestinal), *Bacillus anthracis* (penyakit antraks), *Clostridium tetani* (penyebab tetanus), *Clostridium botulinum* (penyebab botulisme), *Clostridium perfringens* (penyebab keracunan bahan pangan), dan *Clostridium difficile* (penyebab kolitis pseudomembranosa atau peradangan usus besar) (Cho & Chung, 2020); (Frenzel et al., 2015); (Czepiel et al., 2019); (Hailegebreal, 2017); (Hussain et al., 2024); (Rind et al., 2019); (Zhu et al., 2018).

Penanganan suatu penyakit yang diakibatkan oleh bakteri berendospora memerlukan suatu tindakan pengobatan khusus. Sifat endospora yang tahan terhadap cekaman antibiotik telah mendorong banyak penelitian dalam bidang pengembangan senyawa antimikroba terbaru, yang tidak hanya membunuh sel vegetatif melainkan juga menonaktifkan endospora sel bakteri (Andryukov et al., 2020). Salah satu senyawa yang dilaporkan dapat menghambat pembentukan endospora bakteri *Clostridium difficile* adalah Fidaxomicin (FDX). Senyawa tersebut merupakan agen antimikroba baru dengan spektrum sempit dan aktivitas bakterisidal yang kuat terhadap *Clostridium difficile* (Babakhani et al., 2012).

C. Teknik Pewarnaan Endospora

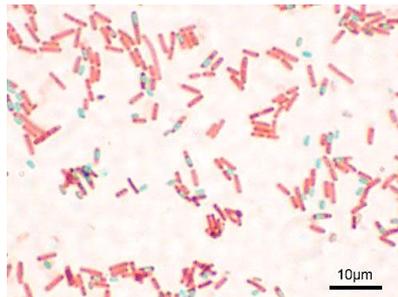
Struktur dan posisi endospora yang beragam antar jenis bakteri menjadi salah satu karakteristik penting dalam proses identifikasi bakteri. Selain itu, pengamatan terkait endospora penting dilakukan sebagai upaya pencarian senyawa potensial yang efektif membunuh atau menonaktifkan endospora bakteri penyebab penyakit. Salah satu teknik yang dapat digunakan untuk mengamati endospora adalah pewarnaan endospora. Dengan mewarnai komponen endospora, pengamatan terhadap morfologinya lebih mudah dilakukan dan dipelajari. Sebagian besar sel vegetatif bakteri dapat diwarnai dengan larutan pewarna akuatik standar, tetapi struktur endospora dengan dinding tebal dan keras (berbeda dengan sel vegetatif) menyebabkan endospora sangat sukar diwarnai dengan pewarna biasa, sehingga memerlukan pewarna spesifik dan bersifat kuat untuk menembus dinding endospora (Hartline, 2024).

Teknik pewarnaan endospora dengan metode Schaeffer-Fulton merupakan salah satu metode yang umum digunakan dalam pengamatan endospora. Pada tahun 1933, dua orang ilmuwan Middlebury College di Vermont, Amerika Serikat bernama Alice B. Schaeffer dan MacDonald Fulton bekerja sama untuk menemukan teknik pewarnaan endospora bakteri. Kedua ilmuwan tersebut memodifikasi teknik pewarnaan yang ditemukan oleh ilmuwan sebelumnya bernama Dorner pada tahun 1922. Schaeffer dan Fulton berhasil membuat proses pewarnaan dan pengamatan spora berlangsung dengan lebih cepat, mudah, serta dengan kontras yang tajam (Hussey & Zayaitz, 2013).

Pada metode Schaeffer-Fulton terdapat dua jenis larutan pewarna yang digunakan, yaitu hijau malakit (*malachite green*) dan safranin. Larutan hijau malakit dibuat dengan melarutkan 0.5 gram bubuk hijau malakit dengan akuades 100 ml, sehingga konsentrasi larutan menjadi 0.5% (w/v). Larutan hijau malakit bersifat basa dengan pH sekitar 11.2 (bersifat alkalin dengan kromofor positif). Berbeda dengan larutan hijau malakit, larutan

safranin dibuat dengan pelarut alkohol atau etanol 95%. Sebanyak 2.5 gram bubuk safranin dilarutkan dengan 100 ml etanol 95%, sehingga konsentrasi larutan menjadi 2.5%. Larutan hijau malakit digunakan sebagai larutan utama untuk mewarnai endospora bakteri. Larutan tersebut merupakan pewarna yang kuat sehingga dapat berpenetrasi ke dalam endospora. Larutan safranin berfungsi sebagai pewarna tandingan, yang memiliki kekontrasan warna dengan pewarna utama dan berguna untuk mewarnai sel vegetatif bakteri (Hussey & Zayaitz, 2013).

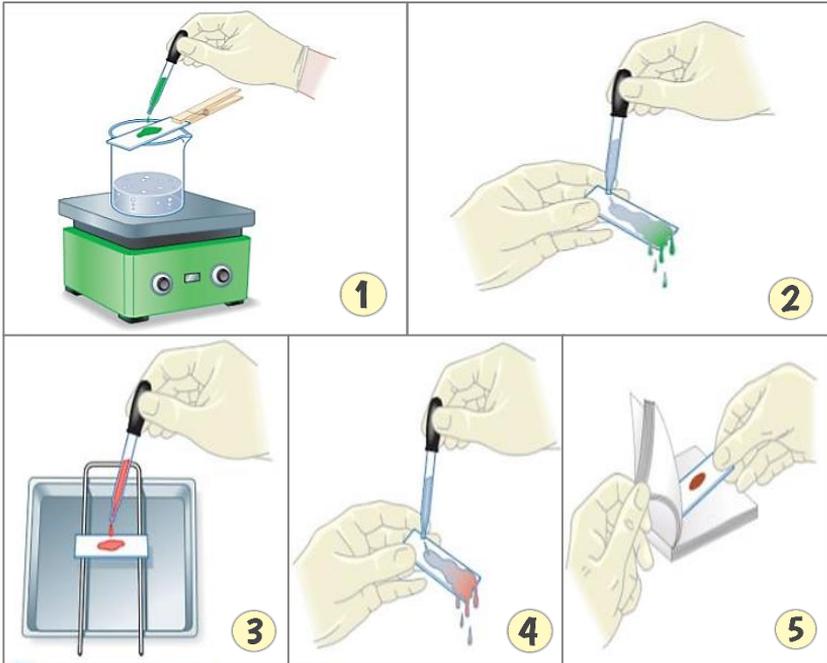
Selain menggunakan dua jenis larutan pewarna, pada metode Schaeffer-Fulton juga digunakan air sebagai agen dekolorisasi (dekolorisator) sel vegetatif. Proses pemucatan ini hanya untuk menghilangkan zat warna pada sel vegetatif, sedangkan endospora tetap dapat menyerap zat warna. Dengan teknik pewarnaan tersebut, maka warna endospora akan tampak berbeda dengan warna sel vegetatif. Endospora akan terlihat berwarna hijau (sedikit kebiruan), sedangkan sel vegetatif akan berwarna merah muda (**Gambar 11.3**). Oleh karena itu, metode pewarnaan endospora ini dikenal sebagai teknik pewarnaan diferensial.



Gambar 11.3 Hasil pewarnaan endospora dengan metode Schaeffer-Fulton (Endospora : berwarna hijau-biru, sel vegetatif : berwarna merah muda) (Hartline, 2024)

Secara teknis, proses pewarnaan endospora bakteri dengan metode Schaeffer-Fulton dilakukan dengan proses pemanasan. Proses ini membuat dinding endospora mengembang dan pori-

porinya membesar, sehingga zat pewarna hijau malakit dapat masuk dan mewarnai endospora. Tahapan-tahapan pewarnaan endospora bakteri dengan metode Schaeffer-Fulton adalah sebagai berikut (**Gambar 11.4**):



Gambar 11.4 Tahapan pewarnaan endospora bakteri dengan metode Schaeffer-Fulton (1. Menggenangi olesan bakteri dengan hijau malakit, 2. Mencucinya dengan air, 3. Menggenangi dengan safranin, 4. Mencuci kembali dengan air, 5. Mengeringkan dan menyeka sisa-sisa air bilasan dengan menggunakan kertas serap) (Cappuccino & Sherman, 2014).

- 1. Menyiapkan olesan bakteri yang akan diwarnai. Olesan sebelumnya sudah dikering-udarkan serta difiksasi panas;**
2. Menggenangi olesan bakteri dengan larutan pewarna utama yaitu hijau malakit 0.5% selama 3 menit. Selama proses tersebut kaca preparat diletakkan diatas pemanas

- (seperti proses pengukusan). Selama proses ini, perhatikan larutan pewarna agar tidak sampai mendidih dan tambahkan beberapa tetes jika diperlukan;
3. Mendinginkan kaca preparat, kemudian mencucinya dengan air mengalir (pada tahapan ini pewarna sel vegetatif akan luntur, namun tidak pada endospora);
 4. Menggenangi kaca preparat dengan larutan pewarna tandingan safranin 2.5% selama kurang lebih 30 detik (endospora yang sudah menyerap warna hijau malakit tidak dapat menyerap safranin, sebaliknya sel vegetatif yang belum terwarnai akan menyerap zat warna safranin);
 5. Selanjutnya, mencuci olesan bakteri pada kaca preparat dengan air mengalir;
 6. Terakhir, mengeringkan dan menyeka sisa-sisa air bilasan dengan menggunakan kertas serap;
 7. Mengamati endospora dan sel vegetatif dengan mikroskop pada perbesaran 1000x dengan minyak imersi.

Sama halnya dengan teknik pewarnaan bakteri yang lain, metode pewarnaan endospora Schaeffer-Fulton juga memiliki kelebihan dan kekurangan. Beberapa kelebihan metode Schaeffer-Fulton diantaranya memudahkan pengamatan endospora bakteri serta membedakannya dari sel vegetatif (*sharp contrast*), sangat berguna dalam proses identifikasi bakteri, serta dapat dimanfaatkan untuk mendeteksi spora pada organisme eukariot (Hussey & Zayaitz, 2013). Di sisi lain, metode pewarnaan endospora tersebut juga memiliki kekurangan yaitu memerlukan pengerjaan yang cukup ekstrim seperti pemanasan dan tahapan yang relatif panjang, serta kurang optimal jika digunakan dalam pewarnaan sel bakteri tidak berendospora (Xia et al., 2011).

DAFTAR PUSTAKA

- Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., & Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*, 221(December 2018), 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- Alnahhas, R. N., & Dunlop, M. J. (2024). *Advances in linking single cell bacterial stress response to population level survival* Short title: *Single cell and population level stress response*. 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102885>.Advances
- Andryukov, B. G., Karpenko, A. A., & Lyapun, I. N. (2020). Learning from nature: Bacterial spores as a target for current technologies in medicine. *Sovremennyye Tehnologii v Medecine*, 12(3), 105–122. <https://doi.org/10.17691/stm2020.12.3.13>
- Atrih, A., & Foster, S. J. (2002). Bacterial endospores the ultimate survivors. *International Dairy Journal*, 12(2–3), 217–223. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00157-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00157-1)
- Babakhani, F., Bouillaut, L., Gomez, A., Sears, P., Nguyen, L., & Sonenshein, A. L. (2012). Fidaxomicin inhibits spore production in clostridium difficile. *Clinical Infectious Diseases*, 55(SUPPL.2), 162–169. <https://doi.org/10.1093/cid/cis453>
- Cappuccino, J. G., & Sherman, N. (2014). *Microbiology: A Laboratory Manual* (10th ed.). Pearson education inc.
- Cho, W. Il, & Chung, M. S. (2020). Bacillus spores: a review of their properties and inactivation processing technologies. *Food Science and Biotechnology*, 29(11), 1447–1461. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00809-4>
- Cui, Y., Zhou, K., & Yang, K.-L. (2020). Copper-tripeptide complexes for rapid inactivation of Bacillus subtilis endospores. *Biotechnology Notes*, 1(April), 16–19. <https://doi.org/10.1016/j.biotno.2020.03.002>
- Culp, E. J., & Goodman, A. L. (2023). Cross-feeding in the gut microbiome: Ecology and mechanisms. *Cell Host and Microbe*, 31(4), 485–499. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.03.016>
- Czepiel, J., Pituch, H., Kuijper, E. J., Perucki, W., & Mielimonka, A.

- (2019). Colitis Pseudo Membranosa / Clostridium D. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*.
- Dawan, J., & Ahn, J. (2022). Bacterial Stress Responses as Potential Targets in Overcoming Antibiotic Resistance. *Microorganisms*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071385>
- Denis, T. G. S., Dai, T., & Hamblin, M. R. (2013). Killing bacterial spores with blue light: When innate resistance meets the power of light. *Photochemistry and Photobiology*, 89(1), 2-4. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01233.x>
- Esbelin, J., Santos, T., & Hébraud, M. (2018). Desiccation: An environmental and food industry stress that bacteria commonly face. *Food Microbiology*, 69, 82-88. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.017>
- Fim, V. (2022). Classification of Bacteria Habitat and its Types. *Journal of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 6(1), 1-2.
- Flores, M. J., & Popham, D. L. (2020). Bacterial Endospores. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-8. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000300.pub3>
- Frenzel, E., Kranzler, M., Stark, T. D., Hofmann, T., & Ehling-Schulz, M. (2015). The endospore-forming pathogen bacillus cereus exploits a small colony variant-based diversification strategy in response to aminoglycoside exposure. *MBio*, 6(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.01172-15>
- Gao, H., Weitao, T., & He, Q. (2011). Coping with the environment: How microbes survive environmental challenges. *International Journal of Microbiology*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/379519>
- Gould, G. W. (2006). History of science - Spores: Lewis B Perry Memorial Lecture 2005. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 507-513. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02888.x>
- Hailegebreal, G. (2017). A Review on Clostridium Perfringens Food Poisoning. *Global Research Journal of Public Health and Epidemiology*, 4(3), 104-109.
- Hartline, R. (2024). *MICROBIOLOGY*. West Hills College Lemoore. <https://libretexts.org>
- Haruta, S., & Kanno, N. (2015). Survivability of microbes in natural

- environments and their ecological impacts. *Microbes and Environments*, 30(2), 123–125. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME3002rh>
- Hauptmann, A. L., Stibal, M., Bælum, J., Sicheritz-Pontén, T., Brunak, S., Bowman, J. S., Hansen, L. H., Jacobsen, C. S., & Blom, N. (2014). Bacterial diversity in snow on North Pole ice floes. *Extremophiles*, 18(6), 945–951. <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0660-y>
- Hussain, H., Fadel, A., Garcia, E., Hernandez, R. J., Saadon, Z. F., Naseer, L., Casmartino, E., Hamad, M., Schnepp, T., Sarfraz, R., Angly, S., & Jayakumar, A. R. (2024). Clostridial Myonecrosis: A Comprehensive Review of Toxin Pathophysiology and Management Strategies. *Microorganisms*, 12(7), 1–23. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12071464>
- Hussey, M. A., & Zayaitz, A. (2013). Endospore Stain Protocol. *American Society for Microbiology, September 2007*, 1–11.
- Jaffe, A. L., Castelle, C. J., & Banfield, J. F. (2023). Habitat Transition in the Evolution of Bacteria and Archaea. *Annual Review of Microbiology*, 77, 193–212. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-041320-032304>
- Kim, J., & Schumann, W. (2009). Display of proteins on bacillus subtilis endospores. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(19), 3127–3136. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0067-6>
- Moreno-Gámez, S. (2022). How bacteria navigate varying environments. *Science*, 378(6622), 844–845. <https://doi.org/10.1126/science.adf4444>
- Nuryady, M. M., Aisha, A., Aulia, D., & Savitri, A. (2022). Research trends in isolation and identification of bacteria from Indonesia with various roles: Review Article. *Journal of Biotechnology and Natural Science*, 1(2), 80–87. <https://doi.org/10.12928/jbns.v1i2.5232>
- Rahmaninezhad, S. A., Khaneghahi, M. H., Farnam, Y. (Amir), Schauer, C. L., Najafi, A., Street, R. M., Sadighi, A., Kamireddi, D., & Sales, C. M. (2023). Understanding the importance of endospore formation methods for generating endospores that can

- resist harsh conditions and produce calcite in bio self-healing of concrete. *MATEC Web of Conferences*, 378, 02004. <https://doi.org/10.1051/mateconf/202337802004>
- Ramsey, M. M., Korgaonkar, A. K., & Whiteley, M. (2009). *Quorum-Sensing in Bacteria*.
- Rind, N. A., Taj, M. K., & Jan, S. (2019). Clostridium tetani as a pathogenic organism. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 14(04), 207–213. <https://doi.org/10.12692/ijb/14.4.207-213>
- Romero-Rodríguez, A., Ruiz-Villafán, B., Martínez-de la Peña, C. F., & Sánchez, S. (2023). Targeting the Impossible: A Review of New Strategies against Endospores. *Antibiotics*, 12(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020248>
- Setlow, P. (2016). Spore resistance properties. *The Bacterial Spore: From Molecules to Systems, v*, 201–215. <https://doi.org/10.1128/9781555819323.ch10>
- Shrestha, S., Taib, N., Gribaldo, S., & Shen, A. (2023). Diversification of division mechanisms in endospore-forming bacteria revealed by analyses of peptidoglycan synthesis in Clostridioides difficile. *Nature Communications*, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43595-3>
- Tan, I., & Ramamurthi, K. (2014). Spore Formation in Bacillus Subtilis. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12130>Spore
- White, J. F., Kingsley, K. L., Zhang, Q., Verma, R., Obi, N., Dvinskikh, S., Elmore, M. T., Verma, S. K., Gond, S. K., & Kowalski, K. P. (2019). Review: Endophytic microbes and their potential applications in crop management. *Pest Management Science*, 75(10), 2558–2565. <https://doi.org/10.1002/ps.5527>
- Willdigg, J. R., & Helmann, J. D. (2021). Mini Review: Bacterial Membrane Composition and Its Modulation in Response to Stress. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8(May), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.634438>
- Wu, W., Chen, W., Liu, S., Wu, J., Zhu, Y., Qin, L., & Zhu, B. (2021). Beneficial Relationships Between Endophytic Bacteria and Medicinal Plants. *Frontiers in Plant Science*, 12(April), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.646146>

- Xia, B., Upadhyayula, S., Nuñez, V., Landsman, P., Lam, S., Malik, H., Gupta, S., Sarshar, M., Hu, J., Anvari, B., Jones, G., & Vullev, V. I. (2011). Amyloid histology stain for rapid bacterial endospore imaging. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(8), 2966–2975. <https://doi.org/10.1128/JCM.02285-10>
- Yi, Y., Lin, C., Wang, W., & Song, J. (2021). Habitat and seasonal variations in bacterial community structure and diversity in sediments of a Shallow lake. *Ecological Indicators*, 120, 106959. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106959>
- Zhu, D., Sorg, J. A., & Sun, X. (2018). Clostridioides difficile biology: Sporulation, germination, and corresponding therapies for C. difficile infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(FEB), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00029>

BIODATA PENULIS



Mazidah Noer Inayah, S.Si., M.Si

Penulis lahir di Kota Sampang, Madura, Jawa Timur pada tanggal 4 Agustus 1994. Penulis menyelesaikan pendidikan S1 (Biologi) pada tahun 2016, kemudian mendapatkan gelar Magister Sains (Mikrobiologi) pada tahun 2020 di Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor (IPB University). Selama menempuh studi S2, penulis aktif sebagai asisten peneliti dan mendapatkan beasiswa riset dari The German Research Foundation (DFG) dan menjadi *visiting researcher* di Gerog-August University Goettingen. Sejak tahun 2021, penulis aktif mengajar sebagai tutor mata kuliah Mikrobiologi di Fakultas Sains & Teknologi, Universitas Terbuka. Saat ini, penulis juga tercatat sebagai dosen tetap pada program studi D-IV Teknologi Laboratorium Medis, Politeknik Yakpermas Banyumas dengan bidang keahlian metagenomik mikrobiologi. Penulis berhasil mempublikasikan artikel ilmiah pada jurnal internasional terindeks Scopus (Q2) dan jurnal nasional terakreditasi Sinta.

BAB 12

Pewarnaan Klein

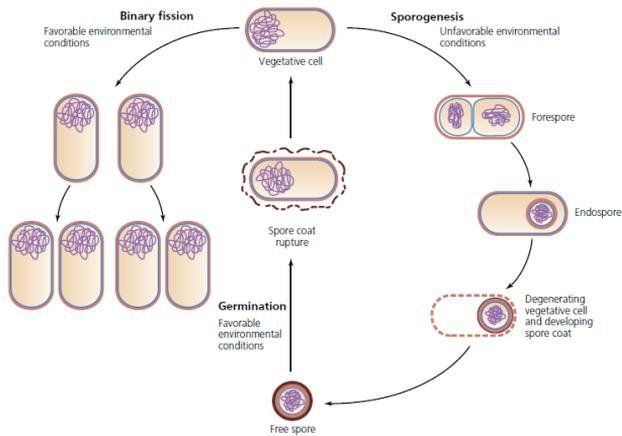
* Chylen Setiyo Rini, S.Si., M.Si*

Mikroorganisme merupakan suatu organisme yang sangat kecil. Walaupun ukurannya sangat kecil dan memiliki sel tunggal, mikroorganisme tetap dapat menghasilkan energi, mengalami pertumbuhan, serta bereproduksi sendiri (Pratiwi et al., 2020). Suatu mikroba dapat hidup bebas di lingkungan dan tersebar di air, tanah, udara, selain itu bisa hidup di dalam tubuh manusia. Beberapa mikroorganisme ada yang bersifat patogen dan ada juga yang tidak. Mikroba tidak bisa dilihat dan dibedakan secara langsung sehingga diperlukan bantuan mikroskop dan identifikasi dengan teknik tertentu (Badaring & Bahr, 2020).

Bakteri adalah mikroorganisme sederhana yang mempunyai satu sel dan tidak mempunyai membran inti sel. Bakteri memiliki panjang sel sekitar 2 - 8 μm dan diameternya 0,2 - 2,0 μm (Tortora et al., 2010). Jika dibandingkan dengan virus, bakteri cenderung memiliki ukuran yang lebih besar. Ada tiga bentuk bakteri diantaranya yaitu kokus atau bulat, basil atau batang, dan spiral. Bakteri yang mempunyai bentuk pendek dengan spiral namun tidak lengkap maka masuk ke dalam bakteri vibrio atau berbentuk koma (Boleng, 2015). Bakteri dapat dikelompokkan berdasarkan letak flagel, jumlah, bentuk, kebutuhan oksigen, bentuk dinding sel, serta bagaimana cara bakteri tersebut mendapatkan makanannya. (Artati & Oman, 2019).

Untuk mempertahankan diri, suatu bakteri memiliki cara tersendiri untuk bertahan hidup. Hal ini dilakukan sebagai bentuk

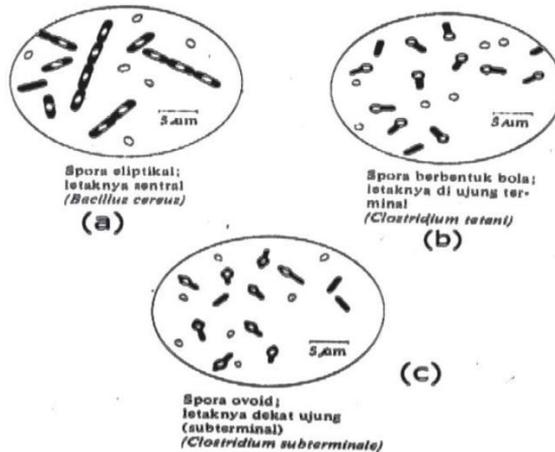
penanggulangan akan lingkungan yang keras dan tidak mendukung. Salah satu hal yang bisa dilakukan bakteri yaitu dengan membentuk spora. Pada saat bakteri membentuk spora, maka segala sesuatu yang dilakukan oleh bakteri yakni metabolisme, produksi enzim, dan respirasi tidak dilakukan secara maksimal (Hariram & Labbé, 2015).



Gambar 12.1. Siklus hidup bakteri pembentuk spora (Cappuccino & Welsh, 2018).

Ada beberapa bakteri yang menghasilkan eksospora atau spora yang berada di luar sel vegetatif dan ada juga yang menghasilkan endospora atau spora yang berada di dalam sel vegetatifnya. Contoh bakteri yang menghasilkan eksospora adalah *Streptomyces viridochromogens*. Proses pembentukan eksospora sama seperti proses pembentukan spora pada cendawan. Bakteri gram positif biasanya membuat spora intraseluler atau endospora untuk melindungi dirinya dari lingkungan yang tidak mendukung atau ekstrim. Spesies paling umum yang membentuk endospora untuk bertahan hidup yakni spesies *Clostridium* dan *Bacillus*. Endospora akan terbentuk di fase logaritmik. Ukuran dari endospora bermacam-macam. Ada yang memiliki ukuran lebih kecil dari sel vegetatifnya dan ada juga yang lebih besar dari sel vegetatifnya. Begitu juga dengan letaknya, endospora terletak diberbagai macam tempat diantaranya yakni diujung sel vegetatifnya (terminal), di

dekat ujung sel vegetatif (subterminal), dan ditengah-tengah sel vegetatif (sentral). Ketika bakteri membentuk spora maka spora tersebut dalam keadaan dorman atau tidur. Spora dapat kembali menjadi sel vegetatif ketika lingkungan sekitar telah membaik dan mendukungnya untuk bertumbuh kembang (Boleng, 2015; Hariram & Labbé, 2015).



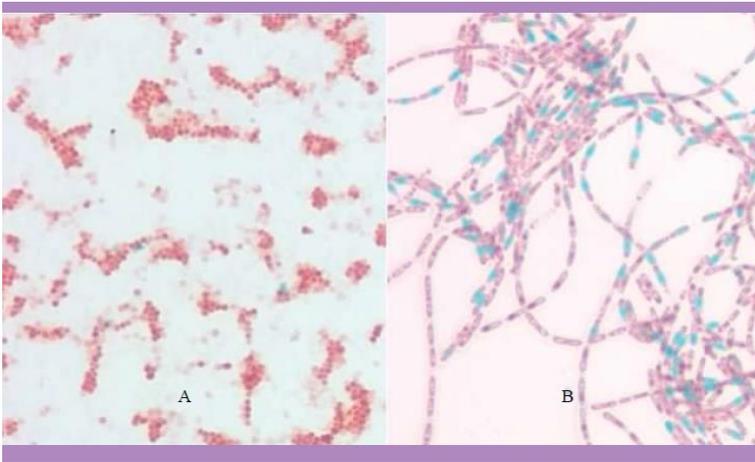
Gambar 12.2. Letak spora di dalam sel (Pelczar & Chan, 1986). (a) letak sentral, (b) Letak terminal, (c) Letak subterminal.

Endospora merupakan struktur berdinding tebal yang berada di dalam sel suatu bakteri (Hariram & Labbé, 2015). Pada suhu yang tinggi, endospora dapat bertahan hidup hingga suhu 150°C. Maka dari itu beberapa bakteri gram positif dapat tahan terhadap panas. Pada suhu yang mendekati nol mutlak, spora bakteri dapat menunjukkan tanda viabilitas yang khas. Adanya endospora pada bakteri dapat menjaganya terhadap adanya zat kimia contohnya seperti trifenilmetana. Selain itu, bisa menjaga dari adanya sinar ultraviolet, pH yang ekstrim, kekurangan nutrisi, dan kekeringan. Endospora dapat kembali menjadi sel bakteri yang aktif ketika lingkungan sekitar mendukung bakteri tersebut untuk tumbuh dan bereproduksi. Adapun lingkungan sekitar yang mendukung ini ketika suhu telah kembali optimal serta adanya

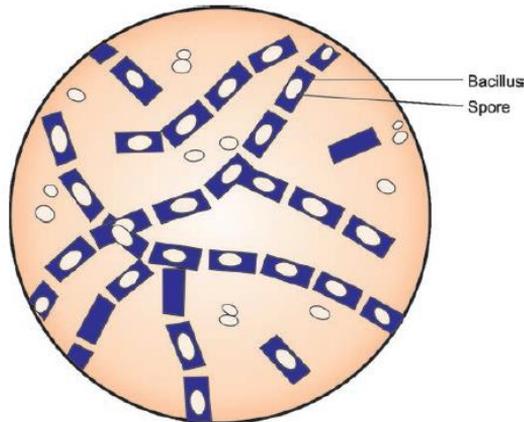
difusi nutrisi dan juga air dari dinding sel bakteri (Basta & Annamaraju, 2023).

Bacillus merupakan salah satu bakteri yang menghasilkan endospora sebagai pertahanan dalam mengatasi perubahan lingkungan seperti perubahan kadar air, temperature, dan bahkan kadar nutrisi. Bakteri ini termasuk genus Rhizobacteria. Bakteri ini mampu bertahan dan beradaptasi di lingkungan yang mendukung dan bagus untuk berkembang. Bakteri ini mempunyai kemampuan dalam menghasilkan antimikroba juga bisa untuk menghambat adanya bakteri patogen. Adapun jenis bacillus diantaranya *Bacillus* sp. *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* (Sumardi, 2012) dan (Madigan et al., 2003). *Bacillus* berbentuk batang yang masuk ke dalam bakteri gram positif dan sifatnya aerobik (Holt et al., 1994). Bakteri ini dapat tumbuh pada pH 7,3-10,5 dan suhu kisaran 25°-35°C. akan tetapi bacillus ini juga dapat tumbuh pada suhu maksimum 40°-45° C (Handayani et al., 2023).

Clostridium juga salah satu bakteri yang menghasilkan endospora. Berdasarkan endospore yang dihasilkan, letak, ukuran, dan bentuk dapat digunakan dalam mengidentifikasi diferensial dari jenis clostridium. *Clostridium* memiliki karakteristik yakni berbentuk batang gram positif, anaerob, motil, dan memiliki sifat patogenitas ketika bakteri tersebut menghasilkan eksotoksin (Hirsh & Zee, 1999; Quinn et al., 2003).



Gambar 12.3. Perbedaan bakteri yang membentuk spora dan yang tidak membentuk spora (Widyarman et al., 2019).
 (A) *Staphylococcus epidermidis* tidak membentuk endospora, (B) *Bacillus cereus* membentuk endospora



Gambar 12.4. Bakteri *Bacillus* dengan spora (Kumar, 2012).

Endospora pada bakteri tidak bisa diwarnai dengan metode pewarnaan bakteri biasa (pewarnaan sederhana dan pewarnaan gram). Hal ini karena pewarnaan tersebut tidak dapat menembus dinding dari endospora tersebut. Sifat dari endospora yaitu susah diwarnai dengan pewarnaan biasa, akan tetapi ketika endospora terwarnai maka akan sulit untuk hilang. Maka dari itu,

pewarnaan spora dilakukan untuk melihat dengan jelas adanya spora pada bakteri (Kumar, 2012; Mirawati & Lestari, 2017).

Salah satu pewarnaan yang dapat digunakan pada pemeriksaan endospora yaitu dengan pewarnaan Klein. Prosedur pewarnaan ini seperti halnya pewarnaan tahan asam yang membutuhkan panas untuk mempermudah pada saat pewarnaan. Pewarnaan ini dilakukan dengan menambahkan karbol fuchsin pada suspensi bakteri yang setelah itu di panaskan. Fungsi adanya pemanasan pada prosedur pewarnaan endospora ini yaitu agar lapisan luar spora mengembang sehingga zat warna yang digunakan dapat masuk ke dalam spora (Kumala, 2006; Kumar, 2012). Pada pewarnaan spora menggunakan metode Klein ini, interpretasi yang didapat yakni spora akan berwarna merah dan badan bakteri akan berwarna biru (Widyarman et al., 2019). Adapun prosedur pewarnaan spora metode Klein sebagai berikut:

Alat:

1. Ose
2. Object glass
3. pipet
4. Bunsen
5. Jembatan pewarna
6. Mikroskop

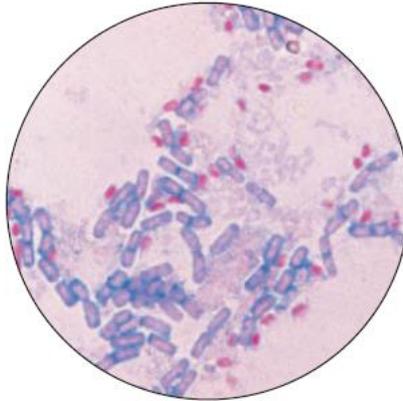
Bahan:

1. Biakan bakteri
2. Minyak imersi
3. Reagen:
 - Karbol fuchsin 0,5%
 - H_2SO_4 1%
 - Metilen blue 1%
 - Aquades steril

Prosedur:

1. Buatlah suspensi dari biakan bakteri didalam tabung dengan menggunakan air garam faal hingga larutan berubah menjadi keruh.

