

## **B. IDENTIFIKASI BAKTERI**

### 1. Pemeriksaan Mikroskopis

#### a. Pemeriksaan Langsung

Pemeriksaan langsung digunakan untuk mengamati pergerakan, dan pembelahan secara biner, mengamati bentuk dan ukuran sel yang alami, yang pada saat mengalami fixasi panas serta selama proses pewarnaan mengakibatkan beberapa perubahan.

Cara yang paling baik adalah dengan membuat sediaan tetesan gantung.

#### b. Pewarnaan

Teknik pewarnaan dikelompokkan menjadi beberapa tipe, berdasarkan respon sel bakteri terhadap zat pewarna dan sistem pewarnaan yang digunakan.

a). Untuk pemisahan kelompok bakteri digunakan pewarnaan Gram, dan pewarnaan acid-fast /tahan asam untuk *Mycobacterium*..

b). Untuk melihat struktur digunakan pewarnaan flagel, pewarnaan kapsul, pewarnaan spora, dan pewarnaan nukleus. Pewarnaan Neisser atau Albert digunakan untuk melihat granula metakromatik (volutin bodies) pada *Corynebacterium diphtheriae*.

Untuk semua prosedur pewarnaan mikrobiologis dibutuhkan pembuatan apusan lebih dahulu sebelum melaksanakan beberapa teknik pewarnaan yang spesifik. Caranya tidak sulit tetapi membutuhkan kehati-hatian dalam pembuatannya.

Tahap-tahap yang harus dilakukan secara hati-hati, adalah sebagai berikut :

1) Menyiapkan kaca objek: menghapus lemak atau minyak untuk membersihkan kaca dengan menggunakan air hangat atau serbuk penggosok, selanjutnya dengan suatu campuran air dan alkohol (alkohol 95%), kemudian kaca dikeringkan dan disimpan di atas lap laboratorium sampai siap untuk digunakan.

2) Pembuatan apusan: menghindari apusan yang tebal dan rapat adalah penting secara mutlak. Suatu apusan yang baik merupakan selapis tipis. Apusan dapat dibuat dari kultur kaldu atau medium kultur padat dengan berbagai cara:

3) Dari kultur kaldu, pengambilan satu atau dua loop kultur sel dapat langsung dipindahkan ke kaca objek dengan loop inokulasi steril dan sebarkan secara merata kira-kira sebesar uang logam.

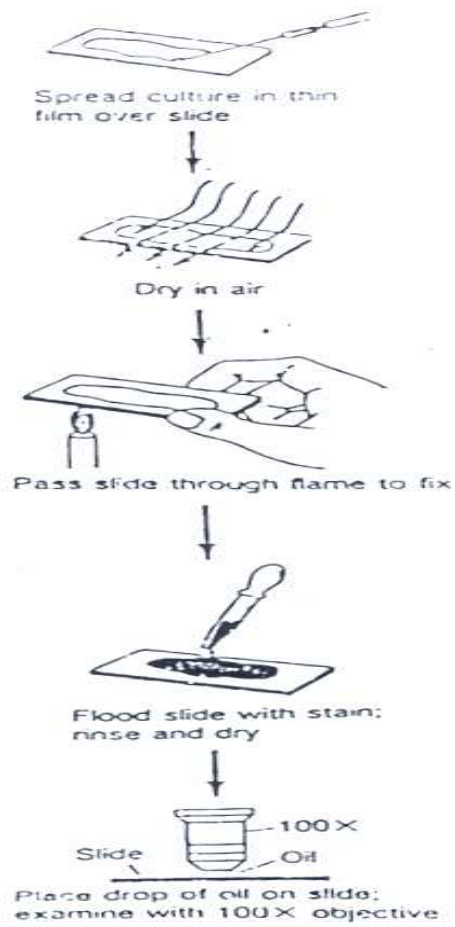
4) Dari medium padat: mikroorganisme yang diambil dari medium padat menghasilkan pertumbuhan yang tebal dan rapat, tidak dapat langsung dipindahkan ke atas kaca objek. Pemandahan sel dari kultur dilakukan dengan menggunakan jarum inokulasi steril. Hanya ujung jarum yang menyentuh kultur, untuk mencegah pemandahan sel terlalu banyak.

Pengenceran dilakukan dengan memutar ujung jarum di atas tetesan air, sampai kelihatan

semitransparan. Sebelum proses selanjutnya , apusan dibiarkan kering. Jangan ditiup, biarkan kering di udara.

Fiksasi panas: tanpa difiksasi, apusan bakteri akan tercuci selama memasuki prosedur pewarnaan. Fiksasi panas dibutuhkan selama protein bakteri mengalami koagulasi dan melekat di atas permukaan kaca objek. Fiksasi panas dilakukan dengan melakukan secara cepat apusan kering, sebanyak dua atau tiga kali di atas lidah api bunsen.

### **Gambar 7.1** Prosedur