2. Lalu tambahkan fuchsin karbol dengan perbandingan yang sama dengan volume suspensi bakteri.
3. Panaskan dengan menggunakan api kecil selama 5-6 menit, jangan sampai mendidih.
4. Fiksasi objek glass, lalu ambil suspensi bakteri dengan menggunakan ose dan goreskan pada objek glass.
5. Keringkan preparat dan fiksasi kembali. Setelah itu letakkan sediaan di atas jembatan pewarnaan.
6. Teteskan larutan H_2SO_4 1% selama 2-3 detik, lalu cuci dengan air mengalir.
7. Genangi preparat dengan metilen blue selama 4 menit.
8. Cuci dengan air mengalir dan keringkan.
9. Setelah itu lanjutkan dengan pengamatan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x.
10. Amati hasil pewarnaan spora. Hail yang didapat apabila bakteri membentuk spora yaitu spora akan berwarna merah dan badan bakteri akan berwarna biru.



Gambar 12.5. Pewarnaan Endospora, spora berwarna merah dan sel vegetatif bakteri berwarna biru (Willey et al., 2008)

DAFTAR PUSTAKA

- Artati, D., & Oman, M. (2019). Identifikasi Bakteri Melalui Penggunaan Kit Analytical Profile Index (API) 20E. *Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur*, 17(2), 149–153. balitbang.kkp.go.id/index.php/btla/article/view/8601/6565
- Badaring, D. R. W. M. F., & Bahr, A. (2020). Identifikasi Morfologi Mikroba Pada Ruangan. Prosiding Seminar Nasional Biologi Fmipa Unm: Inovasi Penelitian Biologi Dan Pembelajarannya Di Era Merdeka Belajar. *Prosiding*, 161–167. <https://ojs.unm.ac.id/semnasbio/article/view/15301>
- Basta, M., & Annamaraju, P. (2023). *Bacterial Spores*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Boleng, D. T. (2015). *Bakteriologi*. Malang: UMM Press.
- Cappuccino, J. G., & Welsh, C. (2018). *Microbiology* (11th ed.). England: Pearson.
- Handayani, K., Royanti, V., & Ekowati, C. N. (2023). Indeks Keanekaragaman Bakteri Bacillus Sp. Dari Tanah Kebun Raya Liwa. *Gunung Djati Conference Series*, 18(7), 46–52. <https://conference.uinsgd.ac.id/index.php/>
- Hariram, U., & Labbé, R. (2015). Prevalensi spora dan toksigenisitas isolat Bacillus cereus dan Bacillus thuringiensis dari rempah-rempah eceran AS. *J Food Prot*, 78(3), 590–596. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25719886/>
- Hirsh, D. C., & Zee, Y. C. (1999). *Veterinary Microbiology*. USA: Blackwell Science.
- Holt, G., Krieg, R., Sneath, P., Staley, J., & Williams, S. (1994). *Bergey's Manual of Determinative*. Philadelphia: A Wolters Kluwer Company.
- Kumala, W. (2006). *Diagnosis Laboratorium Mikrobiologi Klinik*.

Jakarta: Universitas Trisakti.

- Kumar, S. (2012). *Textbook of Microbiology*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2003). *Biology of Mikroorganisms*. USA: Pearson Education.
- Mirawati, M., & Lestari, E. (2017). Pengaruh Pemberian Karbol Fuchsin dan Pemanasan Sputum Sebelum Pembuatan Sediaan Terhadap Hasil Pewarnaan BTA. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Kesehatan*, 5(1), 23–33. <https://ejurnal.poltekkesjakarta3.ac.id/index.php/jitek/article/download/59/135/>
- Pelczar, M. J., & Chan, C. S. (1986). *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Press.
- Pratiwi, K. N. F., Mastra, N., & Yanty, J. S. (2020). Identifikasi Bentuk Bakteri Dari Swab Tangan Petugas Pengangkut Sampah Di Desa Dalung, Kecamatan Kuta Utara, Kabupaten Badung. *Skripsi*. Poltekkes Denpasar.
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., Hartigan, P., Fanning, S., & Fitzpatrick, E. S. (2003). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. USA: Blackwell Science.
- Sumardi, D. (2012). Isolasi dan karakterisasi *Bacillus* sp. Penghasil Antimikroba dari Saluran Pencernaan Ayam kampung *Gallus doesticus*. *Jurnal Prosiding SNSMAIP III. Prosiding*. 306–311.
- Tortora, G. ., Funke, B. ., & Case, C. L. (2010). *Microbiology*. Sanfrancisco: Benjamin Cumming.
- Widyarman, A. S., Erfan, E., Binarta, C. T. O., & Sunoto, R. I. (2019). *Mikrobiologi*. Jakarta: Universitas Trisakti.
- Wiley, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2008). *Prescott,Harley, and Klein's Microbiology* (7th ed.). United States: McGraw-Hill.

BIODATA PENULIS



Chylen Setiyo Rini., Lahir di Surabaya pada 4 April 1985. Jenjang S1 ditempuh di ITS. Pendidikan S2 di UNAIR dengan konsentrasi Mikrobiologi. Saat ini aktif sebagai dosen Program Studi D4 Teknologi Laboratorium Medis Universitas Muhammadiyah Sidoarjo, Mata kuliah yang diampu antara lain bakteriologi dan mikologi. Penulis aktif melakukan riset dibidang mikrobiolgi dan menerbitkan beberapa publikasi ilmiah. Penulis dapat dihubungi pada email: chylensetiyorini@umsida.ac.id

BAB 13

STERILISASI

* Mulya Fitrah Juniawan, S.Si., M.Si *

A. Pengertian Sterilisasi

Sterilisasi dalam mikrobiologi berarti membebaskan setiap benda atau substansi dari semua kehidupan dalam bentuk apapun (Yulia, 2023).

Sterilisasi adalah proses pembunuhan atau pemindahan mikroorganisme dan spora yang hidup dari sediaan untuk menghasilkan keadaan yang steril dengan cara yang mungkin. Sterilisasi merupakan suatu proses untuk membunuh mikroorganisme sampai ke sporasporanya, yang terdapat di dalam bahan makanan. Proses ini dilakukan dengan cara memanaskan makanan sampai temperatur 121oC, selama waktu 15 menit (Hendrawati & Utomo, 2017). Tujuan sterilisasi dalam mikrobiologi adalah mematikan, menghambat pertumbuhan dan menyingkirkan semua mikroorganisme yang ada pada alat dan bahan yang akan digunakan dalam suatu pekerjaan guna menciptakan suasana aseptis (Murtius, 2018).

Beberapa faktor yang perlu diperhatikan dalam sterilisasi antara lain kepadatanmuatan, volume cairan, dan ukuran wadah yang dipakai. Umumnya bahan yang memakan tempat dan mendekati kedap air memerlukan pemanasan lebih lama. Volume media di dalam botol atau labu jangan sampai melebihi dua pertiga tinggi wadah. Wadah sterilisasi yang berukuran kecil semakin baik digunakan. Sebagai contoh jika ingin mensterilkan lima liter media lebih baik menggunakan lima labu yang masing-masing berisi satu liter media daripada menggunakan satu labu yang berisi lima liter

media. Volume yang lebih kecil memerlukan waktu sterilisasi yang lebih pendek. Jadi, lamanya siklus sterilisasi harus disesuaikan dengan ukuran dan jumlah wadah. Hal yang harus diperhatikan pula yaitu botol tidak boleh disumbat terlalu ketat sehingga kedap udara. Untuk menyumbat dapat digunakan kapas yang kemudian dilindungi dengan kertas atau aluminium foil supaya kapas tidak terkena tetesan air sewaktu sterilisasi. Apabila perlu, dapat juga digunakan sumbat karet, tutup sekrup, atau tutup plastik. Laju pendinginan dan pembebasan tekanan harus dilakukan dengan perlahan-lahan untuk mencegah pecahnya perangkat kaca pada waktu siklus sterilisasi telah selesai. Untuk itu, suhu di dalam autoklaf harus dibiarkan turun kembali seperti suhu kamar sebelum tutup autoklaf dibuka (Susilo et al., 2022).

B. Metode Sterilisasi

Metode atau teknik sterilisasi yang dilakukan untuk menghasilkan produk yang steril dan bebas dari mikroorganisme dikelompokkan menjadi 3 golongan yaitu :

1. Metode Fisika: Proses sterilisasi dilakukan dengan pemaparan panas maupun menggunakan teknik radiasi sinar elektromagnetik, proses sterilisasi tanpa menggunakan zat atau bahan kimia. Prinsip kerja sterilisasi metode fisika adalah membunuh mikroorganisme karena rusaknya sel dari efek panas dan efek sinar radiasi.
2. Metode Kimia : Proses sterilisasi dilakukan dengan menggunakan bahan kimia yang memiliki kemampuan untuk membunuh mikroorganisme. Proses sterilisasi dapat dilakukan dengan cara menghembuskan bahan kimia yang telah diformulasikan dalam bentuk uap. Proses sterilisasi dapat dilakukan juga dengan cara merendam atau mencuci produk dalam cairan bahan kimia yang memiliki efek membunuh mikroorganisme.
3. Metode Mekanik : Proses sterilisasi untuk produk atau sediaan dalam bentuk cairan dan dilakukan dengan cara menyaring mikroorganisme dengan penyaring atau filter khusus. Mikroorganisme akan “tertangkap” atau tersaring

pada filter sehingga cairan yang mampu melewati filter dalam kondisi steril dan bebas mikroorganismenya. (Edy & Parwanto Edy, 2024)

1. Sterilisasi Metode Fisika

Sterilisasi metode fisika digolongkan dalam 2 kelompok besar berdasarkan prinsip kerjanya yaitu :

- a. Metode Sterilisasi Fisika Menggunakan Teknik Pemanasan
- b. Sterilisasi dengan pemanasan memiliki 2 penggolongan metode kerja yaitu :

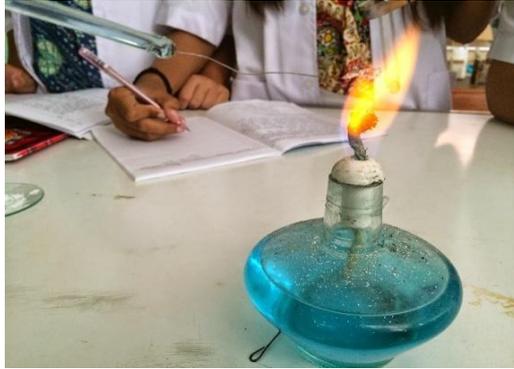
Sterilisasi Panas Kering : Beberapa metode yang dapat dilakukan dalam metode sterilisasi panas kering adalah :

- Udara panas pada oven : Alat yang digunakan dalam proses sterilisasi adalah oven. Proses sterilisasi menggunakan oven cocok dan sangat efektif untuk alat atau produk farmasi yang tahan terhadap pemanasan seperti alat gelas dan alat bedah. Obat atau sediaan farmasi yang cocok dilakukan sterilisasi panas kering adalah golongan minyak, parafin, dan serbuk kering. Proses sterilisasi panas kering menggunakan suhu udara yang cukup tinggi yaitu di atas 140° C dan dapat dilakukan dalam waktu yang cukup lama. Pemaparan dengan suhu tinggi dan waktu yang cukup lama mampu secara efektif membunuh mikroorganismenya baik dalam bentuk vegetatif maupun spora (Edy et al., 2024).



Gambar 13.1. Sterilisasi Menggunakan Oven (Murtius, 2018)

- Udara panas pada penangas minyak : Proses sterilisasi menggunakan penangas minyak yang mampu menghasilkan panas hingga suhu 300°C. Panas pada alat penangas minyak bersumber dari energi listrik yang akan dialirkan atau dihantarkan oleh minyak yang terdapat pada alat dimana minyak tersebut telah mengalami saturasi pada ruang sterilisasi pada alat. Proses sterilisasi cocok untuk sediaan obat yang telah dikemas dalam ampul. Alat-alat kesehatan terutama alat bedah cocok disterilisasi dengan metode ini karena mampu mempertahankan ketajaman pisau dan gunting bedah (Edy et al., 2024).
- Pemijaran langsung pada api : Proses sterilisasi dilakukan dengan melewati obyek yang akan disterilisasi pada api yang menyala dan panas. Alat sterilisasi yang umum digunakan di laboratorium adalah lampu bunsen atau penyembur api (gas torch atau flame gun). Proses sterilisasi pemijaran langsung cocok dilakukan untuk alat jarum, spatula logam, filter logam dan mulut tabung reaksi.



Gambar 13.2. Sterilisasi dengan Pemijaran Api (Wulandari et al., 2021)

- Keuntungan sterilisasi panas kering diantara lain:
 - 1) Dapat mensterilkan beberapa jenis bahan yang tidak dapat ditembus steam seperti serbuk kering dan bahan minyak.
 - 2) Tidak memiliki sifat korosif pada logam.
 - 3) Melalui mekanisme konduksi dapat mencapai seluruh permukaan alat yang tidak dapat dibongkar pasang (Wenda, 2023).
- Sterilisasi Panas Lembab (basah) : Metode sterilisasi panas lembab biasanya dilakukan menggunakan alat Autoclave Prinsip kerja sterilisasi autoklaf adalah menggunakan uap air yang panas dan diberikan tekanan pada ruang dimana produk dilakukan sterilisasi. Berikut adalah beberapa metode sterilisasi yang masuk dalam kelompok yang menggunakan metode panas lembab :
 - Uap air bertekanan : Proses sterilisasi menggunakan alat autoklaf dengan prinsip kerja memanaskan air sehingga menghasilkan uap panas bertekanan yang akan mengalir memenuhi ruang sterilisasi. Suhu, tekanan dan lama waktu proses sterilisasi dalam autoklaf dapat diatur dan ditentukan secara otomatis. Waktu atau lama sterilisasi akan mulai dihitung ketika suhu dan tekanan dalam ruang sterilisasi telah sesuai dengan yang dikehendaki. Secara umum proses

sterilisasi menggunakan panas basah uap air bertekanan dengan alat autoklaf adalah yang paling efektif (Edy et al., 2024).



Gambar 13.3. Sterilisasi Menggunakan Autoklaf (Murtius, 2018)

- Uap air suhu 100°C : Proses sterilisasi menggunakan uap air yang mendidih dan uap tersebut dialirkan memenuhi ruang sterilisasi. Proses sterilisasi metode ini cocok untuk obatobatan berbentuk larutan dan juga mengandung bahan pengawet atau bakterisida. Metode sterilisasi menggunakan uap efektif membunuh mikroorganisme patogen khususnya bakteri non-spora.
- Uap air mengandung bakterisida : Metode sterilisasi ini menggunakan metode pemanasan uap air pada suhu 100°C dan ditambah bakterisida. Beberapa contoh bakterisida yang bisa digunakan adalah fenol 0,5%, karbutanol 0,5% dan fenil merkuri 0,002% (Edy et al., 2024).

2. Sterilisasi Metode Kimia

Sterilisasi secara kimia yaitu memaparkan alat atau bahan yang mengandung mikroorganisme terhadap suatu senyawa kimia sehingga dengan suatu reaksi tertentu dapat membunuh atau menghentikan

pertumbuhan mikroorganisme tersebut tanpa merusak bahan atau alat yang disterilisasi. Selain waktu sterilisasi, efektivitas suatu senyawa kimia dalam membunuh mikroorganisme dipengaruhi oleh beberapa faktor :

- Jumlah mikroorganisme. Semakin besar jumlah kontaminan maka semakin lama waktu sterilisasi.
- Keadaan populasi mikroorganisme. Seringkali kontaminan yang harus dimusnahkan bukan satu spesies, melainkan campuran bakteri, jamur, spora dan virus sehingga membutuhkan spektrum bahan antimikroba yang luas.
- Temperatur dan pH dari lingkungan.
- Konsentrasi (dosis) senyawa antimikroba.
- Cara senyawa antimikroba dalam membunuh (mode of action).
- Adanya pelarut, senyawa organik lain yang menginterferensi dan inhibitor seperti saliva, darah dan feces.

Senyawa kimia yang paling banyak digunakan sebagai desinfektan (senyawa yang dapat menghancurkan sel) antara lain CuSO_4 , AgNO_3 , HgCl_2 , ZnO , alkohol dan campurannya. Beberapa larutan garam seperti NaCl (9%), KCl (11%), dan KNO_3 (10%). Basa kuat dan asam kuat dapat juga digunakan karena mampu menghidrolisis sel mikroorganisme.

Larutan KMnO_4 (1%) dan HCl (1,1%) merupakan desinfektan kuat. HgCl_2 (0,1%) banyak digunakan hanya sifatnya sangat beracun dan korosif. Klor banyak digunakan sebagai desinfektan terutama pada tempat penyimpanan air, larutan lain yang juga dapat digunakan yaitu larutan formalin (4-20%).

Sterilisasi adalah mematikan seluruh (total) mikroorganisme yang hidup pada suatu alat atau bahan. Namun istilah desinfeksi dapat memberi kesempatan beberapa mikroorganisme dapat survive. Desinfektan adalah agen kimia yang digunakan untuk mendesinfeksi objek tidak hidup (inanimate) seperti permukaan benda. Terminologi sanitasi digunakan untuk mendeskripsikan kombinasi desinfeksi dan pembersihan. Proses perusakan sel yang disebabkan desinfektan dapat berupa koagulasi atau denaturasi protein karena bereaksi dengan enzim mikroorganisme. Berikut adalah jenis-jenis senyawa kimia yang bersifat desinfektan.

Alkohol; atau ethanol telah digunakan sebagai desinfektan sejak lebih dari seabad lalu. Alkohol lebih efisien dalam mematikan mikroorganisme pada konsentrasi dibawah 100%. Dengan adanya air bercampur alkohol maka denaturasi protein lebih mudah terjadi (seperti halnya uap panas lebih efisien dibanding panas kering). Konsentrasi yang sering digunakan untuk desinfektan adalah 70%. Selain mendenaturasi protein, alkohol juga dapat melarutkan lemak sehingga berpengaruh terhadap membran sel dan kapsul beberapa jenis virus. Sel vegetatif dan hifa dapat dimatikan dengan alkohol, namun spora seringkali resisten. Alkohol juga dapat digunakan sebagai pelarut desinfektan lain, seperti iodine yang dapat meningkatkan efektivitas desinfeksinya.

Halogen; merupakan salah satu jenis halogen adalah klorin. Klorin (Chlorine) efektif sebagai desinfeksi dalam bentuk gas bebas dan sebagai senyawa pelepas klorin seperti chlorite dan chloramines. Gas klorin (compressed) umumnya digunakan sebagai

desinfektan pada pengolahan air, kolam renang atau untuk keperluan industry. Bentuk senyawa klorin lainnya adalah Sodium hypochlorite (bleach) yang dapat mengoksidasi gugus sulphhydryl (-SH) dan disulphide (S-S) pada protein. Seperti klotrin, hipoklorit dapat diinaktivasi dengan keberadaan materi organik. Senyawa lain yang lebih stabil yaitu chloramines yang memiliki keunggulan lebih tahan terhadap bahan organik. Chloramines juga lebih tidak beracun dan mampu melepas klorin secara perlahan sehingga memperpanjang efek bakterisidal desinfektan ini. Jenis halogen lain adalah iodine. Daya kerja iodine adalah bereaksi dengan residu tyrosin pada protein. Efek desinfeksi iodine dapat ditingkatkan dengan melarutkannya pada ethanol 70% (iodine1% +ethanol70%).

Senyawa fenol (Phenolics); Senyawa fenol memiliki gugus asam karboksilat yang bersifat mematikan dengan daya kerja merusak protein dan membrane. Salah satu keuntungan menggunakan senyawa fenol adalah tetap aktif walaupun terdapat senyawa organik dan detergen. Desinfektan seperti Dettol, Lysol dan Chlorhexidine adalah derivatif dari senyawa fenol. Salah satu senyawa fenol bernama Hexachlorophene sangat efektif membunuh bakteri gram positif seperti staphylococci atau streptococci sehingga digunakan sebagai salah satu bahan pembuatan sabun, deodorant dan shampo.

Surfactants; molekul surfactans atau surface active agents seperti sabun dan detergen memiliki kemampuan memposisikan dirinya sendiri sejajar diantara dua lapisan. Dengan sifat ini maka bahan tidak larut air akan dilingkupi oleh molekul surfactans. Sabun ataupun detergen lebih berguna untuk memfasilitasi pemindahan kotoran dan

mikroorganisme dibandingkan dengan sifat desinfektannya. Pemindahan kotoran dapat terjadi karena bahan tidak larut air seperti sekret minyak pada kulit dan kotoran akan dilarutkan (emulsifying) pada air sehingga dapat dibasuh dan dibuang. Detergen dapat berupa anionic (bermuatan negatif), cationic (bermuatan positif) atau non ionic. Detergen cationic seperti quaternary ammonium compounds (senyawa ammonium kuartener) dapat melisis sel dengan berkombinasi terhadap phospholipids membran sel dan merusaknya.

Ethylene oxide; pada umumnya pendedahan secara kimia seperti contoh diatas adalah hanya bersifat desinfeksi. Namun jika menggunakan gas ethylene oxide maka baik sel vegetatif, spora dan virus dapat dimusnahkan sehingga istilah yang digunakan adalah sterilisasi. Gas ethylene oxide umumnya dipakai untuk sterilisasi peralatan kedokteran dalam jumlah dan material yang tidak tahan panas seperti plastik. Sedangkan pada industri pangan gas ini digunakan sebagai zat antifungi fumigant untuk buah-buahan kering, bawang dan kacang. Bahan yang akan disterilisasi ditempatkan ke dalam wadah tertutup kemudian diisi gas dengan udara lembab pada 40-50°C selama beberapa jam. Ethylene oxide sangat mudah terbakar dan penggunaannya dapat dengan mencampurkan 10% gas ini ke dalam gas lain yang tidak mudah terbakar seperti karbondioksida. Bahan yang telah disterilisasi menggunakan gas ethylene oxide harus dibasuh dengan udara segar untuk menghilangkan gas ini karena sangat bersifat toksik. Cara kerja gas ethylene oxide membunuh mikroorganisme adalah dengan mendenaturasi protein dengan memindahkan hydrogen labil seperti pada gugus sulphhydryl dengan hydroxyl ethyl radical (Hafsan, 2024).

3. Sterilisasi Metode Mekanik

Sterilisasi metode mekanik dilakukan dengan bantuan alat berupa filter atau saringan. Proses sterilisasi metode mekanik atau dikenal juga dengan istilah sterilisasi filtrasi. Sterilisasi mekanik dengan filtrasi dilakukan terhadap bahan-bahan yang tidak tahan terhadap proses filtrasi baik secara fisika (pemanasan) maupun paparan bahan kimia. Proses sterilisasi filtrasi atau mekanik biasanya dilakukan terhadap produk yang berbentuk cairan. Prinsip kerja sterilisasi filtrasi adalah mengalirkan produk melalui filter sehingga mikroorganisme dan pengotor lainnya akan tersaring sehingga diperoleh produk cairan yang steril.

Filter untuk penyaringan berupa membran tipis dengan pori-pori yang dapat dilalui cairan tetapi mampu menyaring partikulat. Ukuran besar pori-pori pada membran filter yang biasa digunakan adalah 0,22 μm . Membran filter harus tervalidasi mampu menyaring mikroorganisme baik dalam bentuk vegetatif maupun dalam bentuk spora secara sempurna. Proses sterilisasi menggunakan membran filter harus dilakukan secara aseptis dalam ruangan khusus dan dengan peralatan yang steril.

Berikut adalah beberapa contoh filter atau membran filter yang bisa digunakan dalam proses sterilisasi metode mekanik :

- Membran Filter Seitz : Membran filter terbuat dari asbes dan diletakkan pada dasar wadah besi yang digunakan untuk proses penyaringan atau filtrasi.
Keuntungan dari membran filter seitz diantaranya adalah:
 - Dapat dilepas dari wadah besi sehingga dapat dengan mudah dicuci atau dibersihkan dan mudah untuk diganti dengan membran filter yang baru.

- Tidak mengembang jika terpapar larutan alkohol sehingga cocok untuk melakukan sterilisasi cairan yang mengandung alkohol.

Kerugian dari membran filter seitz diantaranya adalah:

- Membran dapat melepas zat magnesium yang mencemari larutan yang disterilkan. Pencegahan pelapasan zat magnesium dengan cara mencuci membran filter menggunakan larutan asam klorida (HCl) kemudian dibilas menggunakan air bersih.
- Serat-serat pada permukaan membran dapat terlepas dan mencemari larutan sehingga tidak cocok untuk sterilisasi larutan injeksi. Pengatasan masalah ini adalah meletakkan membran nilon atau sutra dibawah membran seitz agar serat yang terlepas dapat tersaring.
- **Membran Filter Swinny** : Merupakan pengembangan dari membran filter seitz yang terbuat dari asbes. Membran filter swinny sudah dilapisi atau dibungkus dengan kertas khusus dan sudah disterilisasi menggunakan autoklaf. Membran filter swinny digunakan pada proses filtrasi atau sterilisasi menggunakan tekanan atau vakum dimana larutan “dipaksa” melewati membran filter.

Keuntungan dari membran filter swinny diantaranya adalah :

- Ukuran pori-pori membran filter swinny sangat kecil sehingga mampu menyaring partikel yang berukuran kecil. Akurasi penyaringan lebih tinggi.
- Tahan terhadap berbagai macam zat kimia, sehingga cocok untuk menyaring berbagai jenis larutan obat.
- Sterilisasi membran filter terjamin karena sudah dibungkus kertas khusus dan telah disterilisasi menggunakan autoklaf.

Kerugian dari membran filter swinny diantaranya adalah:

- Membutuhkan tambahan alat khusus yaitu vacum untuk memberikan tekanan pada saat proses filtrasi.
- Proses filtrasi membutuhkan waktu yang lebih lama karena larutan lebih susah melewati pori-pori membran yang sangat kecil.
- Membran Filter Fritted-Glass : Membran filter yang terbuat dari kaca fritted atau kaca yang diperkuat dengan campuran serat. Membran filter kaca fritted digunakan dalam proses filtrasi pada ruang hampa udara. Keunggulan membran filter kaca fritted mampu menjaga konsistensi aliran cairan yang sedang difilter.
- Membran Filter Berkefeld dan Mander : Membran filter jenis ini terbuat dari silikon murni, asbes dan kalsium fosfat. Membran filter tipe ini akan mampu menyaring mikroorganisme dan mengikat ion yang bermuatan negatif. Kedua jenis membran filter ini banyak digunakan dalam proses sterilisasi air untuk memperoleh air bersih dan bebas mikroorganisme (Edy et al., 2024)

DAFTAR PUSTAKA

- Edy, H. J., & Parwanto Edy. (2024). Teknologi Dan Formulasi Sediaan Steril. In Andriyanto (Ed.), *Teknologi Dan Formulasi Sediaan Steril*.
- Hafsan. (2024). *Mikrobiologi Analitik* (F. Nur, Ed.; 1st ed.).
- Hendrawati, T. Y., & Utomo, S. (2017). Optimasi Suhu Dan Waktu Sterilisasi Pada Kualitas Susu Segar Di Kabupaten Boyolali. *Jurnal Teknologi*, 9(2), 97-102. <https://doi.org/10.24853/jurtek.9.2.97-102>
- Murtius, W. S. (2018). *Modul Praktek Dasar Mikrobiologi*.
- Susilo. (2022). *Penuntun Praktikum Mirobiologi Dasar* (1st ed.). www.mitrailmumakassar.com
- Wenda, A. (2023). *Perancangan Alat Sterilisator Peralatan Medis Menggunakan Arduino Uno (Evaluasi Kinerja Fuzzy Logic Kontrol)* (1st ed.). www.mitrailmumakassar.com
- Wulandari, S., Nisa, Y. S., Taryono, Indarti, S., & Sayekti, Rr. R. S. (2021). Sterilisasi Peralatan Dan Media Kultur Jaringan. *Agrinova: Journal of Agrotechnology Innovation*, 4(2), 16-19. <https://jurnal.ugm.ac.id/Agrinova/>
- Yulia, N. (2023). *Buku Ajar Mikrobiologi Dan Parasitologi* (1st ed.).

BIODATA PENULIS



Mulya Fitrah Juniawan, S.Si., M.Si. lahir di Indonesia, Kabupaten Nusa Tenggara Barat, Sumbawa 24 Juni 1990. Jenjang Pendidikan S1 ditempuh di Universitas Negeri Surabaya, Kota Surabaya lulus tahun 2013. Pendidikan S2 Biologi, lulus tahun 2015 di Universitas Airlangga. Saat ini bekerja sebagai Dosen Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan di Universitas Muhammadiyah Surabaya. Buku yang sudah di terbitkan Fitoremediasi Mangrove dalam penurunan kadar logam Pb, Hg dan Cu tahun 2023. Saat ini tinggal di Sidoarjo dan terus bekerja untuk dunia pendidikan, melindungi dan melestarikan keanekaragaman hayati Indonesia melalui penelitian, penulisan, artikel dan advokasi.

BAB 14

Isolasi Bakteri

* Kasmuddin Darmo, S.Si., M.Kes *

A. Definisi Isolasi Bakteri

Bakteri merupakan bentuk kehidupan tertua, tersederhana dan paling berlimpah di muka bumi. Bakteri merupakan organisme satu-satunya yang tergolong prokaryotik. Suatu penelitian melaporkan bahwa bakteri berhasil diisolasi dari batuan yang berusia 3,8 milyar tahun, dan diperkirakan bakteri telah ada 2 milyar sebelum eukaryotikada di mukabumi. Bakteria fotosintetik atau dikenal sebagai “cyanobacteria” adalah bakteri yang pertama kali menghasilkan oksigen di permukaan bumi sebelum tanaman berklorofil. Bakteri memiliki peranan penting dalam produktivitas dan siklus senyawa-senyawa penting bagi makhluk hidup, dan bakteri merupakan satu-satunya organisme yang memiliki kemampuan memperbaiki nitrogen atmosfer. Kemampuan untuk menumbuhkan dan membiakkan berbagai spesies bakteri adalah keterampilan penting yang diperlukan dalam mikrobiologi. Bakteri terdapat di mana-mana dalam berbagai kondisi, termasuk di tanah, air, dan makanan, serta di dalam tubuh manusia. Setiap jenis bakteri ini memiliki persyaratan pertumbuhannya sendiri dan dapat dibudidayakan atau ditumbuhkan dengan memberikan keseimbangan nutrisi yang baik dan juga dengan kondisi pertumbuhan yang sesuai, seperti suhu dan tingkat oksigen yang optimal.

Dunia mikroorganisme terlalu luas dan begitu juga dengan isolasi mereka, sehingga dikelompokkan ke dalam

empat kelompok besar berdasarkan signifikansi mereka dalam kehidupan manusia, penting secara klinis, terkait dengan pertanian, terkait dengan produk susu, ekstremofil, dan mikroorganisme yang signifikan secara industri. Prasyarat untuk penyelidikan biokimia dan fisiologis mikroorganisme adalah isolasi dan pengelolaan kultur murni. Satu-satunya kriteria kemurnian mutlak untuk kultur bakteri adalah bahwa kultur tersebut berasal dari keturunan sel tunggal. Hal ini diperlukan untuk mengidentifikasi situs atau lokasi yang memungkinkan di mana mikroorganisme spesifik atau kelompok terkait dapat ditemukan. Selanjutnya, prosedur pengambilan sampel yang tepat dan pemrosesan yang tepat untuk mengisolasi organisme dapat menuntun ahli mikrobiologi ke arah yang benar. Untuk mengisolasi mikroorganisme, pertama-tama seseorang harus mengidentifikasi lokasi di mana kemungkinan menemukannya tinggi, mengikuti prosedur pengambilan sampel yang benar, kultur pengayaan, dan teknik penyaringan. (Gupta, 2023)

Setelah terjadi pertumbuhan bakteri, maka yang harus dilakukan selanjutnya adalah memisahkan bakteri menjadi koloni individu di atas agar. Hal ini memungkinkan kita mengamati karakteristik individu bakteri dan dapat membantu mengidentifikasi spesies yang tidak diketahui dalam sampel yang berbeda. Ada banyak sekali berbagai media yang dapat dipilih saat menumbuhkan bakteri. Banyak di antaranya mengandung substrat spesifik yang digabungkan untuk membantu mengidentifikasi bakteri dan yang mengungkapkan karakteristik individu bakteri. Untuk mengetahui bakteri mana yang sedang diperiksa maka langkah selanjutnya adalah membiakkan koloni Tunggal sehingga memungkinkan untuk mengonfirmasi bahwa tidak adanya bakteri pencemara dan menyediakan koloni tunggal murni yang kemudian dapat digunakan untuk menginokulasi percobaan yang lebih kompleks.

Dalam memulai suatu pengujian guna mendeteksi bakteri maka hal yang paling awal dilakukan adalah mengisolasi bakteri dari sumbernya misalnya dari specimen darah, nanah, dahak, luka, air liur atau isolasi dari lingkungan seperti air, tanah, udara, makanan atau dari hewan. Isolasi bakteri adalah suatu metode utama untuk memisahkan kelompok-kelompok mikroorganisme sehingga dapat membedakan berbagai kelompok bakteri berdasarkan pola pertumbuhannya. Bakteri yang berbeda akan tumbuh secara berbeda pada suatu media nutrisi dimana semua itu akan tergantung pada persyaratan pertumbuhan pada bakteri dan faktor-faktor lain seperti suhu, pH, ketersediaan oksigen, dll.

Isolasi bakteri merupakan suatu tahapan penting untuk identifikasi dan klasifikasi bakteri. . Isolasi Bakteri Pada umumnya menggunakan media tumbuh di laboratorium yang bersifat umum dan semua jenis bakteri dapat tumbuh pada media tersebut dalam kondisi lingkungan aerob kecuali bakteri yang memiliki sifat yang khusus (Bakteri anaerob, Bakteri Tuberkulosis atau *Mycobacterium Leprae*, *Helicobacter pylori* dll), Jenis-jenis media tumbuh yang umum digunakan adalah Lactose Broth, Nutrien Agar, Nutrient Broth, Mac Conkey. Isolasi dan identifikasi bakteri adalah suatu topik yang sangat luas dan dapat dikerjakan oleh orang-orang yang telah berpengalaman, ini adalah suatu tantangan yang menarik bagi para mikrobiologis (Patra et al., 2020).

Jenis specimen yang diambil untuk diagnose tergantung dari jenis penyakit dan spesies penderita. Penanganan tiap macam Spesimen dan pendekatannya disesuaikan, Dimana hal yang perlu diperhatikan adalah “ apakah specimen yang akan di ambil masih dapat diisolasi atau dikendalikan agen penyebab penyakitnya untuk diagnose Mikrobiologi, dimana specimen harus cukup banyak dengan kualitas yang memadai. Pengetahuan tentang isolasi dan identifikasi suatu mikroorganisme sangat penting untuk untuk

mengukuhkan diagnose penyakit. Pentingnya mengisolasi suatu mikroba dari lingkungan, seperti makanan (substrat padat), minuman (substrat cair), dan dari sampel cairan manusia karena banyaknya mikroba yang sulit diamati atau dibedakan secara langsung dengan menggunakan panca indera. Sebuah sampel dapat mengandung bakteri atau jamur tetapi dengan mengisolasi maka bentuk koloni dan kandungan dalam sampel dapat diamati. Bakteri dari udara dan flora normal membentuk koloni dengan tepian berbentuk lobate, sedangkan bakteri yang terdapat pada sampel air membentuk koloni dengan tepian yang tidak beraturan dan ada juga jamur yang ditemukan pada sampel air. Teknik isolasi bakteri menggunakan beberapa metode kultur dan non-kultur. Spesimen dapat dibiakkan dan diisolasi dari media kultur padat dan cair. Pertumbuhan bakteri dalam medium kultur padat dan cair ditandai dengan munculnya koloni yang khas dan kekeruhan. Metode kultur yang memberikan karakteristik koloni dan sifat-sifat biokimia merupakan suatu keharusan untuk mendapatkan diagnose yang konklusif, Teknik Kultur dan pencegahan bakteri pencemar wajib diperhatikan, yang wajib diperhatikan dalam Teknik kultur adalah pembatasan organisme dari suatu group terbatas, seperti dalam contoh berikut :

1. Satu laboratorium kedokteran akan membatasi pengamatan terhadap adanya pathogen tertentu
2. Laboratorium Makanan hanya mencari organisme tertentu berkenaan dengan produk-produk makanan spesifik
3. Suatu Laboratorium Pemerintah daerah mungkin hanya ingin menentukan ada tidaknya mikroorganisme tertentu untuk mengevaluasi efektivitas penanganan limbah atau derajat pencemaran sumber air
4. Suatu laboratorium penelitian hanya membatasi untuk menisolasi suatu organisme yang dapat melakukan tugas-tugas tertentu, seperti fotosintesis, Penambatan nitrogen, atau penguraian pestisida.

Isolat Bakteri yang telah Tumbuh pada media akan memperlihatkan ciri-ciri pertumbuhan yang dapat dilihat terutama morfologi seperti warna koloni, permukaan koloni ,tepi koloni dan arah pertumbuhan. Bentuk morfologi dapat merupakan tahap awal dalam membedakan isolate bakteri dari sampel. Untuk lebih meyakinkan kemurnian dari isolate maka perlu dilakukan penggoresan Kembali pada media tumbuh yang baru. Jika didapatkan koloni Tunggal dengan bentuk morfologi yang sama dengan isolate bakteri asal maka pengujian dapat dilanjutkan untuk karakteristik lebih lanjut:

Pengamatan Bentuk Morfologi dapat diamati dari :

1. Bentuk dasar Koloni (Flat). Pengamatan terhadap koloni dengan bentuk bulat, Berlingkar, Berserabut bercabang-cabang atau bentuk yang tidak beraturan .
2. Bentuk penampang koloni (Elevation). Pengamatan dilakukan terhadap koloni dengan mengamati secara penampang melintang untuk melihat perbedaan bentuk seperti bentuk rata, melengkung ,konvex
3. Bentuk tepi Koloni (Margin) bentuk tepi koloni bakteri yang dapat diamati adalaah bentuk rata, bergelombang atau tidak beraturan.
4. Permukaan Koloni. Bentuk permukaan koloni untuk membedakan permukaan koloni yang ada seperti rata, kasar,mengkilat,berpasir atau keriput
5. Warna Koloni. Berbagai warna koloni dapat menjadi dasar membedakan bakteri walaupun pada umumnya koloni bakteri tampak berwarna putih.

Identifikasi awal juga meliputi pengamatan bentuk mikroskopik melalui pewarnaan sel bakteri seperti pewarnaan negative,pewarnaan gram,pewarnaan tahan asam dan lain-lain. Pewarnaan yang paling umum dilakukan dilaboratorium adalah pewarnaan gram(Mutmannah et al., n.d.).

B. Media Tumbuh Bakteri

Medium biakan Bakteri buatan adalah nutrisi yang digunakan oleh bakteri Dimana menyediakan zat-zat makanan yang cukup untuk pertumbuhan bakteri. Penggunaan media tumbuh bakteri sangat ditentukan oleh kebutuhan guna pengujian bakteri. Ada beberapa jenis medium yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri pada medium biakan yang non selektif seperti medium pengaya dan medium agar darah atau medium selektif diman bakteri diseleksi sesuai jenis yang tumbuh akibat penambahan zat-zat tertentu sehingga dapat menekan pertumbuhan bakteri yang tidak diinginkan .

Klasifikasi Medium berdasarkan Fungsinya

1. Enrichment medium (Medium diperkaya) merupakan medium yang ditambah zat-zat tertentu misalnya serum,darah,ekstrak tumbuh-tumbuhan dan lain-lain sehingga dapat digunakan untuk menumbuhkan mikroba heterotroph tertentu. Tujuannya untuk mengaktifkan mikroba tersebut.
2. Selektif Medium (Medium Selektif) merupakan medium yang ditambah zat kimia tertentu yang bersifat selektif untuk mencegah pertumbuhan mikroba lain seperti medium yang mengandung kristal vilaet pada akadar tertentu sehingga mencegah pertumbuhan bakteri gram positif tanpa memepengaruhi pertumbuhan bakteri gram negative .
3. Differential medium (Medium Diferensiasi) merupakan medium yang ditambahkan zat kimia tertentu yang menyebabkan suatu mikroba membentuk pertumbuhan atau menagadakan perubahan tertentu sehingga dapat dibedakan tipenya misalnya medium agar agar darah dapat dipakai untuk membedakan bakteri hemolitik dan non hemolitik
4. Assay Medium (Medium penguji) merupakan medium dengan susunan tertentu yang digunakan untuk

- pengujian vitamin-vitamin, asam -asam amino, antibiotic dan lain-lain
5. Medium untuk perhitungan jumlah mikroba, yaitu medium spesifik yang digunakan untuk menghitung jumlah bakteri, Actinomycetes dan lain-lain
 6. Medium umum merupakan medium yang dapat digunakan untuk menumbuhkan semua mikroba misalnya Nutrient Agar, PDA dsb
 7. Medium Khusus, yaitu medium untuk menentukan pertumbuhan mikroba dan kemampuannya mengadakan perubahan-perubahan kimia tertentu

Contoh Media Bakteri yang Umum digunakan : Media Nutrien Agar

Media yang digunakan untuk penanaman bakteri yang mendukung pertumbuhan berbagai bakteri yang tidak susah pertumbuhannya. Nutrien agar sangat populer karena bisa menumbuhkan berbagai jenis bakterii dan jamur dan memiliki banyak nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri. Komposisi ; 0,5 % pepton (Pepton merupakan sumber nitrogen untuk pertumbuhan bakteri), 0,3% beef extract/Yeast extract (Komponen yang dibutuhkan bakteri yang mengandung vitamins, karbohidrat, nitrogen dan garam), 1,5% Agar (Bahan pematid media bakteri), 0,5% NaCl, aquadest (Ph Netral 7,4 pada suhu 25 °C).

Contoh Media Selektif bakteri yang umum digunakan : Media Eosin Methylene Blue Agar

Secara umum Media EMB agar adalah media isolate untuk membedakan bakteri Enterobacteriaceae. EMB Agar adalah media yang digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya bakteri koliform didalam suatu sampel . Media Eosin Methylene Blue agar ini mempunyai keistimewaan mengandung laktosa dan berfungsi untuk membedakan bakteri yang mempermentasikan laktosa seperti S. Aureus, P

aeruginosa, dan Salmonella. Bakteri yang memfermentasi laktosa menghasilkan koloni dengan inti berwarna gelap dengan kilap logam. Sedangkan bakteri lain dapat tumbuh koloninya tidak berwarna. Fungsi dari eosin dan metilen blue memebnatu mempertajam perbedaan warna. Jika media ini digunakan pada tahap awal, bakteri lain bisa juga tumbuh P,aeruginosa dan Salmonella sp. Hal ini dapat menimbulkan keraguan. Media ini sangat efektif untuk mengkonfirmasi bahwa kontaminan tersebut adalah E.coli. Media ini berbentuk padat berguna untuk menjaga sel tidak berpindah tempat sehingga akan mudah dihitung dan dipisahkan jenisnya Ketika tumbuh menjadi koloni. Media padat juga menampakkan difusi hasil metabolit bakteri sehingga memudahkan dalam pengujian suatu hasil metabolit.

Komposisi : Pepton 10 g (peptone adalah produk hidrolisis protein hewani atau nabati seperti otot,liver,darah,susus,casein,lactalbumin gelatin dan kedelai. Sebagai sumber protein untuk mikroorganisme yang akan dibiakan), Laktosa 10 g (laktosa berfungsi untuk memisahkan bakteri yang memfermentasi laktosa seperti E.Coli dengan bakteri yang tidak memfermentasi laktosa seperti S. aureus, Pseudomonas aeruginase dan Salmonella. Berfungsi sebagai sumber karbohidrat untuk pertumbuhan mikroorganisme), Dipotassium hydrogen phosphate 21 g (Merupakan garam yang sangat larut dalam air. Bahan ini berfungsi sebagai pupuk, makanan aditif dan zat penyangga, Eosin 0,4 g (Berfungsi sebagai indicator warna), Methylene blue 0,06 g (Berfungsi sebagai indicator warna), Agar 15 g (Agar berfungsi untuk pematatan media)

Tabel 14.1. Contoh Medium Pertumbuhan mikroba

Medium	Bahan Utama	Penggunaan
Agar Darah	Agar diperkaya + 5% darah Domba	Medium Non selektif untuk Sebagian besar bakteri gram negative yang mudah tumbuh dari bakteri gram positif
Campylobacter Medium	Bahan Dasar agar diperkaya dengan vankomisin, trimethoprim, amfoterisin	Medium selektif untuk Campylobacter
Agar coklat	Agar darah dipanaskan .sel-selnya lisis danmelepaskan factor pertumbuhan khusus	Biakan untuk haemophilus dan neisseria spp
Agar sikloserin selositin Fruktosa	Bahan dasar kuning telur dengan fruktosa dan antibiotika	Medium spesifik untuk clostridium diffcile
Agar Deoksikolat sitrat	Bahan Dasar agar pepton termasuk laktosa, deoksikolat dan indicator netral	Medium selektif untuk salmonella dan shigella
Agar darah kanamysin	Bahan dasat agar darah dengan kanamisisn	Isolasi selektif untuk bacteroides spp

Agar Besi Kligler (KIA)	Bahan dasar agar pepton dengan laktosa, glukosa, fenol merah dan besi sitrat	Medium selektif untuk membedakan shigella dan salmonella dan entrobacteria ceae lainnya
Loweinstein Jansen Medium	Medium dengan bahan dasar kuning telur dengan malasit hijau	Medium selektif untuk mikobakteria
Mac Conkey Agar	Bahan dasar pepton berisi garam empedu dan merah netral, peragi laktosa akan menghasilkan asam oleh karena itu membentuk koloni warna merah muda	Medium dengan derajat selektivitas rendah untuk bakteri enteric yang dapat membedakan kuman yang meragi laktosa dengan tidak meragi laktosa
Agar garam mannitol	Bahan dasar pepton berisi mannitol, natrium klorida dan fenol merah	Medium selektif dan diferensial untuk mengisolasi Staphylococcus aureus

Salmonella Shigella Agar	Medium berbahan dasar pepton, berisi garam empedu,laktosa,merah netral dan besi sitrat	Medium selektif untuk mengisolasi salmonella dan shigela
Agar sorbitol Mac Conkey	Bahan dasar pepton berisi garam empedu,sorbitol dan merah netral	Menbedakan E.Coli yang tidak meragi sorbito (E.Coli 0157)
Agar darah telurit	Agar darah dengan kalium telurit	Medium selektif untuk Corynebacterium diphteriae yang mengubah telurit dan membentuk koloni hitam
Agar Thayer martin	Bahan dasar agar darah dengan tambahan dan antibiotika termasuk kolistin dan vankomisin	Medium selektif untuk mengisolasi Neisseria spp
Agar Garam Empedu tisuifat (TCBS)	Bahan dasar pepton termasuk tiosulfat, sitrat, sukrosa dan biru timol	Medium selektif untuk Vibrio spp, Vibria Cholera meragi sukrosa dan membentuk koloni kuning

Agar Deoksikolat silosa lisin (XLD)	Ekstrak ragi dengan lisin, silosa, laktosa dan besi sitrat	Medium selektif dan dapat dipakai untuk membedakan shigella (Koloni merah muda) dan Salmonella (Koloni merah muda / Hitam
-------------------------------------	--	---

Sumber (Hart,T and P.Shears, 1996)

C. Media, Kondisi Kultur Dan Kebutuhan Nutrisi

Untuk menumbuhkan bakteri yang diinginkan baik di laboratorium dibutuhkan media pertumbuhan. Media ini biasanya tersedia dalam bentuk agar atau kaldu (agar semipadat), yang memiliki komposisi yang sangat bervariasi tergantung pada yang ingin ditumbuhkan. Kebutuhan nutrisi bakteri yang berbeda dapat sangat bervariasi dan media serta nutrisi yang memiliki efek yang besar pada pertumbuhan bakteri. Secara umum, pekerjaan dengan media di laboratorium terbagi dalam dua kategori umum yaitu media yang didefinisikan secara kimia (juga dikenal sebagai media sintetis) dan media yang tidak didefinisikan (juga dikenal sebagai media kompleks). Media yang ditentukan secara kimia: Seperti namanya, jenis media ini dibuat menggunakan bahan-bahan tertentu yang sudah diketahui sehingga komposisi pasti dari produk akhir dapat diketahui. Media ini sering digunakan untuk menumbuhkan bakteri yang memiliki persyaratan pertumbuhan tertentu. Media ini meliputi media seperti M9 Minimal Salts Broth dan glucose salts broth. Media kompleks: Jenis media ini mengandung satu atau beberapa komponen yang tidak sepenuhnya terkarakterisasi. Media ini dapat

memiliki komposisi yang bervariasi dan cenderung menjadi media kaya yang menyediakan berbagai macam asam amino, gula, dan nutrisi lain yang dibutuhkan bakteri untuk tumbuh. Komponen yang tidak terdefinisi ini dapat berasal dari sumber tumbuhan atau hewan dan dapat mencakup ragi atau ekstrak daging sapi. Contohnya meliputi agar/kaldu nutrisi, agar/kaldu kedelai triptik, agar/kaldu Luria-Bertani, dan agar/kaldu infus jantung otak.

Media ini dirancang untuk mendukung pertumbuhan berbagai macam bakteri. Jika Anda memilih yang tepat, Anda akan dapat menggunakannya untuk memelihara kultur Anda setiap hari dengan memproduksi pelat gores, yang memungkinkan isolasi koloni tunggal. Ini juga akan membantu Anda mengidentifikasi bakteri yang tidak diketahui dari sampel, seperti dari usapan kulit. Agar bakteri tumbuh dengan baik baik dalam kaldu, maupun pada agar yang telah Anda sediakan, Anda juga perlu mengendalikan beberapa faktor lingkungan. Oleh karena itu, Anda perlu mengetahui kisaran suhu, pH, dan tingkat oksigen optimal yang diperlukan untuk menumbuhkan bakteri. Jika Anda mencoba menumbuhkan anaerob, Anda perlu bekerja di dalam lemari anaerob; jika laboratorium Anda tidak memilikinya, Anda dapat bekerja dengan tabung gas anaerob, yang, digunakan bersama dengan kantong khusus, menciptakan lingkungan anaerob di dalam tabung.

D. Metode Isolasi

Teknik isolasi atau penanaman mikroba untuk menanam suatu mikroba perlu diperhatikan faktor-faktor nutrisi serta kebutuhan akan oksigen. penumbuhan mikroba yang anaerob berbeda dengan yang anaerob. Mengisolasi suatu mikroba adalah suatu Tindakan Dimana memisahkan mikroba tersebut dari lingkungannya di alam dan menumbuhkannya sebagai biakan murni dalam media pertumbuhan. Seorang Peneliti wajin memahami syarat-syarat pertumbuhan dan cara-

cara menanamnya, serta bagaimana cara memurnikannya. Di alam mikroba sangat susah ditemui dalam keadaan murni, pada umumnya telah campuran bermacam- macam spesies mikroba. Berbagai macam cara dalam mengisolasi dan menanam mikroba diantaranya :

1. Spread plate method (teknik sebar/tebar)

Metode spread plate adalah salah satu metode isolasi mikroba dengan metode menginokulasi kultur mikroba secara pulasan/ sebaran di permukaan media supaya yang sudah memadat. Spread plate adalah salah satu teknik yang paling banyak digunakan untuk mengisolasi mikroorganisme, terutama bakteri dari sampel campuran dalam sampel. Prinsip metode ini yakni spesimen cair yang diencerkan yang mengandung satu atau lebih mikroorganisme, spesies yang sama atau berbeda, akan disebar di atas media agar padat yang sesuai, masing-masing mikroorganisme yang layak akan berkembang biak membentuk koloni yang terpisah. Koloni ini dapat dihitung dan dinyatakan dalam bentuk CFU/mL yang dapat digunakan untuk menghitung beban mikroba dalam sampel. Sejumlah volume tertentu dari sampel yang telah diencerkan, biasanya 0,1 mL (0 hingga 1 mL dapat digunakan), disalurkan ke permukaan media padat yang telah disterilkan sebelumnya. Biasanya, batang kaca bengkok atau kapas atau manik-manik kaca digunakan untuk menyebarkan sampel. Setelah inkubasi selama 24 - 48 jam pada suhu 37°C, mikroorganisme yang layak dalam sampel akan tumbuh menjadi koloni yang terlihat jelas di permukaan media. Koloni yang terlihat dapat dihitung dan CFU/mL dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut;

$$CFU/mL = \frac{\text{Total number of colonies obtained} \times \text{dilution factor}}{\text{volume of specimen used (aliquot)}}$$

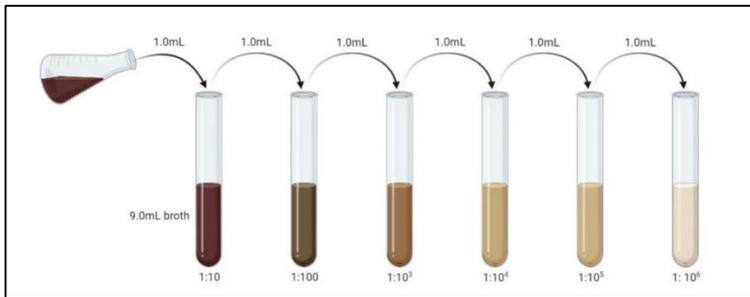
Teknik ini melibatkan penyebar yang disterilkan. Metode ini dilakukan dengan mengencerkan biakan kultur mikroba. Karena konsentrasi sel- sel mikroba pada umumnya tidak diketahui, sehingga pengenceran perlu dilakukan beberapa tahap, sehingga sekurang- kurangnya terdapat satu dari pengenceran itu yang memiliki koloni terpisah(30- 300 koloni). Koloni mikrobial yang terpisah memungkinkan koloni tersebut bisa dihitung(Tantray et al., 2023).

Perlu diingat bahwa dalam melakukan metode ini Sampel harus dalam keadaan cair atau suspensi. Sampel yang padat harus dilarutkan dalam pelarut yang sesuai Dimana pelarut harus steril Dimana tidak terdapat aktifitas penghambat atau pemacu pertumbuhan terhadap mikroorganisme serta tidak bereaksi terhadap komponen dari media kultur. Dilakukan pengenceran hingga mendapatkan 20 - 300 CFU / mL yang terisolasi dengan baik per piring setelah inkubasi. Media kultur yang digunakan yang berkualitas baik

E. Prosedur Isolasi metode spread plate:

1. Persiapan sampel

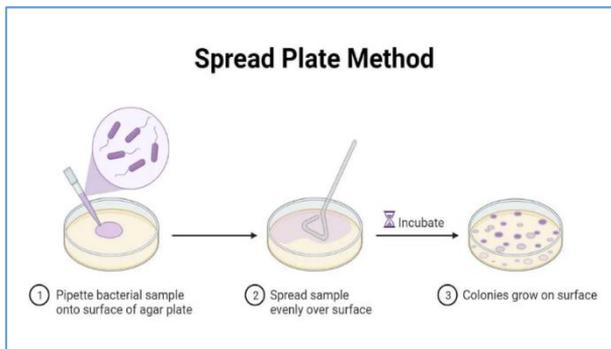
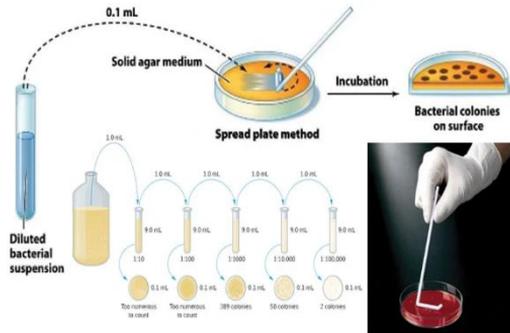
Sampel cair terlebih dahulu diencerkan secara serial untuk mengurangi beban mikroba kisaran 20 - 300 CFU/mL. Jika dalam keadaan padat atau semi padat, larutkan dengan pelarut yang sesuai untuk menyiapkan suspensi. Suspensi kemudian harus diencerkan secara serial untuk mengurangi beban mikroba pada kisaran yang diinginkan. (Umumnya, 1 gram sampel dicampur dengan 9 ml pelarut untuk mendapatkan konsentrasi 10⁻¹ gram/mL), atur penyebar. Menggunakan batang kaca yang steril.



Gambar 14.1 Seri Pengenceran (Sumber : <https://shorturl.asia/ml9Nr>)

2. Spread Plate Menggunakan batang kaca atau logam yang dibengkokkan

Buka tutup cawan dan keluarkan 0,1 mL sampel yang telah diencerkan di tengah cawan petri menggunakan pipet yang telah dikalibrasi atau pipet mikro. menggunakan batang kaca yang ditebuk secara steril, sebarkan sampel secara merata ke seluruh bagian cawan. Menggerakkan batang secara bolak-balik akan memudahkan menyebarkan sampel. Anda harus menggerakkan penyebar dalam jalur melingkar atau dalam gerakan maju mundur untuk menyebarkan sampel secara merata. Terakhir, gerakkan penyebar dengan gerakan melingkar di sekitar tepi piring untuk memastikan bahwa sampel tersebar merata di bagian sudut. Pasang penutupnya, biarkan piring dalam posisi tegak dan biarkan sampel terserap selama sekitar 5 menit. Kemudian inkubasi pelat dalam posisi terbalik.



Gambar 14.2. Metode Spread Plate (Sumber : <https://shorturl.asia/ml9Nr>)

3. Spread Plate dengan manik-manik kaca: “Metode Copacabana”

Buka sebagian tutup cawan petri dengan ibu jari dan jari telunjuk Anda, lalu keluarkan sekitar 10-12 manik-manik kaca steril. Keluarkan 0,1 mL sampel yang telah diencerkan di bagian tengah cawan petri dengan menggunakan pipet yang telah dikalibrasi atau pipet mikro. Tutup penutupnya dan goyangkan cawan dengan gerakan horizontal sehingga manik-manik menyebarkan sampel secara merata ke seluruh permukaan media agar. Ulangi pengocokan sebanyak 6 - 7 kali. Putar lempeng searah jarum jam atau berlawanan arah

jarum jam sebanyak 60° dan sekali lagi goyangkan lempeng dengan gerakan horizontal sebanyak 6 - 7 kali. Sekali lagi, putar cawan ke arah yang sama sebesar 60° dan goyangkan cawan dengan gerakan horizontal sebanyak 6 - 7 kali. (Pada saat ini, sampel akan tersebar secara merata, tetapi jika Anda merasa sampel tidak tersebar secara merata, Anda dapat mengulangi proses pengocokan). Biarkan piring dalam posisi tegak dan biarkan sampel terserap selama sekitar 5 menit. Buang manik-manik ke dalam wadah yang berisidisinfektan (pemutih klorin 10%, etanol, dll.) Inkubasi pelat dalam posisi terbalik (S. W. BORENSTEIN, 1994).

F. Pour plate method (Tabur)

Metode pour plate merupakan teknik laboratorium mikrobiologi untuk mengisolasi dan menghitung mikroorganisme yang hidup dalam sampel cair, yang ditambahkan bersama atau sebelum media agar cair sebelum dipadatkan. Teknik ini digunakan untuk menghitung jumlah total unit pembentuk koloni (CFU) di dalam atau pada permukaan media padat. Teknik ini sebagian besar digunakan untuk menghitung bakteri tetapi dapat pula digunakan untuk Actinobacteria, kapang, dan ragi. Sebelum melakukan teknik pour plate, sampel harus diencerkan secara serial untuk membuat beban mikroba dalam sampel antara 20 - 300 CFU / mL (kisaran penghitungan koloni yang sesuai adalah 20 - 200, beberapa orang menganggapnya 30 - 300, dan rata-rata diambil 25 - 250). Jika sampel berbentuk cair, maka diperlukan pengencerkan secara serial dengan air suling steril atau kaldu steril. Jika sampel berbentuk padat atau semi padat, sampel harus diemulsi terlebih dahulu dan kemudian diencerkan secara serial untuk mengurangi beban mikroba hingga kisaran yang diizinkan. Sampel ditambahkan ke dalam cawan petri kemudian media agar cair dituangkan di atasnya, atau sampel dicampur dengan media agar cair sebelum dituang. Setelah menuangkan ke dalam cawan petri, cawan diputar dengan cepat agar sampel tercampur dengan media. Media

campuran dibiarkan mengeras dan diinkubasi. Setelah inkubasi, jumlah koloni yang terisolasi dihitung. Jika koloni tidak dapat dihitung atau menyatu atau lebih dari 300 CFU / mL atau kurang dari 20 CFU / mL, disarankan untuk mengulangi proses tersebut untuk mendapatkan jumlah yang optimal. Metode ini berdasarkan pada prinsip ketika media agar yang dicampur dengan mikroorganisme diinkubasi, mikroorganisme yang layak akan berkembang biak membentuk koloni yang terpisah. Dalam metode ini, volume tertentu, biasanya 1 mL, dari sampel cair yang diencerkan secara serial dicampur dengan benar dengan sekitar 15 mL media agar cair spesifik sekitar 40 - 45 ° C (kurang dari 50 ° C) dalam cawan petri. Media dibiarkan mengeras dan diinkubasi, pada suhu 37°C selama 24 - 48 jam. Setelah inkubasi, mikroorganisme yang layak dalam sampel akan tumbuh menjadi koloni yang terlihat di permukaan dan di dalam medium. Koloni yang terlihat dapat dihitung dan CFU/mL dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut;

Dasar dari metode ini yaitu menginokulasi medium agar yang sedang mencair pada temperatur 45°-50°C dengan suspensi bahan yang mengandung mikroba, dan menuangkannya ke dalam cawan petri steril. Setelah inkubasi koloni-koloni akan terlihat yang dimana tersebar di permukaan agar yang mungkin berasal dari 1 sel bakteri, sehingga dapat diisolasi lebih lanjut.

$$CFU/mL = \frac{\text{Total number of colonies obtained} \times \text{dilution factor}}{\text{volume of specimen used (aliquot)}}$$

G. Prosedur Metode Pour Plate

1. Persiapan sampel:

sampel yang dalam bentuk cair, terlebih dahulu diencerkan secara serial untuk membuat beban mikroba ke kisaran 20 - 300 CFU/mL apabila sampel berbentuk padat atau semi padat, larutkan dalam air suling steril atau kaldu steril, atau pelarut lainnya. (Umumnya, 1 gram sampel

dicampur dengan 9 ml pelarut untuk mendapatkan konsentrasi 10-1 gram/mL).

2. Persiapan media:

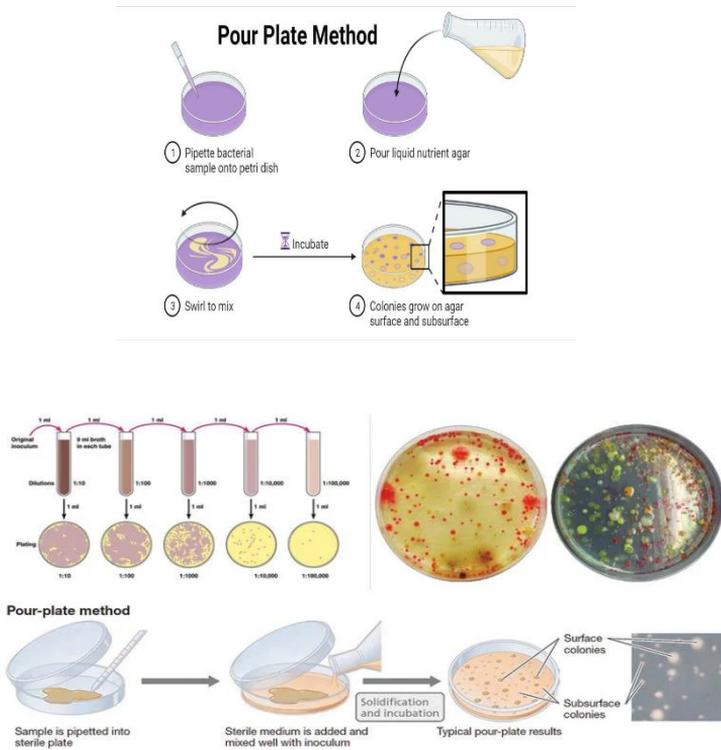
Gunakan Media yang tepat seperti Nutrient Agar dan Plate Count Agar untuk bakteri, serta Potato Dextrose Agar atau Sabouraud Dextrose Agar untuk jamur kemudian siapkan dan autoklaf. Media dibiarkan mendingin hingga sekitar 40 - 45°C (maksimum hingga 55°C), tetapi jangan sampai mengeras. Jika media sudah disiapkan dan mengeras, lelehkan dengan meletakkannya di atas penangas air atau sumber panas lainnya. Ketika akan melakukan pencampur sampel dalam media sebelum dituangkan ke dalam cawan petri, sebaiknya dilakukan penambahan sekitar 15 mL media ke dalam tabung reaksi atau gelas kimia dan mengautoklafnya. Sebagai alternatif, volume media yang tetap dapat disiapkan dalam gelas kimia besar atau botol dan sampel dapat ditambahkan kemudian dengan menghitung volume yang akan setara dengan 1 mL sampel per sekitar 15 mL media. Susun cawan petri steril. Beri label pada tepi bagian bawah cawan dengan faktor pengenceran, tanggal, nama, serta informasi lain yang diperlukan.

3. Inokulasi : Metode - I

Keluarkan 1 ml sampel yang telah diencerkan di tengah-tengah cawan petri dengan menggunakan mikropipet steril atau pipet yang telah dikalibrasi. Buka tutup botol dan nyalakan mulut botol. Tuangkan sekitar 15 ml media cair yang telah disterilkan pada suhu yang sesuai di atas sampel. Tutup penutup pelat kemudian campurkan sampel dalam media dengan benar dengan memutar-mutar pelat secara perlahan. Piring umumnya diputar dalam bentuk "S" atau "8". (Masukkan sampel pada pengenceran tertentu pada pelat yang diberi label dengan faktor pengenceran tertentu).

4. Metode - II

Dalam tabung dengan sekitar 15 mL media cair pada suhu yang sesuai, tambahkan 1 mL sampel. Campur sampel dengan benar di dalam media. Tuang media ke dalam cawan petri steril. Tutup penutup cawan petri. Biarkan media mengeras sepenuhnya. Inkubasi cawan dalam posisi terbalik dalam kondisi inkubasi yang sesuai (umumnya selama 24 jam pada suhu 37°C). (Sanders, 2012)



Gambar 14.3. Metode pour Plate (Sumber : <https://shorturl.asia/StjK>)

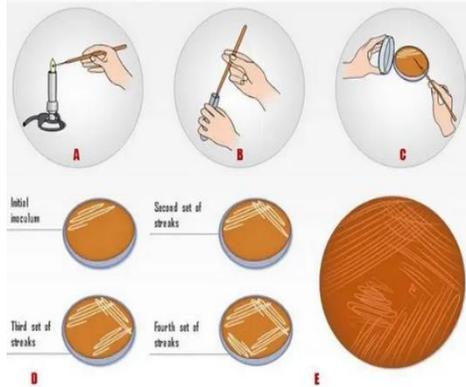
H. Streak Plate Method (Gores)

Metode streak plate adalah teknik laboratorium mikrobiologi untuk mengisolasi kultur murni, dan/atau mendapatkan koloni bakteri yang terisolasi dengan baik dari populasi campuran. Metode ini sebagian besar digunakan untuk mendapatkan kultur murni bakteri; namun, ragi juga dapat diisolasi dengan metode ini. Ini adalah salah satu teknik aseptik yang paling umum digunakan dalam mikrobiologi untuk mengisolasi dan memperbanyak bakteri. Ini adalah teknik isolasi mekanis yang digunakan dalam mikrobiologi, umumnya dikenal sebagai “metode goresan”.

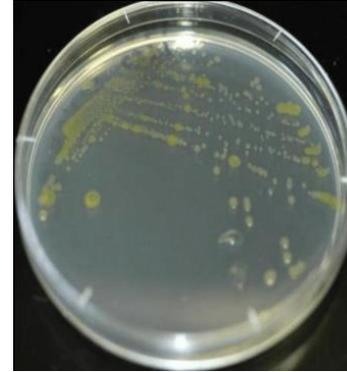
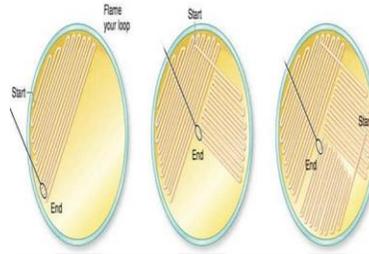
Ini adalah metode yang sangat tua yang digunakan dalam mikrobiologi sejak zaman Robert Koch. Metode ini pertama kali ditemukan dan digunakan oleh Loeffler dan Gaffky di laboratorium Koch untuk mengencerkan bakteri secara serial di atas permukaan agar dan mendapatkan koloni yang terisolasi dengan baik. Sejak saat itu, metode ini digunakan sebagai alat yang sangat penting dalam bakteriologi.

Metode gores paling umum digunakan mengisolasi koloni mikroba pada cawan agar untuk mendapatkan koloni terpisah dan merupakan biakan murni. Dasar metode ini yaitu dengan menggoreskan suspensi bahan yang mengandung mikroba pada permukaan medium agar yang sesuai pada cawan petri. Setelah inkubasi maka pada bekas goresan akan tumbuh koloni-koloni terpisah yang mungkin berasal dari 1 sel mikroba, sehingga dapat diisolasi lebih lanjut. Penggoresan yang sempurna akan menghasilkan koloni yang terpisah. Bakteri yang memiliki flagella seringkali membentuk koloni yang menyebar terutama bila digunakan lempengan yang basah. Untuk mencegah hal itu harus digunakan lempengan agar yang benar-benar kering permukaannya (Fachrial et al., 2019)

The Streak Plate Isolation Method



INOCULATING A PLATE: THE STREAK PLATE TECHNIQUE



Gambar 14.4. (a).Metode streak plate (b).Menginokulasi pelat menggunakan teknik pelat beruntun (c)Isolat bakteri murni yang menggunakan teknik streak plate (Sumber : <https://shorturl.asia/Nk3ag>)

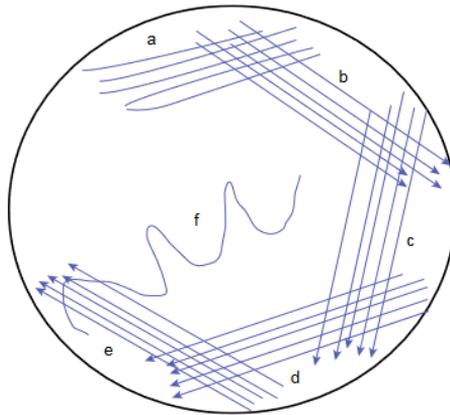
I. Isolasi

Saat bekerja di bidang bakteriologi hal yang sangat penting adalah membudidayakan bakteri guna memperoleh koloni tunggal pada agar. Saat mengkarakteristikan bakteri diperlukan koloni Tunggal untuk memastikan bahwa kultur tidak terkontaminasi. Sehingga diperlukan penyebaran dan pengenceran bakteri. Hal ini sering dilakukan dengan menggunakan metode Streat plate (pelat gores). Untuk melakukan pelat gores, diperlukan pengerjaan secara aseptik dan memiliki kultur (bisa berupa pelat agar lain, kultur kaldu, atau kultur stok -80), pelat agar steril, pembakar Bunsen, dan loop inokulasi (bisa yang plastik steril yang dapat dibuang setelah setiap penggunaan, atau yang logam yang dapat disterilkan dalam api biru di antara gores).

Pastikan pelat agar steril dan telah diberi label sehingga memudahkan identifikasi setelah masa inkubasi. cantumkan jenis media, nama pemeriksa, tanggal, dan nama organisme yang akan di kultur. Penulisan dilakukan di sekeliling tepi piring dan di bagian bawah piring, bukan tutupnya. sehingga memungkinkan untuk melihat agar dan kultur melalui bagian bawah piring dan memudahkan identifikasi setiap piring bahkan jika tutupnya terjatuh atau tercampur. Saat membuat piring guratan, diperlu menyalakan pembakar Bunsen dan mengubahnya menjadi api biru. Ini juga akan lebih mudah jika Anda membalikkan piring agar sehingga tutupnya menghadap ke bawah di bangku. Kemudian, saat Anda mengambil piring untuk menggoreskan bakteri ke atasnya, Anda juga tidak perlu memegang tutupnya; Anda dapat mengembalikan piring ke tutupnya setiap kali Anda perlu membakar lingkaran di antara guratan. Bila Anda menggunakan lingkaran inokulasi logam, Anda perlu meletakkan ujung lingkaran inokulasi tersebut ke dalam api sampai bersinar merah; ini akan mensterilkan lingkaran tersebut. Jika Anda perhatikan api dengan seksama, Anda akan melihat kerucut api biru yang lebih kecil di dalam api yang lebih besar. Ujung kerucut bagian dalam ini adalah

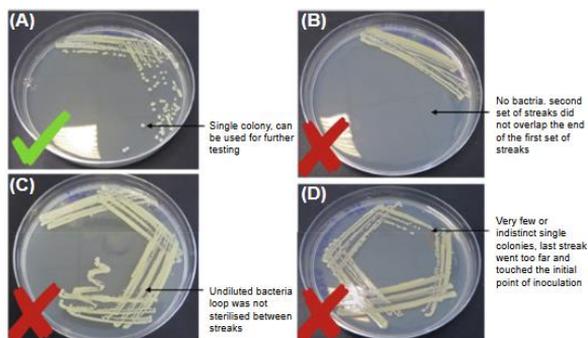
bagian api yang paling panas dan tempat terbaik untuk membakar lingkaran tersebut.

Setelah api menyala merah, Anda dapat mengangkat lingkaran tersebut dan menunggu beberapa detik hingga dingin. Langkah pendinginan ini penting: jika Anda mengambil lingkaran dari api dan langsung menyentuhnya ke sampel bakteri, panas lingkaran tersebut dapat menyebabkan aerosol, yang dapat berbahaya. Anda juga akan membunuh bakteri pada lingkaran yang ingin Anda kultur. Setelah lingkaran itu mendingin, Anda dapat menggunakannya untuk mengambil kultur bakteri. Jika Anda mengambil bakteri dari plat agar lain atau kultur kaldu, Anda melakukannya dengan cara menyentuh loop ke satu koloni di plat atau mengambil satu loop penuh cairan dari kultur kaldu (ingat untuk bekerja secara aseptik dan jangan menaruh tutupnya di atas meja). Kemudian, pindahkan ini ke pelat agar steril dan gerakkan perlahan lingkaran di atas area kecil pelat agar (a pada **Gambar 14.5**).



Gambar 14.5. Diagram cara menyiapkan pelat gores untuk memperoleh kultur bakteri murni. Di antara tiap rangkaian goresan, lingkaran harus disterilkan jika terbuat dari logam atau dibuang jika Anda menggunakan lingkaran plastik steril. (Sumber : Bacteriology Methods for the Study of Infectious Diseases, 2019)

Anda sekarang telah menginokulasi pelat agar Anda, Pada titik ini, Anda perlu membakar lagi loop hingga berwarna merah. Tunggu hingga dingin lalu gunakan loop untuk menggoreskan inokulum ke satu arah, mulai dari tempat inokulum awal dan menjauh darinya di sepanjang salah satu sisi pelat agar (b pada **Gambar 14.5**). Pada titik ini, Anda perlu membakar lagi loop, Tunggu hingga dingin, dan kali ini buat garis-garis bakteri dari ujung rangkaian garis pertama yang Anda buat, sekali lagi dalam satu arah menjauhi garis pertama (c pada **Gambar 14.5**). Anda terus membakar lingkaran dan membuat garis-garis baru hingga Anda telah menggerakkan sebagian besar jalan di sekitar pelat agar (d dan e pada **Gambar 14.5**). Terakhir kali, Anda dapat membakar loop tersebut dan mendinginkannya, lalu buat satu goresan tunggal dari rangkaian goresan terakhir, di bagian tengah pelat agar, pastikan tidak menyentuh goresan lain atau lokasi inokulum awal. Saat Anda melanjutkan melalui goresan, Anda akhirnya akan mendapatkan satu sel bakteri tunggal di permukaan agar, yang akan tumbuh menjadi koloni tunggal saat diinkubasi (**Gambar. 14.6**). Waktu dan suhu saat Anda menginkubasi bakteri akan bergantung pada bakteri yang Anda gunakan, jadi Anda harus memeriksa literatur untuk persyaratan pertumbuhan umum bakteri tertentu. Setelah Anda memiliki koloni tunggal, koloni tersebut dapat dikulturkan kembali ke media lain, diteliti karakteristiknya, atau digunakan untuk membuat stok beku.



Gambar 14.6. Cawan agar yang menunjukkan (A) koloni tunggal bakteri, yang menyediakan kultur bakteri murni untuk digunakan; (B) cawan agar yang di atasnya kawat penghantar tidak dinyalakan di antara goresan, sehingga menghasilkan kultur murni tanpa koloni tunggal; (C) cawan agar yang di atasnya rangkaian goresan kedua tidak melewati rangkaian goresan pertama, sehingga tidak ada bakteri yang menyebar melewati goresan pertama dan tidak ada koloni tunggal; dan (D) cawan agar yang di atasnya goresan terakhir menyentuh inokulasi asli, sehingga tidak ada atau hanya sedikit koloni tunggal yang jelas. Tanda centang hijau menunjukkan bagaimana cawan seharusnya terlihat. Tanda silang merah menunjukkan cawan yang memiliki kesalahan. (Sumber : Sumber : *Bacteriology Methods for the Study of Infectious Diseases*, 2019)

Jika menggunakan ose inokulasi plastik, buang ose asli di antara setiap rangkaian goresan alih-alih membakarnya, dan mulai setiap rangkaian goresan baru dengan ose plastik steril yang baru. Penting untuk membakar ose logam atau membuang ose plastik di antara goresan, karena tujuan dari teknik ini adalah untuk mengencerkan konsentrasi bakteri secara bertahap saat Anda bergerak di sepanjang pelat. Jika Anda tidak membakar atau membuang ose, Anda akan berakhir dengan terlalu banyak bakteri di pelat dan tidak akan mengisolasi koloni Tunggal Jika Anda membuat pelat gores dari kultur beku, prosesnya agak berbeda. Jika menggunakan stok gliserol, gunakan loop untuk mengambil sedikit kultur beku lalu

lanjutkan dengan prosedur seperti yang diuraikan sebelumnya. Jika membuat pelat gores dari manik-manik beku, Anda perlu mengeluarkan satu manik-manik dari botol beku dan meletakkannya di atas pelat agar. Kedengarannya sederhana, namun terkadang sulit untuk mengeluarkan manik-manik dari botol karena manik-manik tersebut seringkali cukup kecil untuk dimasukkan ke dalam botol.

Loop inokulasi. Jika Anda kesulitan mengeluarkan manik-manik dari vial, terkadang berguna untuk menggunakan forsep steril atau ujung pipet 1 mL steril, yang dapat dimasukkan ke dalam lubang di tengah manik-manik beku. Ini akan memungkinkan Anda untuk memindahkan manik-manik dari vial ke pelat agar. Cobalah untuk menyelesaikan ini dengan cepat karena Anda tidak ingin stok mencair di bangku. Anda dapat meletakkan sampel di kotak es saat Anda mengerjakannya, untuk menjaganya tetap dingin. Setelah Anda mengeluarkan manik-manik dari vial dan ke pelat agar, masukkan kembali stok ke dalam freezer. Jika Anda berulang kali mencairkan dan membekukan kembali vial, itu dapat merusak bakteri yang ingin Anda simpan. Selanjutnya, Anda perlu memindahkan atau menggulung manik-manik pada pelat agar sehingga Anda memiliki area inokulasi yang tersembunyi. Gunakan loop inokulasi steril untuk menggores dari area itu dan lanjutkan seperti yang diuraikan sebelumnya. Anda dapat membiarkan manik-manik di atas pelat selama inkubasi atau mengeluarkannya dengan mengetuk pelat di atas wadah pembuangan limbah. Anda mungkin menemukan bahwa bakteri dari freezer memerlukan waktu lebih lama untuk pulih daripada bakteri yang diambil dari kultur segar. Jika demikian, Anda dapat menginkubasi pelat lebih lama hingga terjadi pertumbuhan yang lebih kuat. Saat pertama kali membuat coretan pada pelat, orang menghadapi masalah umum lainnya seperti merusak agar dengan loop dan mendapatkan pertumbuhan yang terlalu banyak atau tidak cukup. Dengan latihan, Anda dapat menghindari masalah ini. Meskipun

demikian, berikut adalah beberapa kiat untuk membantu Anda membuat pelat coretan yang sukses:

1. Pastikan agar sudah benar-benar mengeras sebelum Anda mulai bekerja. Jika masih hangat atau belum sepenuhnya mengeras, Anda mungkin akan membuat lubang di dalamnya dengan loop. Sebaiknya gunakan tepi bawah loop pada sudut yang lebar. Jika Anda menyeret loop di sepanjang agar pada sisinya, Anda dapat mengiris agar, sehingga merusak permukaannya.

2. Saat membakar lingkaran, Anda harus meletakkan kembali cawan agar di atas meja dengan penutupnya. Terkadang sulit untuk mengingat di mana Anda menyelesaikan rangkaian goresan terakhir. Jika Anda mengulangi goresan yang sama, Anda akan melihat pertumbuhan di satu tempat dan tidak ada pertumbuhan di tempat lain. Coba miringkan cawan ke arah cahaya; ini sering kali dapat membantu Anda melihat di mana goresan terakhir berada.

3. Jika Anda tidak menggerakkan loop melewati ujung goresan sebelumnya setelah mensterilkannya, Anda tidak akan mendapatkan pertumbuhan pada area pelat tersebut. Anda dapat meminimalkan kemungkinan kehilangan tempat Anda dengan menyelaraskan inokulum awal dengan tulisan di bagian bawah pelat saat Anda memulai proses. Ini akan memberi Anda titik referensi. Anda juga dapat mencoba memiringkan pelat di bawah cahaya, dan terkadang Anda dapat melihat di mana Anda telah menjalankan loop di sepanjang permukaan agar. Pastikan Anda mempertahankan teknik aseptik saat melakukan ini.

4. Pastikan Anda membakar loop di antara goresan. Jika Anda lupa mensterilkan loop, Anda tidak akan mengencerkan bakteri dan akan menghasilkan pertumbuhan yang kuat pada semua goresan dan tidak akan mendapatkan koloni tunggal (Jenkins & Maddocks, 2019)l.

DAFTAR PUSTAKA

- BORENSTEIN, S. W. (1994). Chapter 2 - Microbiology. In S. W. B. T.-M. I. C. H. BORENSTEIN (Ed.), *Woodhead Publishing Series in Metals and Surface Engineering* (pp. 8–49). Woodhead Publishing.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9781845698621.8>
- Fachrial, E., Harmileni, & Anggraini, S. (2019). Pengantar Teknik Laboratorium Mikrobiologi dan Pengenalan Bakteri Asam Laktat. In *Unpri Press*.
- Gupta, M. K. (2023). *Chapter 1 - Isolation of microorganisms* (A. K. Bhatt, R. K. Bhatia, & T. C. B. T.-B. B. for B. and B. Bhalla (eds.); pp. 3–21). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816109-8.00001-5>
- Jenkins, R., & Maddocks, S. (2019). Bacterial growth in solid and liquid media. *Bacteriology Methods for the Study of Infectious Diseases*, 27–52. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815222-5.00002-x>
- Mutmainnah, H., Gobel, R. B., Djide, N., & Dwyana, Z. (n.d.). *Isolasi dan karakterisasi bakteri probiotik dari saluran pencernaan ayam kampung (Gallus domesticus)*.
- Patra, J. K., Das, G., Das, S. K., & Thatoi, H. (2020). *Isolation, Culture, and Biochemical Characterization of Microbes BT - A Practical Guide to Environmental Biotechnology* (J. K. Patra, G. Das, S. K. Das, & H. Thatoi (eds.); pp. 83–133). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6252-5_4
- Sanders, E. R. (2012). Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. *JoVE*, 63, e3064.
<https://doi.org/doi:10.3791/3064>

Tantray, J. A., Mansoor, S., Wani, R. F. C., & Nissa, N. U. (2023).
Chapter 40 - Spread plate method of the bacterial cells (J. A. Tantray, S. Mansoor, R. F. C. Wani, & N. U. B. T.-B. L. S. M. Nissa (eds.); pp. 167-169). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19174-9.00038-6>

BIODATA PENULIS

Kasmuddin adalah seorang Dosen ATLM di Universitas Megarezky Makassar yang lahir di Tinambu 26 Oktober 1980, Menyelesaikan pendidikan formal SD,SLTP dan SLTA di Polewali Mandar kemudian melanjutkan pendidikan S1 di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin Makassar, Kemudian melanjutkan S2 di Program Pasca sarjana Ilmu biomedik di Universitas Hasanuddin Makassar. Memulai kariernya sebagai seorang Tentor di salah satu Bimbingan Belajar terkemuka di Indonesia bagaian Timur yaitu JILC dan setelah menyelesaikan studi lanjut S2 melambungkan sayapnya sebagai Dosen ATLM kemudian mendalami dunia kepenulisan dan menghasilkan karya-karya yang diminati pembaca.

BAB 15

Media Bakteri

* Yulia Ratna Dewi, S.Tr.A.K., M.Biomed *

A. Pendahuluan

Mikroorganisme, atau sering disebut mikroba, adalah organisme yang hanya dapat dilihat dengan bantuan mikroskop. Mereka dapat berupa sel tunggal, multiseluler, atau kumpulan sel. Mikroorganisme ditemukan hampir di seluruh lingkungan dan memiliki peran penting dalam kehidupan, meskipun beberapa di antaranya dapat menyebabkan gangguan yang signifikan. Secara umum, mikroorganisme diklasifikasikan ke dalam lima kelompok utama: bakteri, archaea, fungi, protozoa, dan virus (Mandal & Kundu, 2021).

Bakteri merupakan organisme mikroskopis uniseluler yang tergolong dalam domain Prokariota. Mereka dikenal karena peran multifungsinya, baik sebagai agen patogen, komponen ekosistem, maupun sumber inovasi dalam bioteknologi. Bakteri memiliki struktur sederhana tanpa membran inti, tetapi memiliki kemampuan metabolisme dan reproduksi yang luar biasa, menjadikannya organisme yang adaptif dalam berbagai lingkungan (Riu et al., 2022).

Identifikasi jenis bakteri bukanlah tugas yang sederhana. Proses ini memerlukan keterampilan khusus dan berbagai informasi pendukung untuk menentukan spesies bakteri yang akan diidentifikasi. Beberapa parameter penting yang perlu diperhatikan meliputi ukuran, bentuk, dan susunan bakteri, reaksi pewarnaan gram, gerakan bakteri, tipe flagel, ukuran serta bentuk koloni, warna koloni, hingga konsistensi koloni bakteri (Putra et al., 2021). Semua karakteristik tersebut menjadi

dasar dalam analisis mikrobiologi untuk memastikan identifikasi yang akurat.

Dalam mendukung proses identifikasi, medium mikrobiologi (media) memainkan peran penting. Media mikrobiologi mengandung nutrisi yang digunakan untuk mengkultur bakteri, ragi, jamur, dan alga. Media ini dirancang untuk menyediakan nutrisi yang diperlukan bagi mikroorganisme agar dapat tumbuh dan bereplikasi. Medium tersedia dalam berbagai bentuk seperti cair, semi-padat, dan padat, dengan tujuan penggunaan yang berbeda-beda. Media tersebut dapat dikategorikan sebagai media pertumbuhan (culture), media diagnostik (identifikasi), media transportasi, media penyimpanan, dan media untuk pengujian (assay) (O. Erkmen, 2021). Klasifikasi ini mencerminkan fleksibilitas media mikrobiologi dalam mendukung berbagai kebutuhan analisis mikroorganisme.

Pada bab ini, pembahasan akan difokuskan pada media bakteri, mulai dari jenis-jenis media yang digunakan, karakteristiknya, hingga fungsinya dalam berbagai aplikasi mikrobiologi. Pemahaman mengenai media bakteri menjadi kunci dalam mengoptimalkan proses identifikasi dan kultur mikroorganisme. Selain itu, media bakteri juga menjadi alat penting dalam mendukung penelitian mikrobiologi modern, seperti pengujian sensitivitas antibiotik, pengembangan produk farmasi, hingga kontrol kualitas dalam industri pangan (Wu-Wu et al., 2023). Dengan pemahaman yang mendalam mengenai media bakteri, analisis mikroorganisme dapat dilakukan dengan lebih efektif, efisien, dan sesuai standar ilmiah yang berlaku.

B. Klasifikasi Media Bakteri Berdasarkan Bentuk

1. Media Cair

Media cair (*liquid media*) adalah salah satu bentuk media mikrobiologi yang tidak mengandung bahan pematat, sehingga tetap dalam bentuk cair pada suhu ruang. Media ini merupakan salah satu jenis media dasar yang paling umum digunakan dalam mikrobiologi untuk mendukung

pertumbuhan mikroorganisme, terutama bakteri, dalam jumlah besar. Media cair biasanya digunakan dalam tabung reaksi, labu Erlenmeyer, atau bioreaktor, tergantung pada skala kultur yang diperlukan (Salwan et al., 2023).

2. Media Semi solid/ semi padat

Media semi-padat adalah media kultur mikroorganisme yang memiliki konsistensi di antara media cair dan media padat (Adi et al., 2022). Media ini mengandung bahan pematat dalam konsentrasi yang lebih rendah, biasanya sekitar 0,3%-0,5% agar. Konsentrasi ini memberikan tekstur kental tetapi tidak sepenuhnya solid, sehingga memungkinkan pergerakan mikroorganisme dalam media (O. Erkmen, 2021).

Media semi-padat sering digunakan untuk:

a. Pengamatan Motilitas Mikroorganisme

Media ini memungkinkan mikroorganisme yang memiliki kemampuan bergerak (motil) untuk bermigrasi ke dalam media, sehingga pola pergerakan mereka dapat diamati. Contohnya adalah uji motilitas menggunakan media sulfida-indol-motility (SIM).

b. Uji Biokimia

Media semi-padat digunakan dalam beberapa pengujian biokimia, seperti uji fermentasi atau produksi gas, karena mikroorganisme dapat tumbuh sambil tetap mempertahankan difusi komponen media.

c. Kultur Mikroorganisme dengan Persyaratan Khusus

Media semi-padat kadang digunakan untuk mendukung pertumbuhan mikroorganisme yang membutuhkan lingkungan dengan viskositas tertentu atau kondisi anaerobik parsial.

Keunggulan media semi-padat adalah kemampuannya untuk menunjukkan motilitas dan reaksi biokimia dengan lebih baik dibandingkan media padat. Hal ini

menjadikannya alat penting dalam penelitian mikrobiologi diagnostik.

3. Media Padat

Media padat adalah media kultur yang mengandung bahan pematat, seperti agar, dalam konsentrasi sekitar 1,5%–2%. Penambahan bahan pematat seperti agar, gelatin, atau silica gel ke dalam media cair membuatnya menjadi padat setelah pendinginan. Agar adalah polisakarida asam yang diperoleh dari alga merah (Rhodophyta), seperti *Gelidium*, dan memiliki sifat unik yang tidak dimanfaatkan oleh mikroorganisme serta tidak menghambat pertumbuhan mereka. Agar membentuk gel setelah campuran dipanaskan hingga di atas 80°C dan kemudian didinginkan, dengan titik solidifikasi sekitar 45°C (O. Erkmen, 2021).

Media padat umumnya digunakan untuk menumbuhkan koloni mikroorganisme secara terpisah, seperti bakteri, ragi, dan jamur, serta untuk isolasi mikroorganisme. Contoh media padat meliputi nutrient agar, brain heart infusion agar, dan potato dextrose agar (Adi et al., 2022). Media ini juga sering digunakan dalam berbagai aplikasi mikrobiologi, termasuk uji sensitivitas antibiotik, identifikasi mikroorganisme, dan pengujian kualitas pangan (Orekan et al., 2021).

Berdasarkan bentuk dan wadahnya, media padat dapat dibedakan menjadi tiga jenis (Atmanto et al., 2022) (O. Erkmen, 2021):

a. Media Tegak (Deep Media)

Media ini disiapkan dalam tabung reaksi yang dibiarkan dalam posisi tegak setelah pendinginan. Biasanya digunakan untuk uji biokimia atau menumbuhkan bakteri anaerob di dasar tabung.

b. Media Miring (Slant Media)

Media ini dibuat dengan memiringkan tabung reaksi saat media masih dalam keadaan panas, sehingga menghasilkan permukaan miring setelah mengeras.

Media miring umum digunakan untuk menumbuhkan stok bakteri karena memaksimalkan area permukaan pertumbuhan.

c. **Media Lempeng (Plate Media)**

Media lempeng dituangkan ke dalam petridish (*plate*) sebagai wadahnya. Jenis ini sering digunakan untuk isolasi koloni bakteri, uji sensitivitas antibiotik, dan pengamatan karakteristik koloni bakteri.

Penggunaan media padat ini memberikan fleksibilitas yang tinggi dalam penelitian mikrobiologi, khususnya dalam kultur dan identifikasi mikroorganisme. Penyesuaian bentuk dan wadah media memberikan efisiensi untuk tujuan aplikasi tertentu.

C. Klasifikasi Media Bakteri Berdasarkan Komposisi Kimia

Berdasarkan komposisi kimianya, media kultur mikroorganisme dapat dibagi menjadi tiga jenis utama, yaitu media alami, media semi-sintesis, dan media sintesis. Pemilihan jenis media bergantung pada tujuan dan kebutuhan eksperimen yang dilakukan. Berikut penjelasan setiap jenis media (Kashyap & Nath, 2023) (Atmanto et al., 2022)(Putri, 2021):

1. **Media Alami (Non-Sintesis)**

Media alami disusun dari bahan-bahan alami yang komposisinya tidak dapat diketahui secara pasti. Media ini biasanya diperoleh langsung dari ekstraksi bahan dasar seperti kentang, tepung, daging, telur, ikan, atau sayuran. Media alami digunakan untuk mendukung pertumbuhan mikroorganisme tanpa kebutuhan akan formulasi kimia yang presisi. Contoh media alami meliputi *tomato juice agar*, *brain heart infusion agar*, dan ekstrak pankreas.

2. **Media Semi-Sintesis**

Media semi-sintesis adalah media yang menggabungkan bahan-bahan alami dengan bahan sintetis. Pada media ini, beberapa komponen memiliki komposisi kimia yang diketahui, sedangkan bahan alami seperti ekstrak kentang atau daging tidak diketahui secara rinci komposisinya.

Contoh media semi-sintesis termasuk *potato dextrose agar* (PDA), yang terdiri dari agar, dekstrosa, dan ekstrak kentang. Media semi-sintesis sering digunakan di laboratorium karena lebih fleksibel dalam aplikasi dan lebih mudah disiapkan dibandingkan media sintesis.

3. **Media Sintesis (Kimiawi Terdefinisi)**

Media sintesis, atau dikenal juga sebagai media kimiawi terdefinisi, disusun sepenuhnya dari senyawa kimia dengan jenis dan takaran yang diketahui secara presisi. Media ini digunakan untuk penelitian yang membutuhkan kontrol ketat terhadap kondisi pertumbuhan mikroorganisme, seperti eksperimen metabolisme atau analisis biokimia. Contoh media sintesis meliputi *MacConkey agar* dan *glucose agar*. Meskipun media sintesis menawarkan keunggulan dalam hal presisi, biaya yang lebih tinggi dan waktu persiapan yang lebih lama menjadi salah satu tantangannya.

Pemahaman mengenai jenis media ini penting untuk memastikan keberhasilan dalam kultur mikroorganisme serta mencapai hasil yang diinginkan sesuai tujuan eksperimen.

D. Klasifikasi Media Bakteri Berdasarkan Fungsinya

Media kultur mikroorganisme memiliki peran penting dalam mendukung pertumbuhan, isolasi, dan identifikasi mikroorganisme. Media ini diklasifikasikan berdasarkan fungsi dan komposisinya untuk memenuhi kebutuhan tertentu dalam berbagai aplikasi mikrobiologi. Berikut adalah klasifikasi dan penjelasan jenis media kultur (Adi et al., 2022),(O. Erkmen, 2021),(Atmanto et al., 2022):

1. **Media Umum (General Purpose Media)**

Media ini digunakan untuk mendukung pertumbuhan berbagai jenis mikroorganisme. Media umum biasanya mengandung sumber karbon, energi (seperti glukosa), garam, asam amino, dan vitamin. Media ini juga sering dibuat dari bahan mentah kompleks, seperti pepton, ekstrak daging, atau ekstrak ragi. Contoh media umum meliputi *nutrient broth*, *tryptone soy broth*, *brain heart infusion*

broth, dan *Sabouraud dextrose broth*. Media ini digunakan untuk menghitung dan mengisolasi mikroorganisme tertentu.

2. Media Anaerobik (Anaerobic Media)

Media anaerobik dirancang untuk mikroorganisme yang tidak toleran terhadap oksigen. Media ini ditambahkan agen reduksi seperti natrium tioglikolat untuk menghilangkan oksigen dari media. Oksigen yang terlarut dalam media diikat oleh agen reduksi sehingga tidak tersedia bagi mikroorganisme. Contoh media aerobik termasuk *thioglycolate medium*, *cooked meat medium*, dan *brewer anaerobic agar*.

3. Media Transportasi (Transport Media)

Media transportasi digunakan untuk menjaga viabilitas mikroorganisme selama pengangkutan ke laboratorium tanpa meningkatkan jumlah mikroorganisme. Media ini umumnya hanya mengandung buffer dan garam untuk mempertahankan kondisi mikroorganisme tanpa nutrisi tambahan. Contohnya adalah *Amies media* dan *anaerobic transport media*.

4. Media Diperkaya (Enrichment Media)

Media ini dirancang untuk mendukung pertumbuhan mikroorganisme tertentu dengan menambahkan nutrisi khusus yang diperlukan. Media diperkaya tidak mengandung agen penghambat, sehingga memungkinkan pertumbuhan cepat mikroorganisme target. Contohnya adalah *blood agar*, *selenite broth*, dan *chocolate agar*, yang sering digunakan untuk mendukung pertumbuhan patogen tertentu.

5. Media Selektif (Selective Media)

Media selektif memungkinkan pertumbuhan mikroorganisme tertentu sambil menghambat pertumbuhan yang lain. Hal ini dicapai dengan menambahkan zat seperti garam, antibiotik, atau pewarna yang menghambat mikroorganisme yang tidak diinginkan. Contohnya adalah *MacConkey agar*, yang menghambat

bakteri Gram-positif dengan menggunakan pewarna kristal violet, serta *Potato dextrose agar*, yang selektif untuk jamur karena pH rendah dan konsentrasi glukosa tinggi.

6. Media Diferensial (Differential Media)

Media ini digunakan untuk membedakan mikroorganisme berdasarkan karakteristik pertumbuhan atau pola metabolisme tertentu. Adanya zat pewarna atau indikator kimia menghasilkan perubahan warna atau pola pertumbuhan yang khas. Contoh media diferensial meliputi *Mannitol Salt Agar* (MSA) dan *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA). *Blood agar* juga merupakan media diferensial yang digunakan untuk mengamati zona hemolisis, yang membantu mengidentifikasi bakteri hemolitik.

7. Media Selektif-Diferensial

Media ini memiliki fungsi ganda, yaitu selektif untuk mikroorganisme tertentu dan diferensial untuk membedakan karakteristik spesifik. Contohnya adalah *MacConkey agar*, yang selektif untuk bakteri Gram-negatif dan diferensial untuk fermentasi laktosa, serta *Mannitol Salt Agar*, yang membedakan bakteri yang mampu memfermentasi manitol.

8. Media Uji (Assay Media)

Media ini digunakan untuk mendeteksi atau mengukur konsentrasi zat tertentu, seperti antibiotik atau vitamin. Contohnya adalah *Mueller-Hinton agar* untuk pengujian sensitivitas antibiotik dan media uji vitamin untuk menentukan kebutuhan nutrisi mikroorganisme.

E. Kebutuhan Nutrisi Mikroorganisme

Dalam menyiapkan media untuk pertumbuhan mikroorganisme, penting untuk memahami kebutuhan dasarnya. Beberapa kebutuhan utama yang harus diperhatikan meliputi air, energi, karbon, nitrogen, mineral, faktor pertumbuhan, dan pH. Pemenuhan kebutuhan ini sangat menentukan keberhasilan pertumbuhan mikroorganisme pada media kultur (Apriyanto et al., 2022),(O. Erkmen, 2021),(Bonnet et al., 2020).

1. Air

Air merupakan komponen utama dalam sel mikroorganisme, dengan protoplasma sel terdiri dari 70%–85% air. Air diperlukan untuk menjaga kelangsungan hidup mikroorganisme, membantu transportasi nutrisi, membuang limbah, mendukung reaksi metabolisme, dan mempertahankan struktur sel. Kualitas air sangat penting dalam pembuatan media. Penggunaan air keras yang mengandung ion kalsium atau magnesium tinggi tidak disarankan, karena dapat bereaksi dengan pepton atau ekstrak daging. Air suling adalah pilihan terbaik untuk memastikan kualitas media.

2. Karbon

Karbon adalah sumber nutrisi utama untuk sintesis komponen seluler mikroorganisme. Berdasarkan sumber karbonnya, mikroorganisme dibagi menjadi dua kelompok:

- a. **Autotrof:** Mikroorganisme yang menggunakan karbon dioksida (CO_2) sebagai sumber karbon.
- b. **Heterotrof:** Mikroorganisme yang memanfaatkan senyawa organik sebagai sumber karbon.

Setiap mikroorganisme memiliki kebutuhan karbon yang berbeda. Sebagian hanya membutuhkan senyawa organik sederhana, sedangkan lainnya memerlukan senyawa organik kompleks.

3. Energi

Sumber energi mikroorganisme bervariasi, tergantung pada jenisnya:

- a. **Fotosintetik:** Mikroorganisme seperti alga dan cyanobacteria memanfaatkan energi cahaya matahari untuk menghasilkan senyawa organik melalui fotosintesis.
- b. **Kemosintetik:** Mikroorganisme ini menggunakan energi kimia yang diperoleh dari oksidasi senyawa anorganik, seperti nitrit atau sulfur, untuk mensintesis nutrisi organik.

Berdasarkan kombinasi sumber energi dan karbon, mikroorganisme dapat dikelompokkan sebagai berikut:

- a. **Fotoautotrof:** Menggunakan cahaya sebagai energi, CO₂ sebagai karbon, dan air atau senyawa lain sebagai sumber hidrogen.
 - b. **Kemolitotrof:** Memanfaatkan senyawa anorganik sebagai sumber energi dan CO₂ sebagai sumber karbon.
 - c. **Fotoheterotrof:** Memanfaatkan cahaya sebagai energi dan senyawa organik sebagai karbon.
 - d. **Kemoheterotrof:** Menggunakan senyawa organik baik sebagai sumber energi maupun karbon.
4. Nitrogen
Nitrogen dibutuhkan untuk sintesis protein, asam amino, dan senyawa nitrogen lainnya. Mikroorganisme autotrof memanfaatkan nitrogen dalam bentuk anorganik, sedangkan mikroorganisme heterotrof mendapatkannya dari sumber organik seperti protein, peptida, atau ekstrak daging.
5. Mineral
Mineral dalam jumlah kecil seperti kalium, magnesium, fosfor, kalsium, besi, dan mangan diperlukan untuk mendukung berbagai proses biologis. Meskipun dibutuhkan dalam jumlah kecil, mineral ini sangat penting untuk pertumbuhan mikroorganisme.
6. Faktor Pertumbuhan
Faktor pertumbuhan adalah komponen esensial yang tidak dapat disintesis oleh mikroorganisme dan harus disediakan melalui media. Faktor ini meliputi asam amino, vitamin, atau senyawa organik lainnya yang diperlukan untuk mendukung pertumbuhan mikroorganisme tertentu. Media seperti *nutrient broth* atau *blood agar* sering digunakan untuk memenuhi kebutuhan ini, terutama bagi mikroorganisme patogen.
7. pH Media
pH media memengaruhi aktivitas enzim mikroorganisme, sehingga sangat penting dalam menentukan keberhasilan pertumbuhan. Sebagian besar bakteri tumbuh optimal pada pH netral (sekitar 7,0), meskipun ada beberapa mikroorganisme yang dapat bertahan pada pH ekstrem.

DAFTAR PUSTAKA

- Adi, Y. K., Atmanto, A., Hasanuddin, U., Paramita, K., Handayani, I., & Hasanuddin, U. (2022). Culture media. *International Research Journal of Modernization in Engineering, Technology and Science*, August.
- Apriyanto, M., Novitasari, R., Mardeci, H., & Yulianti. (2022). Dasar Mikrobiologi Pangan. In *Rineka* (Issue June). http://file.upi.edu/Direktori/FPMIPA/JUR._PEND._BILOGI/196805091994031-KUSNADI/BAb_V_I_R_U_S.OK.pdf
- Atmanto, Y. K. A. A., Asri, L. A., & Kadir, N. A. (2022). Media Pertumbuhan Kuman. *Jurnal Medika Hutama*, 04(01), 3069–3075. <http://jurnalmedikahutama.com>
- Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2020). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes and New Infections*, 34. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100622>
- Erkmen, O. (2021). *Laboratory Practices in Microbiology* (O. B. T.-L. P. in M. Erkmen (ed.); pp. 3–18). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91017-0.00004-4>
- Kashyap, A., & Nath, B. C. (2023). Cultivation and Identification of Pathogens for Plant Disease Diagnosis. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MULTIDISCIPLINARY RESEARCH AND INNOVATION*, 2(11), 20–25.
- Mandal, S. P., & Kundu, M. (2021). An Overview on Impact of Electromagnetic Radiations on Environment and Human Health. *RESEARCH REVIEW International Journal of Multidisciplinary*, 6(6), 3079–3083. <https://doi.org/10.31305/rrijm.2019.v04.i03.695>
- Orekan, J., Barbé, B., Oeng, S., Ronat, J. B., Letchford, J., Jacobs, J., Affolabi, D., & Hardy, L. (2021). Culture media for clinical bacteriology in low- and middle-income countries: challenges, best practices for preparation and recommendations for improved access. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(10),

- 1400–1408. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.05.016>
- Putra, S. F., Fitri, R., & Fadilah, M. (2021). Pembuatan Media Tumbuh Bakteri Berbasis Lokal Material. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*, 1043–1050. https://semnas.biologi.fmipa.unp.ac.id/index.php/prosidin_g/article/view/302
- Putri, M. H. (2021). *Mikrobiologi Keperawatan Gigi*. Penerbit NEM.
- Riu, F., Ruda, A., Ibba, R., Sestito, S., Lupinu, I., Piras, S., Widmalm, G., & Carta, A. (2022). Antibiotics and Carbohydrate-Containing Drugs Targeting Bacterial Cell Envelopes: An Overview. *Pharmaceuticals*, 15(8), 1–38. <https://doi.org/10.3390/ph15080942>
- Salwan, R., Rana, A., & Sharma, V. (2023). Laboratory Methods in Microbiology and Molecular Biology. In R. Salwan & V. B. T.-L. M. in M. and M. B. Sharma (Eds.), *Developments in Microbiology* (pp. 21–29). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95078-7.00012-7>
- Wu-Wu, J. W. F., Guadamuz-Mayorga, C., Oviedo-Cerdas, D., & Zamora, W. J. (2023). Antibiotic Resistance and Food Safety: Perspectives on New Technologies and Molecules for Microbial Control in the Food Industry. *Antibiotics*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030550>

BIODATA PENULIS



Yulia Ratna Dewi, S.Tr.A.K., M.Biomed, lahir di Ambarawa pada tanggal 16 Juli. Lulusan Program Studi Teknologi Laboratorium Medik Universitas Muhammadiyah Semarang tahun 2019 dan telah meraih gelar Magister Ilmu Biomedik dari Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia pada tahun 2023. Yulia Ratna Dewi tercatat sebagai seorang Dosen di Program Studi Sarjana Terapan Teknologi laboratorium medis di Politeknik Indonusa Surakarta.

yuliaratnadewi@poltekindonusa.ac.id

BAB 16

Reproduksi Bakteri

Mizan Sahroni, M.Sc.

Bakteri seperti makhluk hidup yang lain melakukan reproduksi dengan tujuan untuk memperbanyak diri dan mewariskan DNA ke keturunannya. Secara umum metode reproduksi pada berbagai organisme terdiri dari 2 yaitu reproduksi secara seksual dan aseksual. Reproduksi seksual melibatkan penggabungan 2 materi genetik dari dua tetua yang berbeda (jantan dan betina), hal ini menyebabkan reproduksi seksual menghasilkan keturunan yang memiliki variasi genetik dan tidak identik dengan tetuanya. Reproduksi aseksual di sisi lain tidak melibatkan penggabungan materi genetik, reproduksi aseksual terjadi ketika suatu organisme membelah diri untuk membentuk organisme baru sebagai keturunan, konsekuensi dari hal ini adalah keturunan yang dihasilkan memiliki genetik yang sama dengan sel awal.

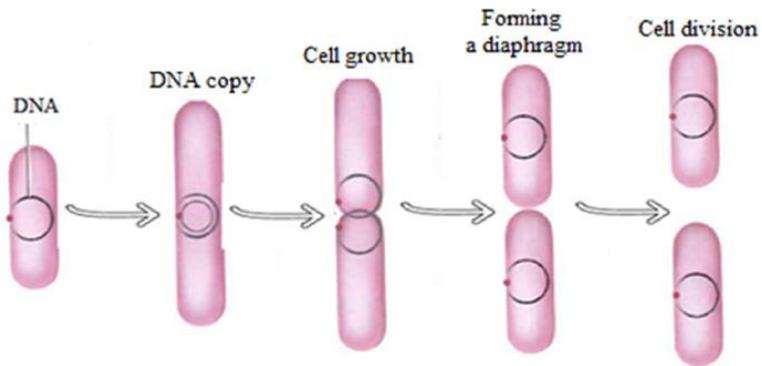
Bakteri secara umum tidak memiliki metode reproduksi secara seksual dan hanya bergantung pada metode aseksual. Reproduksi aseksual yang umum dijumpai pada bakteri adalah fisi biner atau pembelahan biner, selain itu metode lain yang dapat terjadi adalah budding atau pertunasan dan endospore. Bakteri memiliki mekanisme pertukaran materi genetik untuk menghasilkan variasi sebagai alternatif dari reproduksi aseksual yang tidak terjadi.

A. Fisi Biner

Pembelahan suatu organisme menjadi dua organisme anak dikenal sebagai pembelahan biner. Bakteri dan archaea, seperti prokariota, umumnya menunjukkan pembelahan biner sebagai mekanisme pembelahan sel dalam reproduksi aseksual

mereka. Beberapa organel eukariotik seperti mitokondria juga mengalami pembelahan biner untuk meningkatkan jumlahnya di dalam sel. Dua sel yang dihasilkan secara genetik identik dan memiliki potensi untuk tumbuh kembali mencapai ukuran aslinya dalam spesies tersebut (Joanne et al., 2008).

Replikasi DNA adalah peristiwa pertama dalam proses pembelahan biner. Kromosom sirkular tunggal pada sel vegetatif terurai dan direplikasi. Dua kromosom yang telah direplikasi bergerak ke kutub yang berlawanan. Selanjutnya, sel memperpanjang ukurannya, semua komponen seperti ribosom dan plasmid pada sel prokariotik menggandakan jumlahnya. Pelat ekuator menyempit memisahkan membran plasma dan dinding sel baru terbentuk. Kedua sel yang baru terbentuk mengandung jumlah ribosom, plasmid, volume sitoplasma dan komponen lainnya yang hampir sama (Joanne et al., 2008).



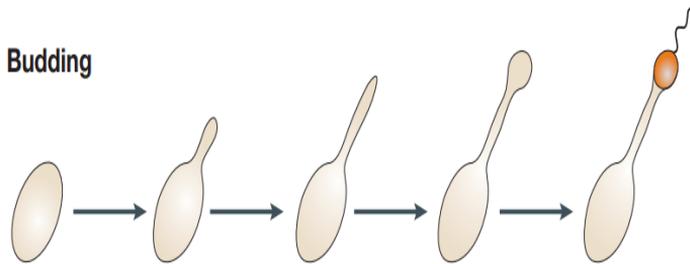
Gambar 16.1 Fisi biner pada bakteri (Zhi et al., 2022)

Septasi adalah proses pembentukan dinding lintang (septum) antara dua sel anak selama pembelahan sel, yang kini dikenal sebagai sitokinesis pada eukariota dan prokariota. Proses ini melibatkan beberapa langkah: **Pemilihan lokasi:** Menentukan tempat di mana septum akan terbentuk. **Perakitan cincin Z:** Pembentukan cincin Z, yang menyempitkan sel untuk membaginya. **Menghubungkan cincin Z:** Menghubungkan cincin Z ke membran plasma dan mungkin dinding sel. **Sintesis dinding sel:** Merakit mesin untuk sintesis peptidoglikan dan dinding sel. **Penyempitan:** Penyempitan sel yang sebenarnya

untuk membentuk septum. Pada *E. coli* yang tumbuh cepat, siklus sel dapat selesai dalam waktu sekitar 20 menit, meskipun replikasi DNA membutuhkan waktu setidaknya 40 menit. Pembelahan cepat ini dimungkinkan karena *E. coli* memulai putaran replikasi DNA baru sebelum yang pertama selesai, memungkinkan replikasi berkelanjutan dengan banyak garpu replikasi (Joanne et al., 2008).

B. Budding

Pembentukan tunas adalah bentuk reproduksi aseksual di mana organisme baru berkembang dari pertumbuhan atau tunas akibat pembelahan sel pada suatu titik tertentu. Organisme baru tetap terhubung saat tumbuh, dan hanya terpisah dari organisme induk ketika sudah matang. Karena reproduksi ini bersifat aseksual, organisme yang baru terbentuk adalah klon dan secara genetik identik dengan organisme induk (Angert, 2005).



Gambar 16.2 Proses pembentukan tunas pada reproduksi budding (Angert, 2005)

Bakteri pembentuk tunas, atau *Budding Bacteria*, adalah kelompok bakteri yang berkembang biak dengan cara pembentukan tunas. Pada pembentukan tunas, dinding sel tumbuh dari satu titik pada sel (pertumbuhan polar), bukan di seluruh sel; hal ini memungkinkan pengembangan struktur dan proses yang lebih kompleks. Kebanyakan bakteri pembentuk tunas mengembangkan ekstrusi sitoplasma, seperti tangkai (*Caulobacter*), hifa (*Hyphomicrobium*), dan appendage (*Stella*). Bakteri pembentuk tunas sebagian besar hidup di perairan dan

dapat menempel pada permukaan dengan tangkai mereka; yang lainnya mengapung bebas (Angert, 2005).

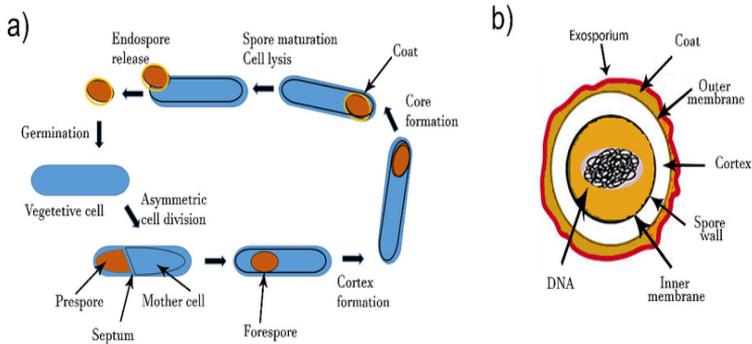
Budding telah diamati pada banyak kelompok bakteri, termasuk bakteri Gram-positif, Cyanobacteria, proteobacteria prothecate, dan Planctomycetes. Meskipun mekanisme hipotetis yang mengontrol pembentukan tunas telah diusulkan, mekanisme molekuler yang mengatur proses ini belum sepenuhnya dipahami. Proteobacteria menunjukkan potensi besar untuk pengembangan sistem model dalam analisis pembentukan tunas pada bakteri (Angert, 2005).

C. Endospora

Pada bakteri tertentu, sel-sel bertahan menghadapi kondisi yang tidak menguntungkan dengan membentuk endospora. Endospore mengandung DNA genom, sebagian sitoplasma bakteri, dan selubung pembungkus yang melindungi isi endospora. Struktur yang dihasilkan, yang disebut endospora, dapat bertahan dalam kondisi lingkungan yang ekstrem seperti kekeringan, radiasi, suhu ekstrim dan tetap dapat bertahan hidup ratusan hingga jutaan tahun (Berman, 2012; Lie, 2012). Ketika kondisi lingkungan telah kembali mendukung untuk kehidupan bakteri, endospora akan menyerap air, membengkak, dindingnya pecah, dan melepaskan isi di dalamnya.

Secara umum endospore diketahui sebagai salah satu metode bertahan hidup bakteri dalam keadaan ekstrim (Dworkin and Losick, 2001). Namun, pada bakteri gram-positif pembentukan endospora telah berkembang dari mekanisme dorman menjadi cara reproduksi. *Bacillus subtilis* sering digunakan sebagai model untuk mempelajari pembentukan endospora, yang umumnya terjadi sebagai respons terhadap kekurangan nutrisi. *B. subtilis* mengalami pembelahan biner yang asimetris untuk membentuk forespora kecil dan sel induk yang lebih besar, dengan sebagian kromosom dipindahkan ke dalam forespore. Proses pembentukan endospora pada *B. subtilis* melibatkan pembelahan asimetris, translokasi

kromosom, dan penyerapan forespora oleh sel induk. Saat forespora matang menjadi endospora, sel induk akan mati (Angert, 2005).



Gambar 16.3 Proses pembentukan endospore pada bakteri (Vidic et al., 2020)

Bakteri lain juga menggunakan strategi serupa, pada beberapa garis keturunan, sporulasi telah menjadi mode propagasi yang penting, bukan hanya respons terhadap stres lingkungan. *Metabacterium polyspora* adalah bakteri pembentuk endospora yang ditemukan di saluran pencernaan guinea pig (sejenis marmot), menghasilkan hingga sembilan endospora per sel induk (Rebekah et al., 2008). Endospora yang matang dilepaskan dalam feses, bertahan melalui pencernaan, dan berkecambah di usus halus. Proses pembentukan endospora dalam bakteri ini melibatkan pembelahan sel asimetris di kedua kutub sel, dengan DNA dibagi ke dalam dua kompartemen polar. Setelah penyusupan, forespora dapat membelah dan menghasilkan beberapa forespora yang matang menjadi endospore. *M. polyspora* memerlukan tiga atau lebih salinan genom untuk memproduksi beberapa endospora. Pada *M. polyspora*, pembentukan beberapa endospora merupakan bagian dari siklus hidup normalnya, bukan hanya respons terhadap stres, memungkinkan bakteri untuk berkembang biak dan bertahan hidup (Angert, 2005). Selain itu, *Anaerobacter polyendosporus* adalah bakteri pembentuk endospora lainnya yang dapat menghasilkan lebih dari satu endospora. Bakteri ini

dapat menghasilkan hingga lima sampai tujuh endospora dalam kondisi pertumbuhan tertentu di laboratorium, meskipun biasanya hanya menghasilkan satu atau dua spora (Duda et al., 1987; Angert, 2005).

D. Pertukaran Materi Genetik

Secara umum bakteri bereproduksi secara aseksual yang menyebabkan keturunannya mewarisi genetic yang sama dengan sel induk, namun bakteri memiliki mekanisme pertukaran materi genetic yang memungkinkan munculnya variasi genetic pada bakteri. Pada kebanyakan organisme variasi genetic dapat dihasilkan melalui reproduksi seksual. Bakteri bertukar gen di alam melalui tiga proses: konjugasi, transduksi dan transformasi. Elemen DNA, seperti plasmid, transposon, integron, atau transduksi fag diperlukan sebagai bahan untuk pertukaran materi genetic bakteri. Plasmid adalah potongan kecil DNA berbentuk melingkar yang bereplikasi secara mandiri, terpisah dari kromosom bakteri. DNA plasmid adalah yang paling umum ditransfer selama pertukaran genetic (McGee et al., 2001).

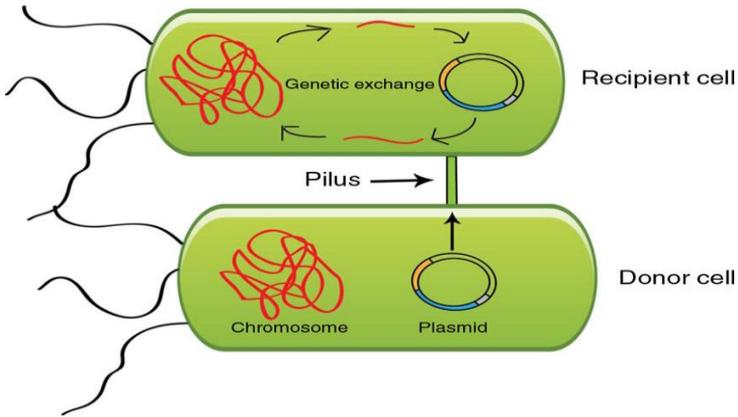
1. Konjugasi

Konjugasi adalah proses transfer plasmid atau elemen DNA yang dapat ditransmisikan sendiri, serta kadang-kadang DNA kromosom, dari sel donor ke sel penerima melalui kontak langsung, biasanya dimediasi oleh pilus konjugasi atau pilus seks. Proses ini pertama kali ditemukan pada *Escherichia coli* oleh Lederberg dan Tatum pada tahun 1946. Konjugasi dapat mentransfer DNA dalam jumlah besar, yang mencapai ratusan hingga ribuan kilobase, dan terjadi pada banyak spesies bakteri, baik Gram-negatif maupun Gram-positif, serta antara bakteri dan tumbuhan (Don, 1993; McGee et al., 2001).

Plasmid konjugatif yang pertama ditemukan dan paling banyak dipelajari adalah plasmid F pada *E. coli*. Plasmid F hadir dalam satu atau dua salinan per sel dan mentransfer plasmid F hanya dari sel donor (jantan) ke sel penerima (betina) setelah terjadi kontak intim yang

dimediasi oleh pilus seks. Dalam proses ini, plasmid F ditransfer sebagai molekul DNA untai tunggal, yang melibatkan serangkaian protein yang dikodekan oleh gen tra pada plasmid F, seperti yang bertanggung jawab untuk produksi pilus seks, pembentukan pasangan perkawinan yang stabil, pemotongan DNA pada oriT, serta replikasi DNA setelah transfer (Don, 1993; McGee et al., 2001).

Conjugation



Gambar 16.4 Pertukaran materi genetic melalui konjugasi antara dua sel bakteri (Ligrone, 2021)

Transposon konjugatif memiliki kesamaan dengan transposon karena mengkode penanda resistansi antibiotik dan dapat bergabung dengan atau keluar dari genom sel inang. Namun, transposon konjugatif juga mirip dengan plasmid konjugatif karena dapat ditransmisikan ke sel penerima dan terintegrasi ke dalam genom sel penerima. Transposon konjugatif ditemukan pada bakteri Gram-negatif dan Gram-positif, serta pada bakteri seperti *Agrobacterium tumefaciens* yang menyebabkan tumor pada tumbuhan dengan mentransfer elemen DNA (T-DNA) ke dalam genom sel tumbuhan (Don, 1993; McGee et al., 2001).

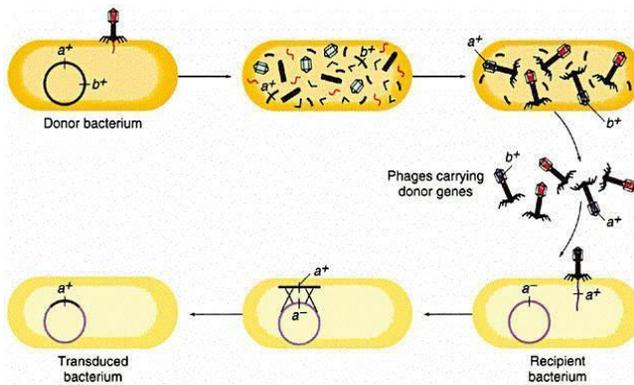
Bakteri yang membawa plasmid R, yang mengkodekan gen resistansi antibiotik, dapat bertahan hidup meskipun ada antibiotik. Transfer plasmid R dari bakteri donor ke penerima dapat terjadi dengan atau tanpa

adanya antibiotik, yang berperan besar dalam penyebaran gen resistansi antibiotik. Selain resistansi antibiotik, plasmid konjugatif juga dapat mentransfer gen metabolik ke sel penerima, memberikan keuntungan selektif bagi transkonjugat jika lingkungan mengandung senyawa yang dapat dimetabolisme oleh enzim yang dikodekan oleh gen tersebut (Don, 1993; McGee et al., 2001).

2. Transduksi

Transduksi adalah transfer DNA bakteri dari donor ke bakteri penerima melalui partikel virus, yang disebut bakteriofag atau fag (Philippe et al., 2021). Fag menempel pada permukaan sel bakteri dan menyuntikkan DNA-nya ke dalam sitoplasma bakteri. DNA tersebut kemudian terintegrasi ke dalam genom bakteri dan melakukan replikasi yang seringkali bertujuan menghasilkan keturunan fag. Ada dua jenis transduksi: **(1) Specialized transduction**, di mana hanya gen bakteri tertentu yang berada di dekat situs penempelan fag lisogenik yang ditransfer dari satu bakteri ke bakteri lainnya, dan **(2) General transduction**, di mana hampir semua gen bakteri dapat ditransfer (McGee et al., 2001).

Sel yang menerima DNA dari bakteri lain melalui transduksi disebut transdukan. Transduksi ditemukan oleh Zinder dan Lederberg pada tahun 1952 ketika transfer genetik penanda nutrisi terjadi. Karena DNA fag dilindungi oleh lapisan protein, transduksi tahan terhadap DNAase. Proses transduksi dapat mentransfer DNA dengan panjang puluhan hingga ratusan kilobase. Karena spesifisitas tinggi fag terhadap reseptor permukaan sel, transduksi memiliki jangkauan inang yang paling sempit di antara metode pertukaran genetik bakteri (McGee et al., 2001).



Gambar 16.5 Mekanisme pertukaran materi genetic bakteri dengan transduksi (Carpa, 2010)

a) Generalized transduction

Dalam generalized transduction, fag secara mengalami kesalahan dalam pengemasan DNA, fag justru mengemas DNA bakteri dan bukan DNA fag selama perakitan fag. Hal ini menghasilkan partikel virus yang mengandung DNA bakteri, tetapi yang tidak dapat lagi berkembang biak di dalam bakteri karena kehilangan seluruh DNA fag. Namun, partikel fag tersebut dapat menempel pada permukaan sel bakteri dan menyuntikkan DNA yang terkemas ke dalam sitoplasma bakteri. Jika DNA bakteri dalam fag berasal dari kromosom bakteri, DNA tersebut dapat bergabung dengan DNA homolog dari bakteri penerima dan menghasilkan transdukan yang stabil (McGee et al., 2001; Chiang et al., 2019).

Generalized transduction adalah kejadian langka, tetapi jika metode seleksi yang kuat tersedia, seperti pemanfaatan asam amino atau resistansi antimikroba, transduksi bisa menjadi metode yang sangat efisien untuk mentransfer kode genetic/penanda genetik ke strain yang berbeda. Contoh fag *generalized transduction* adalah P1, yang mentransduksi DNA *E. coli* ke

berbagai bakteri gram negative (McGee et al., 2001; Chiang et al., 2019).

b) Specialized transduction

Specialized transduction membutuhkan fag untuk menjalani lisogeny, biasanya di lokasi tertentu dalam genom bakteri yang disebut situs penempelan. Lisogeny adalah proses di mana genom fag terintegrasi ke dalam kromosom bakteri. Fag *specialized transduction* mengandung gen fag dan bakteri. Jika gen dari suatu bakteri di transduksikan melalui *specialized transduction* ke dalam bakteri penerima yang tidak memiliki gen tersebut, bakteri penerima dapat mengekspresikan sifat genetik baru yang diperoleh (McGee et al., 2001; Chiang et al., 2019).

Specialized transduction adalah kejadian langka, fag transduksi spesial memainkan peran penting dalam isolasi gen pertama dalam biologi molekuler, serta dalam penemuan elemen sisipan, yang sering kali berfungsi sebagai situs penempelan untuk integrasi DNA fag. Fag *E. coli* lambda adalah contoh klasik dari fag transduksi spesial: fag tersebut mengintegrasikan DNA-nya secara tepat antara operon yang mengkode enzim yang bertanggung jawab untuk pemanfaatan galaktosa dan biotin dalam kromosom *E. coli* (McGee et al., 2001; Chiang et al., 2019).

c) Peran Transduksi Dalam Evolusi Bakteri

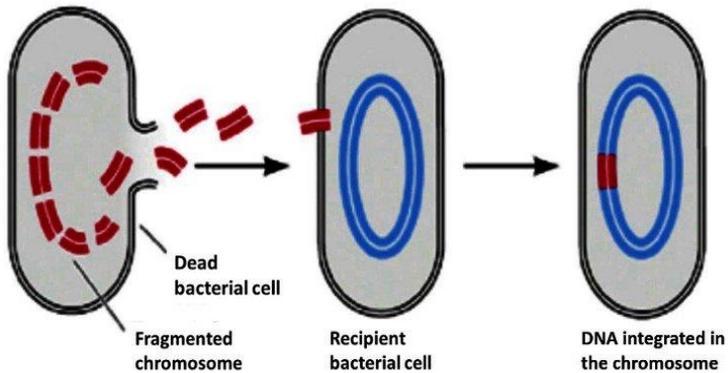
Transduksi memainkan peran penting dalam evolusi bakteri dengan transfer gen horizontal di antara spesies bakteri. DNA yang tertransduksi dapat berupa kromosom, plasmid dengan jangkauan inang yang luas, plasmid konjugatif, atau transposon. Elemen DNA ini membentuk simbiosis dengan bakteri yang bertujuan untuk mereplikasi DNA. DNA yang meningkatkan kelangsungan hidup bakteri akan dipertahankan. Untuk fag sendiri, dapat berevolusi

yang disebabkan karena perubahan inang, pengaturan gen yang terlibat dalam lisogeny, dan kapasitas replikasi yang diubah. Analisis urutan genom bakteri menunjukkan adanya gen pada bakteri yang memiliki keterkaitan erat dengan gen eukariotik. Gen-gen ini mungkin ke dalam bakteri melalui transfer gen horizontal melalui fag transduksi (McGee et al., 2001).

3. Transformation

Transformasi adalah proses transfer DNA secara horizontal yang secara alami terjadi pada bakteri yang mengakibatkan asimilasi dan ekspresi sifat yang baru diperoleh pada bakteri penerima (Das et al., 2017). Penerima yang berhasil mengpropagasi DNA baru ini disebut transforman. DNA yang ditransfer dapat berbentuk sirkular atau linier, dan dapat berupa DNA plasmid, transposon, integron, atau fragmen kromosom. Proses transformasi dapat mentransfer daerah DNA dari satu hingga puluhan kilobase. Pada tahun 1928, transformasi menjadi mekanisme pertama pertukaran genetik bakteri yang dikenali oleh Fred Griffith. Mekanisme transformasi terdiri dari empat langkah: perkembangan kompetensi, pengikatan DNA pada permukaan sel, pemrosesan dan pengambilan DNA bebas (biasanya dalam arah 3' ke 5'), dan integrasi DNA ke dalam kromosom melalui rekombinasi (McGee et al., 2001).

Transformasi yang awalnya dikenal sebagai metode pertukaran genetik pada bakteri, saat ini berkembang pesat menjadi salah satu teknik yang digunakan dalam rangkaian rekayasa genetik. Penggunaan bakteri seperti *Agrobacterium*, menjadi salah satu contoh dalam aplikasi transformasi dalam bidang pemuliaan tanaman berbasis rekayasa genetik (Mohammed and Abalaka, 2011; Thomson et al., 2020; Szarzanowicz et al., 2024). Bakteri lain yang sering digunakan dalam transformasi adalah *E. coli* (Hasegawa et al., 2018).



Gambar 16.6 Pertukaran materi genetic pada bakteri dengan metode transformasi (Sumber : Ligrone, 2021)

a) **Peran Transformasi Dalam Evolusi Bakteri**

Ada tiga manfaat transformasi di alam: nutrisi, perbaikan, dan keragaman rekombinasi. Ketiga manfaat ini memiliki tema dasar yaitu kelangsungan hidup bakteri. Aspek nutrisi menunjukkan bahwa organisme yang secara alami dapat ditransformasi menggunakan DNA yang mereka ambil sebagai sumber nukleotida, karbon, dan nitrogen. Aspek perbaikan menunjukkan bahwa ketika DNA bakteri rusak, beberapa bakteri yang lisis dapat melepaskan DNA yang tidak bermutasi yang dapat menggantikan DNA yang rusak pada bakteri yang masih hidup. Aspek keragaman rekombinasi menunjukkan bahwa organisme yang secara alami dapat ditransformasi memungkinkan kombinasi gen baru, sehingga meningkatkan keragaman (McGee et al., 2001).

Contoh alami dari transformasi adalah protein pilus dari *Neisseria* spp. mengalami variasi antigenik akibat penggantian alel dari gen pilus asli yang diekspresikan dalam bakteri, yang disumbangkan oleh populasi sekitarnya, sebagai hasil dari transformasi alami. Bakteri baru yang berhasil

ditransformasi mampu mengekspresikan set pilus yang baru dengan antigen yang berbeda, yang menghasilkan penghindaran terhadap respons kekebalan tubuh (McGee et al., 2001).

DAFTAR PUSTAKA

- Angert, E. Alternatives to binary fission in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 3, 214–224 (2005). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1096>.
- Brolund, A. (2014). Overview of ESBL-producing Enterobacteriaceae from a Nordic perspective. *Infection Ecology & Epidemiology*, 4:1-9
- Carpa R., (2010). Genetic recombination in bacteria: horizon of the beginnings of sexuality in living organisms. *ELBA Bioflux*, 2(1):15-22.
- Chiang YN, Penade's JR, Chen J (2019) Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical. *PLoS Pathog*, 15(8): e1007878. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007878>
- Das, M., Raythata, H., and Chatterjee, S. (2017). Bacterial Transformation: What? Why? How? And When? *Annual Research & Review in Biology*, 16(6): 1-11.
- Don B. Clewell. (1993). Bacterial Conjugation. Springer Nature.
- Duda, V.I., Lebedinsky, A.V., Mushegian, M.S. *et al.* (1987). A new anaerobic bacterium, forming up to five endospores per cell –*Anaerobacter polyendosporus* gen. et spec. nov. *Arch. Microbiol*, 148: 121–127 <https://doi.org/10.1007/BF00425359>
- Dworkin J., and Losick R. (2001). Linking nutritional status to gene activation and development. *Genes Dev.* 15:1051–1054. doi: 10.1101/gad.892801.
- Hasegawa, H., Suzuki, E. and Maeda, S. (2018). Horizontal Plasmid Transfer by Transformation in *Escherichia coli*: Environmental Factors and Possible Mechanisms. *Front. Microbiol.* 9: 2365. doi: 10.3389/fmicb.2018.02365
- J.J. Berman. (2012). Taxonomic Guide to Infectious Diseases. Pp: 65-71. Elsevier Inc.
- Joanne, M. Willey., Linda M. Sherwood, and Christopher J. Woolverton. (2008). Prescott, Harley, and Klein's Microbiology 7th Edition. McGraw-Hill Inc.

- Lei, Li. (2012). Mechanistic studies of the radical SAM enzyme spore photoproduct lyase (SPL). *Biochimica et Biophysica Acta*, (1824): 1264-1277.
- Ligrone, R. (2021). Death, sex, and immortality. Bulletin of Regional Natural History (BORNH), *Bollettino della Società dei Naturalisti in Napoli*. 1(3): 71-89.
- McGee, D., Coker, C., Harro, J. and Mobley, H. (2001). Bacterial Genetic Exchange. Pp: 1-8 Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons, Doi: 10.1038/npg.els.0001416.
- Mohammed, A. and Abalaka, M. E. 2011. Agrobacterium transformation: A boost to agricultural biotechnology. *Journal of Medical Genetics and Genomics*, 3(8): 126 – 130.
- Philippe, C., Sylvie, M., and Régis, F. (2021). Viral transduction and the dynamics of bacterial adaptation. *BioRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.06.14.448024>.
- Rebekah J. Ward and Esther R. Angert. (2008). DNA replication during endospore development in *Metabacterium polyspora*. *Molecular Microbiology*, 67(6): 1360–1370. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06129.
- Szarzanowicz, M.J., Waldburger, L.M., Busche, M. *et al.* (2024). Binary vector copy number engineering improves *Agrobacterium*-mediated transformation. *Nat Biotechnol*. <https://doi.org/10.1038/s41587-024-02462-2>.
- Thompson, M. G., Moore, W. M., Hummel, N. F. C., Pearson, A. N., Barnum, C. R., Scheller, H. V., & Shih, P. M. (2020). *Agrobacterium tumefaciens*: A Bacterium Primed for Synthetic Biology. *Biodesign research*, 2020, 8189219. <https://doi.org/10.34133/2020/8189219>.
- Vidic, J., Chaix, C., Manzano, M., & Heyndrickx, M. (2020). Food Sensing: Detection of *Bacillus cereus* Spores in Dairy Products. *Biosensors*, 10(3), 15. <https://doi.org/10.3390/bios10030015>.
- Zhi, X. L., Wei M., Yi, J. K., Sin, N. C., Chang, L. Z., Chi, T. L., She, X. Z. (2022). Evaluation of Measurement Uncertainty from Pour Plate Method in Bacterial Enumeration in Water. *American*

Journal of Environmental Protection, 11(2): 32-38. doi:
10.11648/j.ajep.20221102.14.

BIODATA PENULIS



Penulis lahir di Lampung Timur, 18 Juli 1996. Penulis menempuh jenjang Pendidikan sarjana di program studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung, lulus pada tahun 2018. Selanjutnya penulis melanjutkan pendidikan di Magister di Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada pada tahun 2019 dan lulus pada tahun 2021. Saat ini penulis bekerja sebagai dosen di program studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis, Fakultas Kesehatan Universitas Muhammadiyah Pringsewu, terhitung sejak juli 2022.

BAB 17

Metode Kultur Bakteri

* Sanatang, S.Si., M.Kes*

A. Kultur Bakteri

Pemanfaatan mikroorganisme seperti bakteri khususnya di bidang kesehatan cukup menjadi perhatian khusus. Berbagai kelebihan yang dapat diperoleh dengan menggunakan bakteri adalah membutuhkan waktu yang relatif lebih singkat dan minim akan biaya produksi. Salah satu pemanfaatan bakteri di bidang kesehatan adalah rekayasa genetika pembuatan vaksin dengan metode kloning gen.

Proses kultivasi (penanaman) bakteri di laboratorium, perlu diperhatikan nutrisi dan faktor-faktor lain yang dikehendaki oleh bakteri tertentu. Nutrisi dan faktor-faktor pertumbuhan yang mendukung pertumbuhan bakteri, memungkinkan sel bakteri tumbuh dengan maksimal. Selain nutrisi yang harus tersedia di dalam media pertumbuhan bakteri, perlu juga diperhatikan faktor-faktor pertumbuhan lain. Oleh karena itu, kegiatan-kegiatan kultivasi sel bakteri di laboratorium, perlu diperhatikan aspek nutrisi dan faktor-faktor pertumbuhan yang spesifik untuk kelompok bakteri tertentu (Rasyidah dan Fariani, 2021).

Pada bidang Kesehatan, bakteri merupakan agen penyebab penyakit pada manusia. Berbagai penyakit yang disebabkan oleh bakteri adalah *demam thyfoid*, *tuberculosis* (TB), infeksi menular seksual yang disebabkan oleh gonore atau *treponema pallidum*. Untuk mengidentifikasi bakteri tersebut maka diperlukan metode khusus yang disebut dengan isolasi bakteri dengan metode kultur.

Semua jenis mikroorganisme memerlukan makanan yang mengandung nutrisi yang cocok untuk tumbuh dan berkembang termasuk bakteri. Kultur bakteri merupakan teknik perbanyak bakteri yang dilakukan dengan menggunakan media tertentu. Media tersebut berisi komponen makronutrisi dan mikronutrisi yang berguna untuk pertumbuhan dan perbanyak bakteri (Harti, 2015).

Isolasi bakteri merupakan proses pemisahan bakteri dari lingkungannya atau kelompok mikroorganisme berbeda untuk mendapatkan kultur bakteri murni. Tujuan dari isolasi adalah membedakan kelompok bakteri yang berbeda berdasarkan pola pertumbuhannya dan mendapatkan koloni tunggal. Koloni tunggal tersebut mewakili satu jenis bakteri (Lestari dan Hartati, 2017).

Penentuan teknik isolasi bakteri menentukan keberhasilan dari isolasi. Teknik isolasi/kultur bakteri terbagi dalam 4 metode yaitu metode tuang, metode gores, pengenceran, metode sebar. Pemilihan metode isolasi/kultur bakteri tergantung ada jenis spesimen pemeriksaan dan jenis bakteri target (Moses, 2022).

B. Macam-macam Metode Kultur Bakteri

1. Metode Gores (*streak plate*)

Metode cawan gores (*streak plate method*) yang merupakan suatu cara menumbuhkan bakteri atau mikroorganisme lainnya pada permukaan medium agar (medium padat) dengan bentuk garis yang tipis. Metode ini juga dapat digunakan untuk memilih koloni mikroorganisme untuk mendapatkan kultur murni. Kultur murni adalah pertumbuhan mikroorganisme yang seragam, terbebas dari kontaminan, dan terdiri dari satu spesies. Bakteri dan jamur (jamur uniseluler) adalah dua jenis mikroorganisme yang dapat diisolasi dan dimurnikan dengan teknik ini. Memperbanyak mikroorganisme pada permukaan medium pertumbuhan juga dapat dicapai dengan teknik ini.

Pada prinsipnya metode ini bertujuan untuk memisahkan antar koloni mikroorganisme menggunakan

suatu alat seperti kawat panjang yang memiliki ujung melingkar (*loop*) atau sering disebut jarum ose. Jarum ose memudahkan pengambilan sejumlah kecil mikroorganisme dari populasi atau koloni mikroorganisme dari kultur cair dan padat. Selain jarum ose, Anda biasanya juga dapat menggunakan tusuk sate atau tusuk gigi yang sudah dibersihkan. Untuk isolasi kualitatif, metode ini memerlukan penyebaran satu ose biakan di seluruh permukaan. Metode ini tidak memerlukan pengenceran (Madigan et al, 2008).

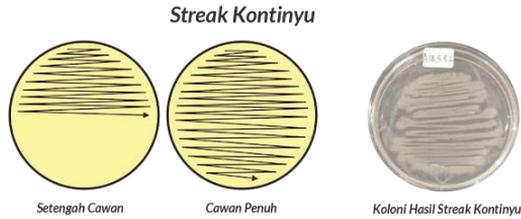
Manfaat metode cawan gores adalah untuk mengambil kultur mikroorganisme murni dari kultur campuran dan meningkatkan koloni mikroorganisme pada medium pertumbuhan. Terdapat 3 macam pola goresan dari metode cawan gores yaitu goresan sinambung (kontinyu), huruf T dan kuadran.

a. Metode goresan sinambung (kontinyu)

Goresan sinambung umumnya digunakan bukan untuk mendapatkan koloni tunggal, melainkan untuk peremajaan ke cawan atau medium baru. Cara kerja dari metode gores sinambung (kontinyu) adalah:

- 1) Membakar jarum ose diatas api Bunsen untuk proses sterilisasi
- 2) Mengambil 1 ose koloni bakteri secara aseptis jika jarum ose sudah dingin
- 3) Menggoreskan ose yang berisi koloni bakteri di atas permukaan media pada cawan baru dengan cara zig-zag dan kontinyu sampai setengah permukaan agar, satu permukaan agar atau seperbagian dari permukaan agar sesuai dengan yang diinginkan.

(Cappuccino dan Sherman, 2002).



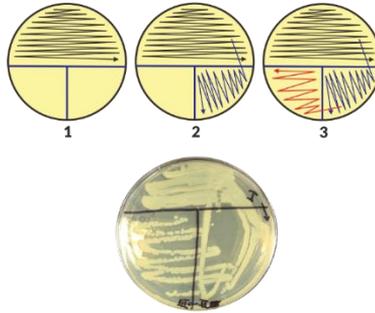
Gambar 17.1 Metode goresan Kontinyu

b. Metode goresan T

Tipe goresan T membentuk koloni tunggal dengan membagi area goresan menjadi tiga bagian dan membentuk huruf T.

Cara kerja goresan T adalah sebagai berikut:

- 1) Tandai bagian luar-bawah cawan petri dengan membagi cawan menjadi 3 bagian menggunakan spidol marker.
- 2) Bakar jarum ose diatas api bunsen untuk sterilisasi.
- 3) Setelah dingin, ambil satu ose koloni mikroorganisme secara aseptis.
- 4) Pindahkan koloni dari ose ke dalam cawan medium pada bagian 1 dengan garis zig-zag.
- 5) Panaskan kembali jarum ose di atas api bunsen dan tunggu hingga dingin.
- 6) Angkat cawan ke arah bagian kedua dan lakukan goresan zig-zag dengan menyambungkannya dari ekor goresan pertama.
- 7) Lakukan hal yang sama pada bagian ke-3.
(Cappuccino dan Sherman, 2002).



Gambar 17.2. Metode Goresan T

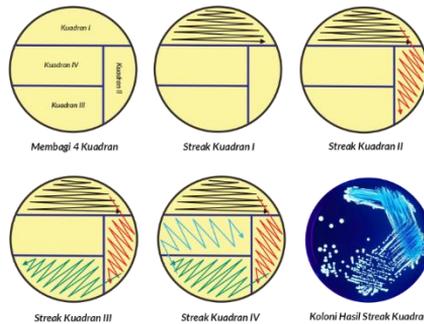
c. Goresan kuadran

Goresan kuadran adalah jenis goresan yang hampir sama dengan goresan T, tetapi dibagi menjadi 4 bagian atau wilayah yang disebut "kuadran". Diharapkan untuk memisahkan koloni bakteri lebih baik sehingga hanya ada satu koloni bakteri. Goresan kuadran juga dapat dilakukan dengan menggores zig-zag atau terputus.

Cara kerja goresan kuadran adalah sebagai berikut:

- 1) Tandai bagian luar-bawah cawan petri dengan membagi cawan menjadi 4 kuadran menggunakan spidol marker.
- 2) Bakar jarum ose diatas api bunsen untuk sterilisasi.
- 3) Setelah dingin, ambil satu ose koloni mikroorganisme secara aseptis.
- 4) Transfer koloni pada ose ke dalam medium cawan pada kuadran 1 dengan streak zig-zag.
- 5) Panaskan kembali jarum ose di atas api bunsen dan tunggu hingga dingin.
- 6) Putar cawan agar menghadap ke kuadran 2 dan lakukan goresan zig-zag dengan menyambung dari ekor goresan ke-1.
- 7) Lakukan hal yang sama pada kuadran ke-3 dan ke-4.

(Cappuccino dan Sherman, 2002).



Gambar 17.3. Metode Goresan Kuadran

2. Metode Tuang (*pour plate*)

Metode cawan tuang, atau *pour plate*, menumbuhkan bakteri di dalam media agar dengan mencampur media yang masih cair dengan stok kultur bakteri. Ini memungkinkan koloni bakteri tersebar secara merata di media agar. Metode tuang ini adalah metode yang biasa dipakai untuk mengetahui berapa banyak mikroorganisme yang terdapat dalam sampel campuran yang ditambahkan ke dalam media cair sebelum memadat. Proses ini menghasilkan koloni yang distribusinya seragam ke seluruh media padat. Koloni akan tumbuh di dalam agar.

Keunggulan dari metode cawan tuang (*pour plate*) yaitu bisa dipakai untuk mendapat biakan murni (Damayanti et al., 2020), bisa dipakai untuk memperoleh biakan murni sebab resiko kontaminasinya lebih rendah, kultur bakteri memberikan hasil permukaan bakteri yang lebih halus dan merata di seluruh media pertumbuhan, pengukuran diameter koloni bakteri lebih mudah, dan kultur bakteri membutuhkan waktu yang lebih singkat (Seniati et al., 2017). Di samping itu, kelebihan dari metode tuang (*pour plate*) lainnya adalah diperolehnya mikroorganisme larut dalam sampel dapat dengan mudah tersebar di seluruh medium

cawan petri, sel hidup dapat dihitung secara langsung, dan metode ini menggunakan prinsip kerja yang sederhana.

Gambar 17.4. Tahapan Metode Tuang Bakteri



Kekurangan dari metode tuang (*pour plate*) adalah waktu inkubasi lama, mudah terkontaminasi, sterilisasi medium sangat berpengaruh terhadap hasil, dan sel mati sulit dihitung karena letaknya yang saling berdekatan. Kekurangan lainnya adalah mikroorganismenya yang dipakai harus tahan terhadap suhu tinggi (Moses, 2021). Prosedur metode tuang adalah sebagai berikut:

- Menyiapkan alat dan bahan
- Suspensi bakteri sebanyak 1 ml dituang ke dalam dasar cawan petri kosong
- Menuang media agar ke atas suspensi bakteri dan di homogenkan dengan memutar cawan petri menyerupai nomor 8.
- Dibiarkan sampai memadat
- Menginkubasi cawan tersebut pada incubator sesuai dengan suhu yang diinginkan.
- Diamati koloni bakteri yang tumbuh setelah 48 jam inkubasi

3. Metode Sebar (*spread plate*)

Metode cawan sebar (*spread plate*) digunakan untuk menumbuhkan koloni bakteri pada media yang telah padat. Koloni bakteri dapat tersebar secara merata, tetapi metode ini agak sulit, terutama saat meratakan suspensi dengan batang bengkok, yang dapat menyebabkan bakteri terkontaminasi (Dwidjoseputro, 2005).

Metode ini menginokulasi bakteri secara pulsan/sebaran di permukaan agar yang sudah memadat. Pada metode ini, dengan menggunakan spatula berbentuk L yang steril, sebagian

kecil campuran bakteri yang menggantung (sekitar 100 hingga 200 sel) dimasukkan ke tengah medium untuk membuatnya padal dan tersebar secara merata.

Kelebihan pada metode sebar adalah membutuhkan medium sedikit, koloni mudah terhitung karena posisi yang saling berjauhan, termasuk dalam metode dengan prinsip sederhana, dan mikroorganismenya secara merata dengan bantuan drygalsky atau batang L. Kekurangan pada metode sebar (*spread plate*) adalah hanya mikroba aerob yang dapat terhitung, memiliki tingkat ketelitian yang rendah, mudah terkontaminasi karena menggunakan spatula dalam meratakan kultur pada medium, dan membutuhkan waktu yang lama.

Gambar 17.5. Tahapan Metode Sebar



Prosedur metode sebar (*spread plate method*) adalah sebagai berikut:

- Media padat sekitar 15 ml dituang dalam cawan petri dan dibiarkan hingga memadat.
 - Meneteskan sampel sebanyak 1-2 tetes ke tengah cawan petri berisi medium agar nutrisi steril secara aseptis.
 - Celupkan batang L ke dalam alkohol 95 % dan bakar sebentar dengan Bunsen atau lampu spiritus.
 - Dinginkan batang L dengan menempelkannya sebentar ke bagian dalam tutup cawan petri, lalu gesek tetesan suspensi bakteri pada permukaan medium ke atas dan ke bawah sambil memutar-mutar petri.
 - Lakukan hingga diperoleh sebaran suspensi yang merata dan kering di seluruh permukaan petri.
 - Inkubasi pada suhu ruang, 35°C dan dalam kulkas .
 - Amati pertumbuhan koloni bakteri pada permukaan media setelah 48 jam
- (Hafsan, 2014).

4. Metode Pengenceran

Metode pengenceran bertingkat adalah tahap analisis laboratorium yang berfungsi untuk mengencerkan jumlah mikroorganisme di dalam sampel (jika diperkirakan sangat padat) dengan perbandingan pengenceran 1:9 sehingga diperoleh pengenceran 1/10 untuk setiap tingkat pengencerannya. Perbandingan lain juga dapat diaplikasikan, misalx 1:2 atau 1:5.

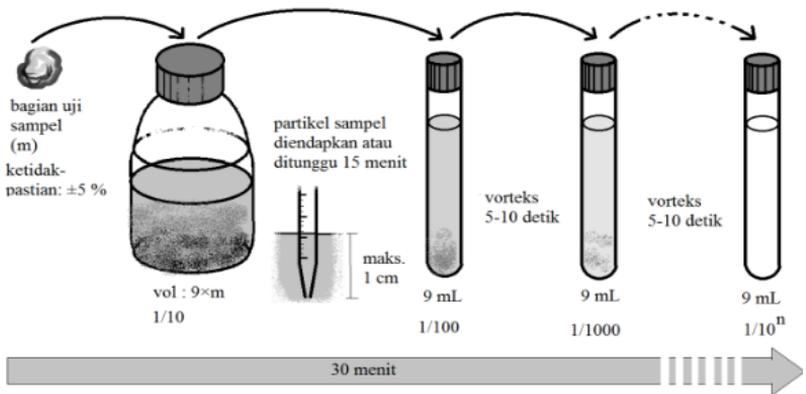
Pengenceran pertama adalah suspensi, larutan atau emulsi yang diperoleh setelah menimbang atau mengukur kuantitas suatu produk sebelum diuji yang telah dicampur dengan pengencer sebanyak Sembilan kali lipatnya sehingga jika terdapat partikel besar dapat terendapkan. Sedangkan pengenceran bertingkat selanjutnya adalah suspensi atau larutan yang diperoleh dengan mencampur volume yang terukur dari pengenceran pertama dengan volume Sembilan kali lipatnya dan dengan mengulangi cara ini dengan pengenceran sdesimal selanjutnya sampai diperoleh pengenceran yang cocok untuk inokulasi.

Pemilihan larutan pengencer pada metode ini sangat berpengaruh terhadap hasil pemeriksaan. Berdasarkan ISO 6887-1 (1999), ISO 6887-2 (2003) dan ISO 8199 (2005) beberapa larutan pengencer yang dapat digunakan adalah *peptone salt solution*, *buffered peptone water*, *peptone salt solution dengan bromcresol purple*, *saline solution*, *peptone diluent*, *ringer solution*, *phosphate buffer solution* dan *Butterfield buffered phosphate diluent*. Penggunaan pengencer ini harus disesuaikan dengan jenis sampel yang akan diperiksa.

Larutan pengencer yang telah disediakan dibagi ke dalam tanung yang berisi dengan volume 0,9 ml dan telah disterilkan. Pemindahan cairan saat pengenceran sebaiknya menggunakan pipet ukur 1 dan 10 ml dengan skala 0,5 ml. Adapun prosedur pemeriksaan dengan metode pengenceran adalah sebagai berikut:

- 1) Menimbang sampel untuk sampel padat dan memipet sampel jika sampel cair

- 2) Larutan pengencer ditambahkan sebanyak 9 ml pada sampel
- 3) 1 ml dari pengenceran pertama dipindahkan dengan menggunakan pipet ke dalam tabung yang mengandung 9 ml larutan pengencer dan dihomogenkan.
- 4) Perlakuan tersebut diulang seterusnya sampai dengan tabung terakhir pada tingkat pengenceran
- 5) Setelah proses pengenceran selesai maka tabung diinkubasi pada suhu yang sesuai



Gambar 17.6. Tahapan Metode Pengenceran bakteri

Menurut Wasteson dan Hornes (2009) dalam Yunita et al. (2015), tujuan dari pengenceran bertingkat adalah mengurangi jumlah mikroba dalam cairan. Penentuan tingkat pengenceran tergantung kepada perkiraan jumlah mikroba yang ada pada sampel. Digunakan perbandingan 1:9 untuk sampel pengenceran pertama hingga selanjutnya sehingga didapat 1/10 sel mikroorganisme dari pengenceran sebelumnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Cappuccino, J. G. & N. Sherman. 2002. *Microbiology: A laboratory manual*.
- Harti, A. S. *Mikrobiologi Kesehatan*. Jakarta: Badan Litbangkes, Kementerian Kesehatan RI, 2015
- Hafsan, *Mikrobiologi Analitik*, Makassar: Alauddin University Press, 2014.
- Lestari, P. B., Hartati, T. W. *Mikrobiologi Berbasis Inquiry*. Jakarta : Penerbit Gunung Samudera. Malang : UIN Maulana Malik Ibrahim Press, 2017
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2008). *Brock's Biology of Microorganisms* (12th ed.). San Fransisco: Pearson Benjamin Cummin
- Moses, R., 2022. *Isolasi Mikroorganisme*. Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Analitika Data, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS).
- Rasyidah and R. Fariani, "Perbandingan Teknik Penyimpanan Menggunakan Medium Yang Berbeda Terhadap Viabilitas Kapang *Colletotrichum Capsici* Dan *Prycularia Oryzae*," *Jurnal Pengelolaan Laboratorium Pendidikan*, vol. 3, no. 2, 2021, doi: 10.14710/jplp.3.2.69-76
- Seniati, Marbiah and Nurhidayati, "Kajian Uji Konfrontasi Terhadap Bakteri Patogen dengan Menggunakan Metode Sebar, Metode Tuang, dan Metode Gores," *Jurnal Galung Tropika*, vol. 6, no. 1, pp. 42-48, 2017.
- Yunita, M., Hendrawan, Y., dan Yulianingsih., R. (2015). Analisis Kualitatif Mikrobiologi Pada Makanan Penerbangan (Aerofood ACS) Garuda Indonesia Berdasarkan TPC (Total Plate Count) Dengan Metode Pour Plate. *Jurnal Keteknikan Pertanian Tropis dan Biosistem*, 3(3), 237-24

BIODATA PENULIS



Penulis Bernama Sanatang, S.Si, M.Kes lahir di pasitallu Kabupaten Kepulauan Selayar pada tanggal 18 Februari 1991. Penulis menyelesaikan Pendidikan strata-1 (S1) di program studi Kimia FMIPA Universitas Halu Oleo pada tahun 2013 dan melanjutkan studi Magister (S2) Ilmu Biomedik Konsentrasi Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar. Saat ini penulis tercatat sebagai dosen aktif di prodi D4 Teknologi Laboratorium Medis (TLM) di Universitas Mandala Waluya Kendari. Penulis mengampu mata kuliah imunoserologi, biokimia, toksikologi, diagnostik molekuler dan instrumentasi laboratorium medis. Book chapter yang telah ditulis berjudul "Biologi Molekuler bidang Kesehatan" dan "Toksikologi Klinik". Disamping itu penulis aktif menulis jurnal nasional maupun internasional. Email penulis (chemist_ana82@yahoo.com) no hp 081230373273.

BAB 18

Fisiologi Bakteri

* Venny Patricia, S.Pd., M.Kes*

A. Definisi dan Peran penting fisiologi bakteri

Fisiologi bakteri ialah penelitian tentang fungsi dan aktivitas sel bakteri, seperti metabolisme, pertumbuhan, dan reproduksi. Proses-proses ini dapat dilakukan dengan pembelahan sel atau pembentukan spora, tergantung pada kondisi lingkungan. Dengan memahami fisiologi bakteri, kita dapat lebih memahami peran penting bakteri dalam berbagai aspek kehidupan, termasuk dalam industri, kesehatan, dan lingkungan.

Fisiologi bakteri mengacu pada studi tentang proses dan fungsi biologis yang mengatur kehidupan dan perilaku mikroorganisme (Hug et al., 2020). Hal ini mencakup aspek-aspek seperti komposisi kimiawi, kebutuhan nutrisi, pola pertumbuhan, dan respons terhadap rangsangan lingkungan. Bakteri memiliki kemampuan luar biasa untuk berkembang di lingkungan yang beragam, menunjukkan fleksibilitas metabolisme dan kemampuan beradaptasi.

Beberapa proses yang terjadi dalam fisiologi bakteri meliputi respirasi, fermentasi, fotosintesis, dan sintesis protein. Semua proses ini saling terkait dan sangat penting untuk memahami fisiologi bakteri secara keseluruhan. Sebagai contoh, bakteri *Escherichia coli* menggunakan proses fermentasi untuk menghasilkan energi dalam lingkungan tanpa oksigen terutama fermentasi asam campuran, untuk menghasilkan energi di lingkungan bebas oksigen (Intasian

et al., 2023). Selain itu, bakteri *Cyanobacteria* menggunakan fotosintesis untuk mengubah energi cahaya menjadi makanan yang dapat digunakan untuk pertumbuhan dan reproduksi mereka. Namun, bakteri *Mycoplasma pneumoniae* tidak memiliki jalur sintesis protein yang lengkap, sehingga mereka harus mengandalkan asam amino dari inangnya untuk memperoleh protein yang diperlukan (Stephanie et al., 2013). Hal ini menunjukkan bahwa tidak semua bakteri bergantung pada proses sintesis protein yang sama untuk pertumbuhan dan reproduksi mereka.

B. Relevansi fisiologi bakteri dalam kesehatan, bioteknologi, dan lingkungan

Menurut Harper & Hernandez, 2020, Bakteri merupakan organisme mikroskopis yang sangat penting untuk berbagai aspek kehidupan kita, seperti kesehatan dan keberlanjutan lingkungan. Untuk memanfaatkan potensi mereka dan mengurangi potensi bahaya mereka, sangat penting untuk memahami fisiologi bakteri, yang meliputi struktur seluler, metabolisme, dan adaptasi mereka (Harper & Hernandez, 2020).

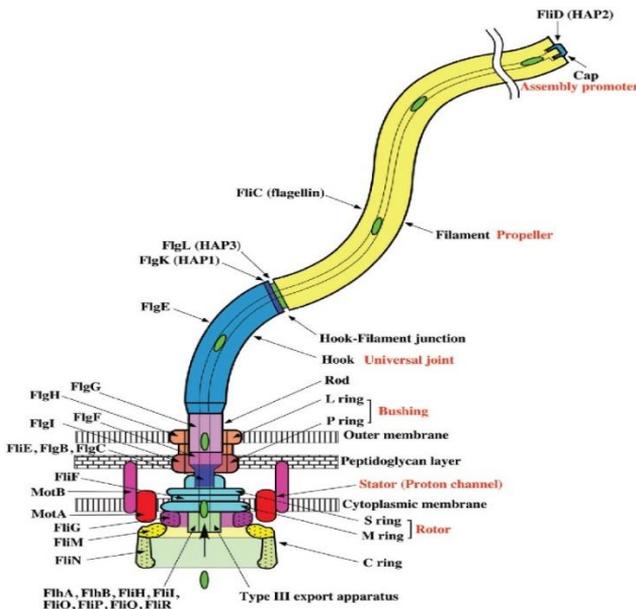
Studi tentang fisiologi bakteri memiliki relevansi yang signifikan dalam berbagai bidang: kesehatan, bioteknologi, dan manajemen lingkungan. Di sektor kesehatan, memahami fisiologi bakteri sangat penting untuk mengembangkan strategi antimikroba yang efektif dan memahami mekanisme patogenesis. Bakteri dapat menghasilkan senyawa bioaktif dengan aplikasi terapeutik yang potensial, menjadikannya kontributor yang berharga bagi bidang bioteknologi. Selain itu, peran bakteri dalam proses lingkungan, seperti siklus nutrisi dan bioremediasi, menyoroti pentingnya bakteri dalam menjaga keseimbangan ekologi (Hug et al., 2020).

C. Struktur Seluler Utama Bakteri dan Fungsinya

Bakteri memiliki berbagai struktur sel, yang masing-masing memiliki fungsi unik yang penting untuk adaptasi

dan kehidupan sehari-hari. Dengan memahami struktur ini, kita dapat memahami fisiologi bakteri dan hubungannya dengan lingkungan. Beberapa contoh fungsi dari struktur utama dan fungsinya yaitu sebagai berikut:

- 1) Selaput dinding sel Bakteri : terdiri dari membran luar, lapisan peptidoglikan dan membran dalam, yang berfungsi melindungi dari tekanan lingkungan luar dan mengatur keluar masuknya zat terlarut ke dalam dinding sel seperti yang dibahas pada bakteri *Deinococcus radiodurans* (Farci et al., 2022).
- 2) Flagel : komponen kompleks dengan badan basal, kait dan filamen, yang berfungsi untuk bergerak yang berperan sebagai motor putar sehingga memungkinkan bakteri bergerak mencari lingkungan yang menguntungkan (Minamino & Kinoshita, 2023). Struktur skematik flagel dapat dilihat dibawah ini (**Gambar 18.1**):



Gambar 18.1 Diagram skematik dari flagel bakteri. Warna yang berbeda mewakili komponen protein yang berbeda (Vonderviszt, F., & Namba, 2013).

- 3) Nukleoid dan Ribosom : Nukleoid mengandung DNA, sedangkan ribosom tersebar diseluruh sitoplasma, nukleoid mengatur materi genetik, ribosom terpusat di kutub sel untuk sintesis protein yang berfungsi untuk meningkatkan proses metabolisme bakteri (Dersch et al., 2022).
- 4) Stresosome : Komponen multiprotein yang menghubungkan sinyal dari rangsangan lingkungan luar, yang berfungsi mengatur respon seluler terhadap stress dan membantu kelangsungan hidup bakteri selama lingkungan yang merugikan (Z. Zhao et al., 2024).

D. Metabolisme Bakteri

Metabolisme bakteri mencakup beragam proses biokimia yang memungkinkan bakteri berkembang di berbagai lingkungan. Jalur metabolisme ini sangat penting untuk produksi energi, asimilasi nutrisi, dan sintesis komponen seluler penting. Memahami metabolisme bakteri tidak hanya menjelaskan ekologi mikroba tetapi juga mempelajari implikasinya bagi kesehatan manusia dan bioteknologi. Metabolisme bakteri melibatkan jalur energi yang unik, termasuk fermentasi, kemiosmosis, respirasi aerobik, dan respirasi anaerob sehingga memungkinkan bakteri menghasilkan energi dalam berbagai kondisi sebagai organisme sel tunggal prokariotik yang berbeda dari proses metabolisme organisme yang lebih tinggi. Berikut beberapa proses beberapa metabolisme bakteri yang melibatkan jalur energi sebagai berikut:

- 1) **Respirasi:** Metabolisme energi melibatkan respirasi aerob dan anaerob dimana bakteri dapat memanfaatkan oksigen untuk respirasi aerobik atau mengandalkan proses anaerob ketika oksigen langka, menggunakan fermentasi atau akseptor elektron alternatif (Liu et al., 2024).

- 2) **Kemiosmosis:** Proses ini melibatkan pembentukan ATP melalui pergerakan proton melintasi membran, mekanisme mendasar dalam pernapasan aerobik dan anaerob. Selain itu, proses kemiosmosis juga terjadi pada mitokondria selama respirasi aerobik, dimana proton dipompa keluar dari matriks melalui rantai transport elektron dan kembali ke dalam melalui ATP synthase untuk menghasilkan ATP. Dengan demikian, proses respirasi aerobik dan anaerobik serta kemiosmosis merupakan mekanisme yang sangat penting bagi sel dalam menghasilkan energi yang diperlukan untuk berbagai aktivitas seluler.
- 3) **Fermentasi:** proses bioteknologi penting yang digunakan di berbagai industri, termasuk makanan, pertanian, dan bioenergi. Ini melibatkan konversi metabolik substrat oleh bakteri, yang mengarah pada produksi produk berharga seperti alkohol, asam organik, dan enzim.

Jalur metabolisme utama: glikolisis, siklus Krebs, dan rantai transport elektron.

Jalur metabolisme utama bakteri terdiri dari 3 proses penting yaitu glikolisis, siklus Krebs dan rantai transport electron atau yang di kenal sebagai *Electron Transport Chain* (ETC) yang berperan penting untuk produksi dan metabolisme energi seluler. Proses glikolisis dimulai dari proses pemecahan glukosa menjadi piruvat yang selanjutnya akan memasuki siklus Krebs, Dimana proses oksidasi nya akan menghasilkan NADH dan FADH₂. Pembawa elektron ini kemudian masuk ke ETC, yang mengarah ke sintesis ATP melalui fosforilasi oksidatif. Interaksi antara jalur ini sangat penting untuk menjaga homeostasis energi dalam sel, terutama dalam metabolisme kanker.

1) Glikolisis

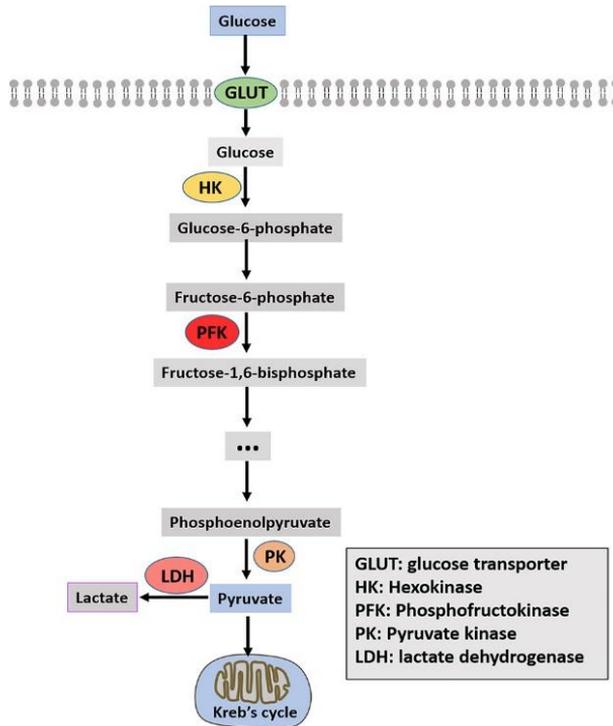
Glikolisis terjadi di sitoplasma, mengubah glukosa menjadi piruvat sambil menghasilkan ATP dan NADH. Sel kanker sering bergantung pada glikolisis aerobik, menghasilkan laktat bahkan dengan adanya oksigen, sebuah fenomena yang dikenal sebagai efek Warburg (Pal et al., 2022). Produk alami yang menargetkan enzim glikolitik telah menunjukkan harapan dalam menghambat pertumbuhan sel kanker (Zhao et al., 2022), Skema proses glikolisis ditunjukkan pada (**Gambar 18.2**).

2) Siklus Krebs

Siklus Krebs, atau siklus TCA, berlangsung di mitokondria, memanfaatkan asetil-KoA yang berasal dari piruvat untuk menghasilkan NADH dan FADH₂. Mutasi pada enzim siklus Krebs dapat menyebabkan akumulasi onkometabolit, mempengaruhi perkembangan tumor (Liu et al., 2024).

3) Rantai Transportasi Elektron

ETC terletak di membran mitokondria bagian dalam, menggunakan elektron dari NADH dan FADH₂ untuk membuat gradien proton, mendorong sintesis ATP (Liu et al., 2024). Gangguan fungsi mitokondria dapat mempengaruhi efisiensi produksi ATP, berdampak pada kelangsungan hidup dan proliferasi sel kanker. Sementara jalur ini penting untuk produksi energi, disregulasi mereka dalam sel kanker menyoroti kompleksitas pemrograman ulang metabolik. Pemrograman ulang ini dapat menyebabkan tantangan terapeutik, karena menargetkan jalur ini belum secara konsisten diterjemahkan ke dalam pengobatan yang efektif (Pal et al., 2022).



Gambar 18.2. Diagram skema proses glikolisis (Feng et al., 2022)

E. Regulasi Genetik dan Respon terhadap Lingkungan

Regulasi genetik respons bakteri terhadap perubahan lingkungan adalah interaksi kompleks dari berbagai mekanisme molekuler yang memungkinkan kelangsungan hidup dan adaptasi. Bakteri memanfaatkan sistem canggih, seperti stressosom dan sistem dua komponen (TCS), untuk merasakan dan merespons rangsangan lingkungan. Jaringan regulasi ini sangat penting untuk mengelola respons stres, sifat virulensi, dan interaksi ekologis. Berikut beberapa contoh bagian dari sistem regulasi genetik bakteri:

1) Stressosom dan Integrasi Sinyal

Stressosom bakteri adalah kompleks multiprotein yang mengintegrasikan sinyal dari stresor lingkungan, memfasilitasi respons seluler. Studi struktural mengungkapkan bahwa

stressosom dapat mengubah konfigurasi sebagai respons terhadap perubahan eksternal, meningkatkan kelangsungan hidup selama stress (Z. Zhao et al., 2024).

2) Peran DkSA dalam Respon Stres

DkSA diidentifikasi sebagai regulator utama di *Acinetobacter baumannii*, mengendalikan berbagai respons stres dan faktor virulensi. Regulator ini mempengaruhi ekspresi protein ribosom dan resistensi antibiotik, menunjukkan peran kritisnya dalam adaptasi bakteri terhadap lingkungan yang keras (Maharjan et al., 2023).

3) Two Component System (TCS)

TCS sangat penting dalam pensinyalan bakteri, memungkinkan adaptasi terhadap beragam isyarat lingkungan melalui transfer gugus fosforil. Variasi TCS di seluruh populasi bakteri yang berbeda menggambarkan adaptasi evolusioner mereka terhadap ceruk ekologi spesifik (Alvarez & Georgellis, 2023).

4) Heterogenitas Fenotipik

Bakteri menunjukkan heterogenitas fenotipik, di mana sel individu merespons secara berbeda terhadap perubahan lingkungan yang seragam, memungkinkan strategi bertahan hidup seperti taruhan hedging. Variabilitas ini sangat penting untuk membentuk komunitas yang kompleks dan mengelola respons stres selama infeksi inang (Spratt & Lane, 2022).

Bakteri menunjukkan kemampuan beradaptasi yang luar biasa terhadap perubahan lingkungan melalui mekanisme regulasi genetik yang rumit. Adaptasi ini sering melibatkan modifikasi pada tingkat transkripsi dan translasi sehingga memungkinkan bakteri untuk mengoptimalkan ekspresi gen bakteri dalam menanggapi berbagai kondisi. Berikut bukti bakteri memiliki kemampuan beradaptasi sebagai berikut:

- a) **Jaringan Pengatur Gen dan Crosstalk:** Bakteri beradaptasi dengan perubahan lingkungan melalui seleksi alam pada crosstalk antara *Gene regulatory network* (GRN) jaringan pengatur gen, yang meningkatkan kemampuan mereka

untuk merespons kondisi lingkungan baru. Proses ini memfasilitasi evolusi interaksi regulasi, memungkinkan strategi adaptasi yang lebih efektif dalam lingkungan yang berfluktuasi. Komponen penting yang dapat meningkatkan crosstalk dapat membuat GRN tertentu lebih mudah beradaptasi, memfasilitasi inovasi evolusioner dalam menanggapi tekanan lingkungan (Taylor et al., 2022).

- b) **Perubahan Transkripsi dan Translasi:** Dalam eksperimen evolusi jangka panjang, bakteri seperti *Escherichia coli* menunjukkan adaptasi paralel melalui peningkatan kelimpahan mRNA, yang berkorelasi dengan ukuran sel dan peningkatan pertumbuhan. Mutasi pada regulator transkripsi sering menyebabkan perubahan yang konsisten dalam ekspresi gen, menyoroti peran regulasi transkripsi dalam adaptasi (Favate et al., 2021).

F. Aplikasi dan Prospek Masa Depan

Peran bakteri dalam bioteknologi sangat penting, terutama dalam produksi enzim dan biofuel. Enzim bakteri adalah biokatalis penting yang memfasilitasi berbagai proses industri, sementara bakteri juga berkontribusi secara signifikan terhadap produksi biofuel melalui fermentasi dan rekayasa metabolisme. Keterlibatan dalam banyak proses ini menggarisbawahi pentingnya bakteri dalam meningkatnya teknologi berkelanjutan.

1) Enzim Bakteri dalam Bioteknologi

Aplikasi enzim bakteri digunakan di berbagai sektor, termasuk farmasi, makanan, tekstil, dan bahan bakar hayati. Teknik enzim diproduksi melalui fermentasi terendam (SmF) dan fermentasi solid-state (SSF), dengan fokus pada ekstremofil untuk sifat enzimatik yang unik (Slimane & El-hafid, 2024). Jenis enzim yang umum diproduksi termasuk lipase, selulase, dan protease, yang sangat penting untuk berbagai aplikasi bioteknologi (Owoyemi, 2020).

2) Bakteri dalam Produksi Biofuel

Keterlibatan bakteri bersama mikroorganisme lain, merupakan bagian integral dalam memproduksi biofuel seperti bioetanol dan biogas melalui proses fermentasi. Proses produksi biomassa Lignoselulosa melibatkan enzim bakteri yang berperan dalam pemecahan bahan lignoselulosa kompleks, meningkatkan hasil biofuel dan mengurangi biaya, terlihat pada bakteri *Clostridium* dan *Pseudomonas* yang menghasilkan enzim untuk memecah biomassa lignoselulosa menjadi gula yang dapat difermentasi dan meningkatkan hasil biofuel (Kumari, 2022). Berbagai spesies bakteri yang mampu mendegradasi biomassa lignoselulosa dan menghasilkan alkana, seperti pada spesies *Bacillus* sebagai contoh bakteri *Bacillus atrophaeus* dan *Bacillus spizizenii* yang memproduksi alkana sebagai bahan bakar hayati (Hagaggi & Rady, 2024).

3) Rekayasa Genetika

Kemajuan dalam rekayasa metabolisme memungkinkan pengembangan strain rekayasa yang meningkatkan efisiensi fermentasi dan hasil produk (Kumari, 2022). Sementara fokus pada bakteri dalam bioteknologi signifikan, penting untuk mempertimbangkan ekosistem mikroorganisme yang lebih luas, termasuk jamur dan ganggang, yang juga memainkan peran penting dalam produksi enzim dan generasi biofuel. Pandangan holistik ini dapat mengarah pada solusi bioteknologi yang lebih terintegrasi dan berkelanjutan. Aplikasi di bidang kedokteran, pertanian dan bioteknologi sudah banyak menggunakan rekayasa genetic salah satunya menggunakan metode system CRISPR-Cas yang dapat melakukan genom. Salah satu contoh aplikasi dalam Kedokteran sebagai agen terapeutik, bakteri rekayasa sedang dikembangkan sebagai obat untuk mengobati penyakit, termasuk kanker dengan mengatur respon imun dan jalur metabolik (Lin et al., 2024).

4) Peran probiotik dalam dunia kesehatan

Probiotik memainkan peran penting dalam kesehatan, terutama dalam memerangi resistensi antibiotik dan meningkatkan mikrobiota usus. Mereka adalah mikroorganisme hidup yang memberikan manfaat kesehatan, termasuk modulasi respons imun dan pemulihan flora usus yang terganggu oleh antibiotik. Probiotik dapat mengurangi resistensi antibiotik dengan menghambat bakteri patogen dan mempromosikan mikrobioma seimbang, yang sangat penting untuk kesehatan secara keseluruhan (Khatun et al., 2024).

Beberapa contoh mekanisme aksi dari probiotik yaitu, 1) Sifat Antimikroba: Probiotik menghasilkan senyawa antimikroba yang menghambat pertumbuhan bakteri berbahaya, termasuk strain resisten seperti MRSA (Sadaqat, 2024). 2) Restorasi Kesehatan Usus: Probiotik membantu memulihkan keseimbangan mikrobiota usus, mengurangi kejadian diare terkait antibiotik dan masalah gastrointestinal lainnya (Arunavarsini, et al, 2024). 3) Probiotik meningkatkan respons imun, yang dapat membantu dalam mengelola infeksi dan kondisi peradangan (Mousa et al., 2023).

Aplikasi Klinis dari peran probiotik yaitu, a) Kesehatan Vagina: Probiotik telah terbukti mengurangi resistensi antibiotik pada mikrobioma vagina, meningkatkan kesehatan reproduksi pada wanita (Bakpa et al., 2024). b) Manajemen Penyakit Kronis: Mereka bermanfaat dalam mengelola kondisi seperti diabetes, obesitas, dan penyakit kardiovaskular (Khatun et al., 2024). Terlepas dari manfaatnya, penggunaan probiotik bukan tanpa kekhawatiran. Ada potensi interaksi tak terduga dengan obat-obatan dan kebutuhan untuk pengawasan peraturan dalam pemberian probiotik (Mousa et al., 2023).

DAFTAR PUSTAKA

- Alvarez, A. F., & Georgellis, D. (2023). Environmental adaptation and diversification of bacterial two-component systems. *Current Opinion in Microbiology*, 76, 102399. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:264797934>
- Arunavarsini, Yuvansasi V, Sekar M, Durga Devi. L, M. R. (2024). Probiotics and its Application in Humans: An Overview. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 36(7), 220-237. <https://doi.org/10.9734/jpri/2024/v36i77552>
- Bakpa, E Chinyere, Charity, Ezeanya, Chidozie, V, Udeogu, Nneka, R., Agbakoba, Immaculata, Ogochukwu, Uduchi., C., E., E. (2024). Probiotics: Mitigating antibiotic resistance in the vaginal microbiome. *Microbes and Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.21608/mid.2024.266564.1782>
- Dersch, S., Rotter, D. A. O., & Graumann, P. L. (2022). Heterogeneity of Subcellular Diffusion in Bacteria Based on Spatial Segregation of Ribosomes and Nucleoids. *Microbial Physiology*, 32(5-6), 177-186. <https://doi.org/10.1159/000526846>
- Farci, D., Haniewicz, P., & Piano, D. (2022). The structured organization of *Deinococcus radiodurans*' cell envelope. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(45), e2209111119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2209111119>
- Favate, J. S., Liang, S., Yadavalli, S. S., & Shah, P. (2021). The landscape of transcriptional and translational changes over 22 years of bacterial adaptation. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.01.12.426406>
- Feng, Z., Ou, Y., & Hao, L. (2022). The roles of glycolysis in osteosarcoma. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 950886. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.950886>
- Hagaggi, N. S. A., & Rady, E. A. El. (2024). The potential of *Bacillus* species isolated from *Cinnamomum camphora* for biofuel production. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 139. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02402-4>

- Hug, J. J., Krug, D., & Müller, R. (2020). Bacteria as genetically programmable producers of bioactive natural products. *Nature Reviews Chemistry*, 4(4), 172–193. <https://doi.org/10.1038/s41570-020-0176-1>
- Intasian, P., Sutthaphirom, C., Binlaeh, A., Phonbuppha, J., Jaroensuk, J., Theanponkrang, S., Woraruthai, T., Tirapanampai, C., Onchan, W., Schulte, A., Buckel, W., Weeranoppanant, N., Wongnate, T., Sucharitakul, J., & Chaiyen, P. (2023). *Empowering extra fuel supply in E. coli by electron bifurcation for robust H₂, ATP and succinate production*. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2023-fz0lz>
- Khatun, M. T., Hoque, F., Hoque, N. S., Hossain, M. S., Alam, M. A., Afrin, S., Eva, T. N., & Tama, R. T. (2024). Emerging Role of Probiotics in Advancement of Combating Physical Abnormalities and Diseases: A Systematic Perspective Analysis. *Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, 16(8), 1–23. <https://doi.org/10.9734/ajbgmb/2024/v16i8397>
- Kumari, A. (2022). *Role of Microorganisms in Production of Biofuels*. 65–116. https://doi.org/10.1007/978-981-19-3582-4_4
- Lin, X., Jiao, R., Cui, H., Yan, X., & Zhang, K. (2024). Physiochemically and Genetically Engineered Bacteria: Instructive Design Principles and Diverse Applications. *Advanced Science*, 11(30), 2403156. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/advs.202403156>
- Liu, Y., Li, T., Yang, C., & Deng, H. (2024). Chapter 10 - Bacterial energy metabolism. In Y.-W. Tang, M. Y. Hindiyeh, D. Liu, A. Sails, P. Spearman, & J.-R. B. T.-M. M. M. (Third E. Zhang (Eds.), *Molecular Medical Microbiology (Third Edition)* (pp. 177–200). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818619-0.00155-6>
- Maharjan, R. P., Sullivan, G. J., Adams, F. G., Shah, B. S., Hawkey, J., Delgado, N., Semenec, L., Dinh, H., Li, L.,

- Short, F. L., Parkhill, J., Paulsen, I. T., Barquist, L., Eijkelkamp, B. A., & Cain, A. K. (2023). DksA is a conserved master regulator of stress response in *Acinetobacter baumannii*. *Nucleic Acids Research*, *51*(12), 6101–6119. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad341>
- Minamino, T., & Kinoshita, M. (2023). Structure, Assembly, and Function of Flagella Responsible for Bacterial Locomotion. *EcoSal Plus*, *11*(1), eesp-0011-2023. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0011-2023>
- Mousa, W. K., Mousa, S., Ghemrawi, R., Obaid, D., Sarfraz, M., Chehadeh, F., & Husband, S. (2023). Probiotics Modulate Host Immune Response and Interact with the Gut Microbiota: Shaping Their Composition and Mediating Antibiotic Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(18). <https://doi.org/10.3390/ijms241813783>
- Owoyemi, O. (2020). Clinical Pathology and Laboratory Medicine Abstract Abstract: *Journal of Clinical Pathology and Laboratory Medicine*, *2*(1), 2020.
- Pal, S., Sharma, A., Mathew, S. P., & Jaganathan, B. G. (2022). Targeting cancer-specific metabolic pathways for developing novel cancer therapeutics. *Frontiers in Immunology*, *13*, 955476. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.955476>
- Sadaqat, M. H. (2024). Antibacterial, antiviral, antifungal, and immunomodulatory properties of probiotics. *Afghanistan Journal of Basic Medical*, *1*(2), 111–120. <https://doi.org/https://doi.org/10.62134/ajbms/v2.i2.khatamuni.10>
- Slimane, M., & El-hafid, N. (2024). Recent status in production, biotechnological applications, commercial aspects, and future prospects of microbial enzymes: A comprehensive review. *International Journal of Agricultural Science and Food Technology*. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:268496791>
- Spratt, M. R., & Lane, K. (2022). Navigating Environmental

- Transitions: the Role of Phenotypic Variation in Bacterial Responses. *MBio*, 13(6).
<https://doi.org/10.1128/mbio.02212-22>
- Stephanie, G., R., S. S., G., S., Julia, B., & Jörg, S. (2013). Implication of Glycerol and Phospholipid Transporters in *Mycoplasma pneumoniae* Growth and Virulence. *Infection and Immunity*, 81(3), 896–904.
<https://doi.org/10.1128/iai.01212-12>
- Taylor, T. B., Shepherd, M. J., Jackson, R. W., & Silby, M. W. (2022). Natural selection on crosstalk between gene regulatory networks facilitates bacterial adaptation to novel environments. *Current Opinion in Microbiology*, 67, 102140.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.02.002>
- Vonderviszt, F., & Namba, K. (2013). Structure, function and assembly of flagellar axial proteins. In T. L. B. Austin (Ed.), *Madame Curie Bioscience*. In Madame Curie Bioscience Database [Internet].
www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6250/
- Zhao, Y., Chard Dunmall, L. S., Cheng, Z., Wang, Y., & Si, L. (2022). Natural products targeting glycolysis in cancer. In *Frontiers in pharmacology* (Vol. 13, p. 1036502).
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1036502>
- Zhao, Z., Hajiahmadi, F., Alehashem, M. S., & Williams, A. H. (2024). Molecular architecture and function of the bacterial stressosome. *Current Opinion in Microbiology*, 82, 102541.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2024.102541>

BIODATA PENULIS



Venny Patricia, S.Pd, M.Kes lahir di Palembang, 21 Juni 1984. Penulis tercatat sebagai lulusan Magister Kesehatan (S2) Bidang Ilmu Kedokteran Dasar dan Biomedis Universitas Padjajaran. Wanita yang kerap disapa Venny ini adalah anak pertama dari pasangan Syaiful (ayah) dan Mariah Hinnah (ibu). Penulis merupakan seorang dosen di Poltekkes Kemenkes Banten Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Kampus Tangerang. Pada 2023 lalu, Venny berhasil meraih penghargaan sebagai Dosen Berprestasi Poltekkes Kemenkes RI tingkat Nasional Tahun 2023.

BAB 19

Pewarnaan Kapsul

* Anindita Riesti Retno Arimurti, S.Si., M.Si. *

A. Pendahuluan

Bakteri merupakan organisme mikroskopis yang memiliki peran penting dalam berbagai aspek kehidupan, baik secara ekologis, medis, maupun industri. Identifikasi dan karakterisasi bakteri menjadi hal yang esensial dalam mikrobiologi, terutama untuk memahami sifat patogenik, resistensi antibiotik, serta peran biologisnya. Salah satu metode yang sering digunakan untuk mempelajari bakteri adalah melalui teknik pewarnaan (Pelczar et al., 2017).

Pewarnaan kapsul bakteri merupakan salah satu teknik yang digunakan untuk mengidentifikasi struktur kapsul pada bakteri. Kapsul merupakan lapisan luar yang tersusun atas polisakarida atau protein yang melingkupi dinding sel bakteri. Struktur ini berfungsi melindungi bakteri dari fagositosis oleh sel imun inang dan membantu dalam proses adhesi pada permukaan tertentu, sehingga sering dikaitkan dengan virulensi bakteri patogen (Willey et al., 2020).

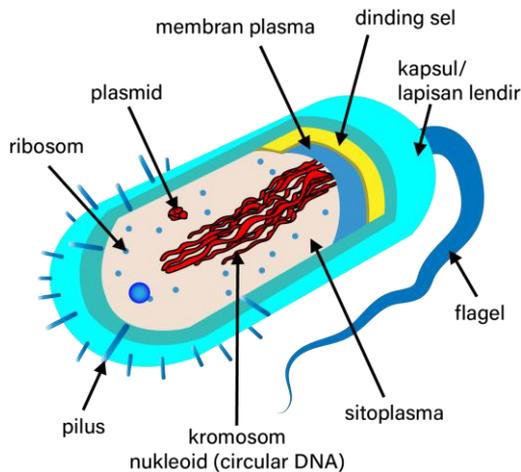
Teknik pewarnaan kapsul, seperti pewarnaan negatif atau pewarnaan khusus dengan tinta India, memberikan visualisasi yang jelas terhadap kapsul bakteri. Pewarnaan ini bekerja dengan mewarnai latar belakang atau sel bakteri, sementara kapsul tetap transparan karena sifatnya yang non-reaktif terhadap zat pewarna. Dengan demikian, teknik ini mempermudah analisis mikroskopis untuk mengenali bakteri

yang memiliki kapsul, seperti *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, dan *Bacillus anthracis* (Pelczar et al., 2017).

Pewarnaan kapsul tidak hanya penting dalam penelitian mikrobiologi dasar tetapi juga memiliki aplikasi dalam diagnosis penyakit infeksi. Dengan teknik ini, para peneliti dan tenaga medis dapat lebih cepat mengenali bakteri patogen, sehingga memungkinkan penerapan strategi pengobatan yang lebih tepat dan efektif (Widyarman et al., 2019).

B. Lapisan Kapsul

Sianobakteri dan beberapa jenis bakteri lainnya menghasilkan sekret yang sangat berlendir dan lengket pada permukaan sel. Lapisan ini sering disebut kapsul. Lapisan kapsul ini tersusun dari polisakarida atau polipeptida dengan ketebalan 1 - 2 μm . Lapisan kapsul ini memberikan manfaat pada bakteri yang memiliki lapisan kapsul ini. Jadi, kapsul bakteri adalah lapisan terluar yang tebal dan bersifat berlendir yang menyelubungi dinding sel bakteri (Kurniawan & Sahli, 2017).



Gambar 19.1. Struktur Kapsul pada Sel Bakteri

Lapisan kapsul ini banyak dihasilkan oleh bakteri penyebab penyakit, contohnya *Bacillus anthracis*, yaitu bakteri penyebab radang limpa pada ternak dan menyebabkan infeksi kulit pada manusia. Selain itu ada juga *Streptococcus pneumoniae*, yaitu bakteri

penyebab pneumonia pada manusia. Ada juga bakteri *Streptococcus mutans* juga mempunyai lapisan kapsul yang dapat menempel pada gigi dan dapat menyebabkan kerusakan email gigi (Hughes & Smith, 2007).

Kapsul atau lapisan lender ini tidak esensial bagi bakteri, akan tetapi berfungsi sebagai cadangan makanan dan sebagai perlindungan, baik perlindungan fagositosis maupun perlindungan dehidrasi. Kapsul dapat menyebabkan timbulnya sifat virulen/ infeksi terhadap inangnya. Jika bakteri kehilangan kapsul, maka ia dapat kehilangan virulensinya (Rini & Rohmah, 2017). Ada tidaknya kapsul pada bakteri ini pada dasarnya merupakan genetis, akan tetapi dapat juga dipengaruhi oleh komposisi medium ditumbuhkannya bakteri. Ketebalan kapsul dapat bervariasi tergantung pada spesies bakteri, usianya, dan media di mana bakteri itu tumbuh.

C. Komposisi Kapsul

Kapsul bakteri tersusun dari polisakarida, misalnya dekstran, asam hialuronat, levan dan selulosa. Akan tetapi beberapa bakteri memiliki kapsul yang berbahan dasar polipeptida. Bakteri yang mempunyai kapsul memiliki sifat tidak mudah menyerap pewarna sehingga ketika diamati dibawah mikroskop setelah pewarnaan Gram akan tampak kosong. Untuk melihat kapsul pada bakteri, diperlukan pewarnaan khusus seperti pewarnaan negatif atau pewarnaan kapsul (Carroll et al., 2017).

D. Fungsi Kapsul

Menurut (Muthiah et al., 2017), Kapsul pada bakteri memiliki beberapa fungsi, antara lain yaitu :

1. Perlindungan terhadap fagositosis: Kapsul membantu bakteri menghindari sistem imun inang, terutama dari fagosit (seperti makrofag).
2. Resistensi terhadap kekeringan: Melindungi bakteri dari dehidrasi dengan menjaga kelembapan.
3. Pelekatan: Membantu bakteri menempel pada permukaan atau jaringan inang, meningkatkan kolonisasi.

4. Perlindungan kimia: Melindungi dari bahan kimia beracun seperti antibiotik tertentu atau desinfektan.

E. Pewarnaan Kapsul

Pewarnaan kapsul lebih sulit dibandingkan dengan jenis prosedur pewarnaan differensial lainnya karena bahan kapsul bersifat larut air dan dapat dilepaskan atau dihilangkan dengan pembilasan berlebih. Apusan tidak boleh dipanaskan karena penyusutan sel yang dihasilkan dapat membentuk suatu zona jernih di sekitar organisme, yang disebut artefak, yang dapat terlihat seperti kapsul. Pewarna primer adalah kristal violet dan senyawa pemucat adalah tembaga sulfat. Untuk mengidentifikasi kapsul pada bakteri maka dapat menggunakan pewarnaan negative dengan reagen tinta india (Bai & Guo, 2024). Namun, reagen ini sulit ditemukan, karena dapat merusak lingkungan dan harganya tidak murah. Ciri kuman berkapsul, apabila ditanam pada media differential secara makroskopis bersifat mukoid atau koloni terlihat berlendir contohnya *Klebsiella* sp (Veronneca et al., 2024).

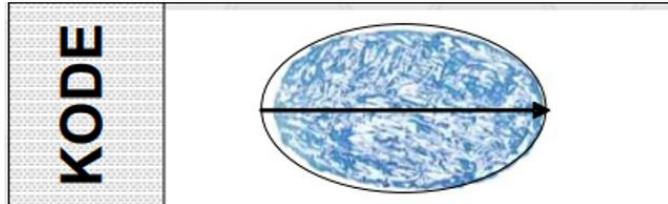
Tanpa pewarnaan, kapsul pada bakteri akan sulit untuk diamati dengan mikroskop cahaya karena kapsul bakteri transparan atau tidak berwarna. Oleh karena kapsul bakteri bersifat non-ionik maka tidak dapat dilakukan pewarnaan sederhana. Lapisan kapsul ini cukup tebal dan tidak dapat menyerap warna, sehingga hasil pewarnaan akan terlihat lapisan terang-tembus dengan latar yang berwarna (Widyarman et al., 2019).

F. Metode Pewarnaan Kapsul

Ada beberapa Teknik pewarnaan kapsul bakteri, antara lain : Burry Gins, Hiss, dan Muir. Akan tetapi yang sering dipakai yaitu Burry Gins. Karena bahan kapsul larut dalam air dan dapat dilepaskan melalui pembilasan berlebihan, pewarnaan kapsul lebih sulit dilakukan dibandingkan dengan prosedur pewarnaan differensial lainnya. Karena penyusutan sel yang dihasilkan dapat membentuk area jernih yang terlihat seperti kapsul di sekitar organisme, apusan tidak boleh dipanaskan. Kristal violet adalah pewarna utama, dan tembaga sulfat adalah senyawa pemucatnya

(penghilang warna). Berikut tahapan pewarnaan kapsul bakteri (Breakwell et al., 2009) :

1. Menyiapkan *object glass* yang bersih dan bebas lemak, kemudian difiksasi dengan dilewatkan pada api (flaming)
2. Membuat apusan bakteri pada *object glass* dari biakan bakteri *Klebsiella* sp. baik dari media padat maupun dari media cair



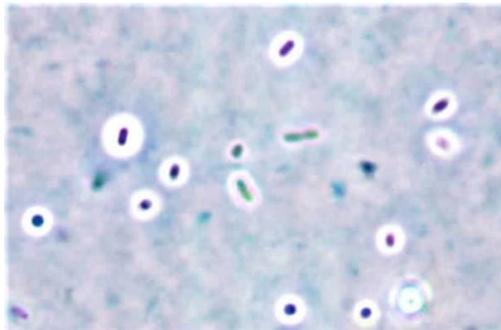
Gambar 19.2. Bentuk Apusan Bakteri untuk Pewarnaan Burry Gins

3. Hasil apusan ditunggu hingga kering (note : apusan tidak boleh dipanaskan)
4. Preparat diletakkan pada rak pengecatan lalu ditetesi 2 - 3 tetes Gentian violet 0,5% dan biarkan selama 1 - 5 menit
5. Setelah 5 menit, pewarna dibuang kemudian ditetaskan Cupri sulfat 20% setetes demi setetes sampai pewarna tidak luntur lagi
6. Preparat dikeringanginkan. Jangan diblot atau dikeringkan dengan tissue karena dapat menyebabkan kerusakan pada kapsul



Gambar 19.3. Prosedur Pewarnaan Kapsul Bakteri

7. Preparat diamati dibawah mikroskop dengan lensa perbesaran 100x
8. Oil imersi digunakan untuk perbesaran lensa 100x
9. Interpretasi hasil : Kapsul bakteri akan berwarna biru langit atau agak transparan sedangkan sel bakteri akan berwarna ungu (violet)



Gambar 19.4. Hasil Pewarnaan Kapsul Bakteri

Pewarna utama yang diaplikasikan adalah Gentian violet , yang mewarnai sel bakteri dan kapsul di sekitarnya. Larutan tembaga sulfat 20% kemudian diaplikasikan, yang memiliki fungsi ganda sebagai penghilang warna dan pewarna tandingan. Larutan ini menghilangkan dan mengganti Gentian violet di dalam kapsul saja. Di akhir prosedur pewarnaan, kapsul muncul sebagai lingkaran biru atau putih samar di sekitar sel ungu.

G. Aplikasi Pewarnaan Kapsul Bakteri dalam Bidang Penelitian Mikrobiologi

Pewarnaan kapsul bakteri adalah salah satu teknik yang digunakan dalam penelitian mikrobiologi untuk mengidentifikasi bakteri yang memiliki kapsul. Kapsul adalah struktur pelindung yang terbuat dari polisakarida, protein, atau campuran keduanya yang melapisi dinding sel bakteri. Teknik pewarnaan ini penting karena kapsul berfungsi dalam patogenisitas bakteri, seperti perlindungan terhadap fagositosis dan antibodi. Berikut adalah aplikasi pewarnaan kapsul dalam penelitian mikrobiologi (Mahon & Lehman, 2022):

1. Identifikasi Bakteri Patogen

Banyak bakteri patogen memiliki kapsul, seperti *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Neisseria meningitidis*. Pewarnaan kapsul membantu mengidentifikasi bakteri ini dengan mudah dalam sampel klinis.

2. Studi Patogenisitas

Penelitian tentang peran kapsul dalam meningkatkan virulensi bakteri memanfaatkan teknik pewarnaan untuk mengamati kapsul pada berbagai kondisi.

3. Studi Resistensi Bakteri

Kapsul sering terlibat dalam mekanisme resistensi terhadap antibiotik dan sistem imun inang. Pewarnaan kapsul dapat membantu memahami bagaimana kapsul berkontribusi terhadap resistensi ini.

4. Pengembangan Vaksin

Banyak vaksin, seperti vaksin pneumokokus, dirancang berdasarkan struktur kapsul bakteri. Pewarnaan kapsul digunakan untuk memastikan keberadaan dan integritas kapsul dalam strain yang akan dijadikan bahan vaksin.

DAFTAR PUSTAKA

- Bai, R., & Guo, J. (2024). Interactions and Implications of *Klebsiella pneumoniae* with Human Immune Responses and Metabolic Pathways: A Comprehensive Review. *Infection and Drug Resistance*, 17, 449–462.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S451013>
- Breakwell, D. P., Moyes, R. B., & Reynolds, J. (2009). Differential Staining of Bacteria: Capsule Stain. *Current Protocols in Microbiology*, 15(1).
<https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03is15>
- Carroll, K. C., Hobden, J. A., Miller, S., Morse, S. A. A., Mietzner, T. A., Detrik, B., Mitchell, T. G., McKerrow, J. H., & Sakanari, J. A. (2015). *Mikrobiologi Kedokteran*. Buku Kedokteran EGC.
- Hughes, R. B., & Smith, A. C. (2007). *Capsule Stain Protocols*.
- Kurniawan, F. B., & Sahli, I. T. (2017). *Bakteriologi Praktikum Teknologi Laboratorium Medik*. Buku Kedokteran EGC.
- Mahon, C. R., & Lehman, D. C. (2022). *Textbook of Diagnostic Microbiology 7th Ed* (7th ed.). Elsevier.
- Muthiah, H., Dewi, W., & Sudjarwo, I. (2017). Pemanfaatan Ekstrak Etil Asetat Buah Merah Sebagai Zat Warna Primer Pada Teknik Pengecatan Negatif Kapsul Bakteri. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran*, 29(1).
<https://doi.org/10.24198/jkg.v29i1.18602>
- Pelczar, M. J. Jr., Chan, E. C. S., & Krieg, N. R. (2017). *Microbiology* (6th Ed.). McGraw-Hill Inc.
- Rini, C. S., & Rohmah, J. (2017). *BUKU AJAR MATA KULIAH BAKTERIOLOGI DASAR UMSIDA PRESS SIDOARJO UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SIDOARJO 2020*. UMSIDA Press.

- Veronneca, R., Apriani, D., & Natalia, A. (2024). PEMANFAATAN ARANG BIJI TERUNG BELANDA SEBAGAI PEWARNAAN ALTERNATIF KAPSUL BAKTERI Info Artikel. *Bastian / Jurnal Analis Kesehatan Klinikal Sains*, 12(1). <http://jurnal.univrab.ac.id/index.php/klinikal>
- Widyarman, A. S., Erfan, E., Binarta, C. T. O., & Sunoto, R. I. (2019). *BUKU PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI*. Universitas Trisakti Publisher.
- Willey, J. M. ., Sandman, K. M. ., & Wood, D. H. . (2020). *Prescott's microbiology (11th ed.)*. McGraw-Hill Education.

BIODATA PENULIS



Anindita Riesti Retno Arimurti, lahir di Kendari, Sulawesi Tenggara, Indonesia pada tanggal 5 April 1989. Jenjang Pendidikan S1 ditempuh di Universitas Gadjah Mada, Fakultas Biologi. Kemudian Pendidikan S2 ditempuh di Universitas Airlangga, Jurusan Ilmu Forensik. Saat ini menjabat sebagai Chief Editor The Journal of Muhammadiyah Medical Laboratory Technologist. Penulis merupakan staff dosen Prodi DIII Teknologi Laboratorium Medis sejak tahun 2016. Penulis merupakan dosen dibidang Parasitologi, Mikrobiologi, dan Biologi Molekuler. Beberapa buku yang sudah pernah diterbitkan antara lain : Mencari potensi mikroba sampah : (isolasi mikroba pendegradasi limbah polimer berbahan dasar high density polyethylene (HDPE) dan *Low Density Polyethylene* (LDPE)), Peran Bakteri *Rockwool Hidroponik* Tanaman Sawi (*Brassica rapa* L.) dalam Meningkatkan Kualitas dan Kuantitas Hasil Panen di Balai Tani Jawa Timur, Fitoremediasi Mangrove dalam Penurunan Kadar Logam Pb, Hg dan Cu, dan Peran mikroba indogenous dalam bioremediasi: (suatu teknologi alternatif untuk pelestarian lingkungan di perairan mangrove).

Contact person : +6281216140525,
aninditariesti@um-surabaya.ac.id

BAB 20

Pemeriksaan Most Probable Number

* Ni Putu Sinta Puspa Dewi, S.Si., M.Si. *

A. Pendahuluan

Lingkungan mempunyai risiko penyebaran adanya kotoran yang lebih tinggi yang disebabkan oleh kuman yang tidak dapat dikontrol oleh manusia. Kontaminasi dapat terjadi terutama yang berasal dari lingkungan perairan yang terkontaminasi ke lingkungan tanah, dan penggunaan air sebagai pelengkap bahan makanan ke manusia. Bahan makanan yang terkontaminasi dapat dilakukan serangkaian pengujian mikrobiologis untuk menentukan kualitas dalam bahan dasar untuk makanan layak untuk dikonsumsi (Sasika, dkk., 2010).

Standar pengujian untuk air minum, menurut WHO, sampel tidak mengandung *Escherichia coli* dan Coliform. Pada 95% sampel dalam 100 mL tidak mengandung coliform dan *Escherichia coli* dalam dua sampel yang berurutan (AOAC, 2000).

Istilah coliform telah lama digunakan oleh ahli mikrobiologi Inggris. Negara Amerika dan Norton menyarankan untuk menggambarkan bakteri fermentasi laktosa yang digunakan sebagai ukuran polusi air. Pada tahun 1937 H. E. Jordan menyarankan bahwa sebagai editor Jurnal American Water Works Association, kebijakannya dengan mengganti bakteri "Coliform" dengan B atau kelompok bakteri usus besar (Leland, 1939).

Anggota pertama dari kelompok coliform adalah jenis *Klebsiella pneumoniae* dari fibrinous akut pneumoniae dan *K. rhinoscleromatis* dari rhinoscleroma. Penekanan bakteriologi awal pada aspek medisnya mendukung penemuan pathogen. Penyertaan jenis bakteri yang ditemukan di saluran pernapasan atas ke dalam kelompok dengan bakteri coliform dari usus dan dari fermentasi susu. Strain coliform yang menginfeksi pada hewan adalah *Escherichia*, yang terjadi pada fase mucoid dan seringkali atipikal untuk fermentasi laktosa yang termasuk anggota *Klebsiella* (Leland, 1939).

Escherichia mencirikan Bakteri komuni sebagai jenis bakteri basil dengan motilitas lemah dengan menggumpalkan susu namun tidak mencairkan gelatin; selain itu memfermentasi gula susu, dan gula anggur dengan pelepasan gas yang menghasilkan pertumbuhan yang lembab pada kentang dengan menghasilkan warna kuning dan mengindikasikan adanya penyakit diare. Durham, menamai varietas fermentasi sukrosa dari basil usus besar *Bacillus* - komuni. Di antara spesies coliform lainnya bahwa dapat disebutkan jenis "*Milchsiaurebacterium*" dari Heuppe (1884) yang dijelaskan oleh Zopf (1885) sebagai *Bakterium acidi-latici* dan *B. neapolitanum* Flugge (1885). Kedua spesies ini dan B-Komuni muncul pada buku Bergey's sebagai varietas (genus) *Escherichia* (Leland, 1939).

Escherichia merupakan bakteri anaerob fakultatif yang dominan ditemukan pada kolon manusia. Organisme dapat ditemui dalam saluran pencernaan bayi dalam beberapa jam dan setelah itu inang memperoleh manfaat timbal balik. *Escherichia* tetap terkonsesi yang tidak berbahaya pada lumen usus namun pada inang yang lemah akan terjadi immunosupresi dan bakteri yang non pathogen pada strain *E. coli* dapat menyebabkan infeksi (James dan James, 1998).

B. Metode Most Probable Number (MPN)

1. Pengertian

Menurut Farmakope Amerika Serikat oleh makanan di AS dan Drug administrasi pada manual analitik bakteriologis menggunakan studi kualifikasi untuk media dan alternatif cepat untuk metode mikrobiologi. Dalam penentuan jumlah mikroba dapat dilakukan dengan metode perhitungan langsung pada suatu sampel atau melalui metode perhitungan tidak langsung dengan alat centrifuge, berdasarkan kekeruhan, penggunaan perhitungan elektronik, berdasarkan analisis kimia, berat kering, dan menggunakan cara pengenceran.

Metode pengenceran umumnya menggunakan medium cair dengan menginokulasi larutan dari hasil pengenceran (Fardiaz, 1993). Konsep dasar metode MPN mirip dengan metode pecahan negative yang menentukan nilai -D. Kaldu nutrisi akan mendukung pertumbuhan organisme dan berubah keruh. Pola dasar dalam pertumbuhan dan tanpa pertumbuhan dapat memberikan informasi karena merupakan cerminan dari kesalahan pengambilan sampel. Pada satu tabung replikasi, media menerima pengenceran sampel yang mengandung sel bacterial, maka tabung akan berubah keruh. Replikasi yang identic mungkin tidak menerima bakteri apapun dalam sampelnya karena pengambilan sampel dan tidak akan berubah keruh. Informasi ini penting jika jumlah organisme yang rendah. Tingkat akurasi meningkat dengan mengencerkan inoculum dan membandingkan pemulihan semua tabung di seri pengenceran (Scott, 2010).

Dasar dari metode MPN (dikenal dengan tabung ganda, pengenceran atau pengenceran metode tabung). Metode ini memberikan peluang nyata dalam membedakan jenis bakteri. Selain itu dapat digunakan untuk estimasi semikuantitatif dalam pertumbuhan di media cair serta alternatif mikrobiologi dengan metode sederhana yang termodifikasi. (Scott, 2010). Penentuan

nilai MPN dilihat melalui jumlah pertumbuhan bakteri dan kekeruhan dalam sampel. Sebagai contoh, sebanyak 10 nilai MPN dalam sampel, artinya mengandung 10 koloni pada tiap tabung/gram nya (Krisna, 2005).

Media yang digunakan dalam metode MPN berupa medium cair atau padat menggunakan tabung reaksi. Pola pertumbuhan dibaca melalui tabel untuk memberikan kemungkinan yang paling besar angka dan interval kepercayaan 95%. Berdasarkan hal ini, hasilnya akan mencerminkan nilai dan ditafsirkan sebagai nilai MPN. Pada tabel MPN hanya menyajikan hasil untuk tiga pengenceran secara berurutan tetapi seri pengenceran yang diuji 10^{-2} , hingga 10^{-4} tabung (FDA untuk pemilihan tabung yang dibaca) (Scott, 2010).

Faktor pengenceran dalam tabel dan percobaan actual diperhitungkan untuk mendapatkan jumlah yang paling mungkin dari metode ini. Hasil pengujian dinyatakan sebagai "MPN" daripada CFU (unit pembentuk koloni) untuk mencerminkan kemampuan metode (Scott, 2010). Adapun perhitungannya sebagai berikut :

$$\text{Bakteri} = \text{nilai MPN} \times 1/\text{pengenceran tengah}$$

2. Sejarah Perkembangan

Metode MPN umumnya ditemukan pada awal abad ke -20 yang dipublikasikan oleh McCrady tahun 1915, sementara itu perhitungan statistik untuk metode MPN oleh Halvorson dan Ziegler (1933), Eisenhart dan Wilson (1943), dan Cochran (1950). Seorang penemu bernama Woodward (1957), memberikan saran tentang hasil positif (jumlah banyaknya hasil positif tabung reaksi pada pengenceran) menyebabkan peningkatan kesalahan hasil uji laboratorium dalam metode MPN. Penemu lainnya bernama De Mann (1983), mempublikasikan terkait dengan perhitungan kepercayaan (*confidence interval*) pada tabel MPN (American Public Health Association, 2005).

3. Uji Metode Most Probable Number (MPN)

Metode MPN mengasumsikan secara acak pada pendistribusian mikroorganisme dalam sampel dan pengenceran yang akurat melalui seri pengenceran. Hal ini mengasumsikan bahwa mikroorganisme terpisah dan tidak dipengaruhi oleh jenis mikroba lainnya. Pada setiap tabung yang inokulumnya memiliki satu organisme akan menghasilkan pertumbuhan yang terlihat. Metode MPN memiliki 3 jenis pengujian antara lain, uji dugaan (presumptive test), uji penguat (confirmed test), dan uji pelengkap (complete test)(American Public Health Association, 2005).

a. Uji dugaan (presumptive test)

Uji dugaan dilakukan untuk mengetahui adanya bakteri coliform pada tabung reaksi, tanpa perlu membedakan jenis bakteri coliform. Pada pengujian ini dapat digunakan sampel seperti, air sumur, air isi ulang dan sebagainya untuk dilakukan pengenceran terlebih dahulu. Pengenceran dapat dilakukan hingga yang tertinggi, hal ini untuk mendapatkan hasil yang maksimal seperti, pengenceran hingga 10^{-11} .

Uji penduga menggunakan media kaldu laktosa pada tabung reaksi dan tabung Durham dengan posisi terbalik. Sampel air diinokulasi ke media kaldu laktosa dan diinkubasi selama 1-2 hari selama 24 jam. Diamati timbulnya gelembung gas pada tabung Durham dan kekeruhan. Gelembung gas dalam tabung Durham artinya terindikasi bakteri coliform. Namun jika tidak ada gelembung gas, maka sampel tidak dilakukan uji lanjut (Fadilasani dkk., 2020).

Analisis bakteri coli dapat dilakukan melalui metode APHA (*American Public Health Association*, 1989) untuk mengetahui keberadaan dan jumlah

bakteri. Metode lainnya menggunakan tabel Hopkins yang dikenal dengan tabel JPT, fungsi tabel Hopkins untuk mengetahui jumlah bakteri coli tiap 100mL. Dalam pengamatan hasil diamati melalui ada tidaknya gas dan kekeruhan pada media.

b. Uji penguat (*confirmed test*)

Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan medium *Brilliant green laktosa bile broth* yang bertujuan untuk mengetahui jenis bakteri coliform fekal dan non-fecal. Bakteri coliform fekal dilakukan inkubasi pada suhu $42 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Kusnadi (2003) menyatakan bahwa, bakteri coli fekal dan non fecal memiliki perbedaan dari temperatur inkubasi, yaitu pada coli fekal dilakukan inkubasi $42 \pm 1^{\circ}\text{C}$, sedangkan untuk masa inkubasi $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 1×24 jam. Pengamatan dilakukan dengan mengamati tabung reaksi yang telah diinkubasi adanya gelembung gas pada tabung Durham, dan kekeruhan.

c. Uji Pelengkap (*complete test*)

Uji pelengkap dilakukan untuk mengetahui bakteri coliform fekal menggunakan media *Eosin Methylene Blue Agar* dan *Mac Conkey (MCA)*. Tahapan dalam pengujian dengan mengambil satu loop ose dari sampel positif pada uji penguat dan dilakukan inokulasi ke dalam cawan petri yang sudah ada media *EMB Agar* dan *Mac Conkey (MCA)*. Cawan dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, dilakukan pengamatan secara mikroskopis dan makroskopis pada koloni bakteri di cawan Petri.

Pengamatan makroskopis pada cawan petri diamati koloni bakteri pada media *Mac Conkey*, ditandai dengan koloni berwarna merah yang mampu memfermentasi laktosa (Hasuti, 2015). Sehingga diartikan bahwa indikator kualitas air adalah adanya coliform. Kandungan coliform yang semakin sedikit

artinya kualitas air semakin baik. Pengamatan makroskopis pada media EMB Agar yang ditandai dengan koloni bakteri hijau metalik untuk bakteri *Escherichia coli*, sedangkan koloni bakteri yang berwarna merah menandakan jenis bakteri coliform.

Adapun jenis seri tabung yang dipakai pada pemeriksaan MPN, yaitu :

- 1) Seri tabung 5 1 1
 - a) 5 tabung LB double x 10 mL
 - b) 1 tabung LB single x 1 mL
 - c) 1 tabung LB single x 0,1 mL
- 2) Seri tabung 5 5 5
 - a) 5 tabung LB double x 10 mL
 - b) 5 tabung LB single x 1 mL
 - c) 5 tabung LB single x 0,1 mL
- 3) Seri tabung 3 3 3
 - a) 3 tabung LB double x 10 mL
 - b) 3 tabung LB single x 1 mL
 - c) 3 tabung LB single x 0,1 mL

4. Prinsip dalam metode MPN

Metode MPN menggunakan medium cair dalam seri tabung dengan menginokulasikan sampel cair. Pada sampel diencerkan berdasarkan seri tabungnya untuk menghasilkan jumlah mikroorganisme yang diamati pada tabel MPN. Penggunaan pengenceran pada tingkat tertentu untuk mendapatkan konsentrasi mikroorganisme yang diinginkan.

Hasil positif didapatkan tergantung pada banyaknya kandungan sel bakteri yang terambil oleh micropipet saat diinokulasi ke dalam media, sehingga homogenitas menjadi faktor utama pada metode MPN. Adanya hasil negatif dan positif dapat menentukan konsentrasi mikroorganisme pada sampel sebelum diencerkan. Adapun faktor yang mempengaruhi pada metode MPN :

- a. Pendistribusian bakteri sempurna di dalam sampel

- b. Bakteri terpisah tidak bentuk rantai atau kumpulan (pada bakteri coliform terpisah dan tidak berantai seperti *Escherichia coli*)
- c. Penggunaan media ditentukan berdasarkan pada suhu dan inkubasi sehingga pada saat inokulasi sampel pada tabung reaksi didapatkan hasil positif.
- d. Penentuan hasil positif didapatkan berdasarkan adanya bakteri yang hidup (viable), namun jika ada kematian sel bakteri tidak dapat terdeteksi dengan hasil positif

Metode MPN dilakukan pengamatan berdasarkan unit tumbuh pada mikroorganisme seperti *colony forming unit* (CFU) dan standar dalam jumlah sampel pada metode MPN adalah <100/g atau mL. Media yang digunakan antara lain media Brilliant green laktosa bile broth (BGLB) yang mengandung garam empedu dan laktosa pada bakteri fekal coliform dan *E. coli*. Dalam menghitung MPN dapat menggunakan kaldu *Lauryl Sulphate tryptose* (LST), Sehingga pada uji MPN mendapatkan hasil yang diharapkan.

5. Prosedur Kerja dalam metode MPN

- a. Persiapan pengambilan bahan pemeriksaan

Sampel yang digunakan adalah sampel air yang diambil dengan melakukan konsep dasar kerja di laboratorium, yaitu penggunaan peralatan harus steril, cara kerja harus aseptik, bahan pemeriksaan yang diambil harus mewakili serta diambil secepatnya untuk dilakukan pemeriksaan laboratorium. Tahapannya sebagai berikut :

- 1) Disiapkan wadah berupa botol kaca steril yang tertutup rapat dengan volume 250 mL
- 2) Pada pengambilan air botol dibuka selalu dekat dengan api, dan segera di tutup setelah botol terisi oleh air

- 3) Pemeriksaan bakteriologi *Escherichia coli* dapat dilakukan yaitu dengan menghitung jumlah dalam tiap 100 mL air minum yang disebut Most Probable Number dan mengisolasi secara kualitatif
- b. Persiapan media
- 1) Buatlah media (BGLB), (EMB) dan laktosa broth.
 - 2) Lalu disterilkan pada suhu 121°C , 1 atm selama 15 menit.
 - 3) Siapkan cawan petri steril dan tuang \pm 15 mL media EMB agar ke dalamnya. Biarkan media memadat dan disiapkan tabung reaksi dan tuang \pm 9 mL media BGLB dan laktosa broth.
- c. Tahapan uji pemeriksaan MPN
Adapun pemeriksaan MPN yang dilakukan dengan tiga tahap sebagai berikut :
- 1) Uji Penduga atau Presumptive test
 - a) Dipipet @10 mL sampel ke dalam tabung yang berisi Laktosa Broth Double Strength (LBDS), dan dihomogenkan
 - b) Dipipet @1 mL sampel ke dalam tabung yang berisi Laktosa Broth Single Strength (LBSS) dan dihomogenkan
 - c) Dipipet @0,1 mL sampel ke dalam tabung yang berisi Laktosa Broth Single Strength (LBSS), dan dihomogenkan
 - d) Diinkubasi selama 24 - 48 jam dengan suhu 37°C
*Tabung LBDS dan LBSS berisi 10 mL media
 - 2) Uji Penegas atau Confirmed test
 - a) Diambil satu ose dari LBDS dan LBSS yang positif, kemudian diinokulasikan pada media BGLB dan dihomogenkan
 - b) Diinkubasi selama 24 - 48 jam dengan suhu 37°C
*Tabung BGLB berisi 10 mL media

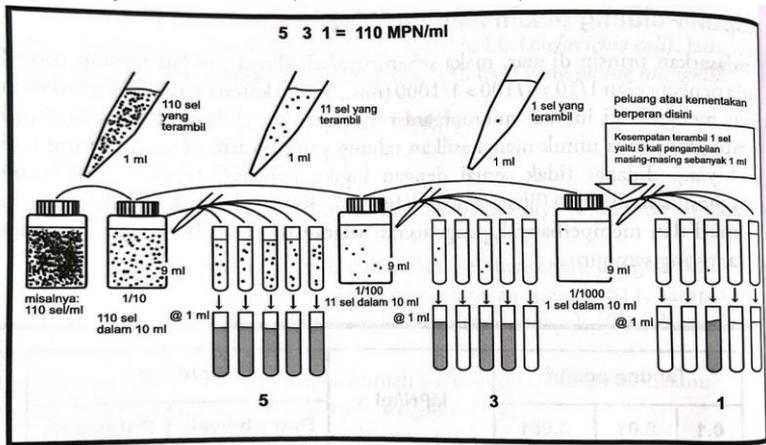
- 3) Uji Pelengkap atau Completely test
 - a) Diambil satu ose dari BGLB yang positif, kemudian diinokulasikan pada media EMB agar (dibuat streak 4 kuadran untuk single colony)
 - b) Diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C
 - c) Koloni bakteri yang telah tumbuh dilanjutkan dengan dibuat preparate smear untuk pewarnaan Gram dan uji biokimia

Interpretasi Hasil :

Negatif (-) : tidak terjadi kekeruhan dan gas

Positif (+) : terjadi kekeruhan dan gas

Catatan : apabila setelah diamati 24 jam tidak terbentuk gas, maka dilanjutkan inkubasi 48 jam.



Gambar 20.1 Pengenceran MPN (Kuswiyanto, 2021).

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. (2000). *Official Methods Of Analysis of Analytical Chemists*. AOAC Inc., Arlington.
- American Public Health Association. (2005). *Standart Methods For The Examination of Water and Wastewater 18th Edition 1992*. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. United States of America.
- Fadilasani, T.U., dan Miranti, M. (2020). Metode Most Probable Number (MPN) Sebagai Dasar Uji Kualitas Air Sungai Rengganis dan Pantai Timur Pangandaran Dari Cemaran *Coliform* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada*. 20(1).
- Fardiaz, S. (1993). *Analisis Mikrobiologi Pangan*. PAU. IPB.
- Goering, R.V., Dockrell, H. M., Zuckerman, Mark., dan Chiodini, P. L. (2021). *MIMS Mikrobiologi Medis*. Elsevier. Singapore.
- Hasuti, U. (2015). *Penuntun Praktikum Mikrobiologi Untuk Program S2 Biologi*. Malang: UMMPres.
- James, P.N., dan James, B.K. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 142-201
- Kementerian Kesehatan RI. (2014). *Prosedur Pemeriksaan Bakteriologi Klinik*. Kemenkes RI.
- Krisna, C. (2005). *Solid-State Fermentation Systems-An Overview. Critical Reviews in Biotechnology*. 25 : 1 - 30. <https://doi.org/10.1080/07388550590925383>
- Kuswiyanto. (2015). *Bakteriologi I Buku Ajar Analisis Kesehatan*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Kusnadi. (2003). *Mikrobiologi*. Bandung: JICA IMSTEP.

- Leland, W.P. (1939). Coliform Bacteria. Department of Bacteriology, Hygiene and Preventive Medicine, School of Medicine, The George Washington University, Washington, D.C.
- Sasika, S., Peni, A.W., dan Ratu, S. (2010). *Praktikum Mikrobiologi Dasar*. CV. Trans Info Media. Jakarta Timur.
- Scott, S. (2010). The Most Probable Number Method and Its Uses in Enumeration, Qualification, and Validation. *Journal of Validation Technology*.
- Vandepitto, J. dan Verhaegon, J., Engbaek, K., Rohner, P., Piot, P., dan Heuck, C. C. (2005). *Prosedur Laboratorium Dasar untuk Bakteriologi Klinis Edisi 2*. Buku Kedokteran EGC.
- Widiyanti, N.L.P.M., Warpala, I.W.S., dan Suryani, I.A.P. (2017). Parameter Fisik dan Jumlah Perkiraan Terdekat Coliform Air Danau Buyan Desa Pancasari Kecamatan Sukasada Buleleng. *Jurnal Sains dan Teknologi*. 6(1).

BIODATA PENULIS



Ni Putu Sinta Puspa Dewi, S.Si., M.Si., lahir di Pangkalan Bun, Kab. Kotawaringin Barat, Kalimantan Tengah, 21 Maret 1995. Jenjang Pendidikan S1 ditempuh di Universitas Udayana, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengentahuan Alam Prodi Biologi, Denpasar Bali, lulus tahun 2017. Pendiidkan S2 Ilmu Biologi, lulus tahun 2021 di Universitas Udayana. Saat ini sedang mengajar di Prodi Analisis Kesehatan, STIKES Borneo Cendekia Medika dengan bidang bakteriologi.

Email : puspadewisinta@gmail.com

No telp : 082342043613



PT MEDIA PUSTAKA INDO
Jl. Merdeka RT4/RW2
Binangun, Kab. Cilacap, Provinsi Jawa Tengah
No hp. 0838 6333 3823
Website: www.mediapustakaindo.com
E-mail: mediapustakaindo@gmail.com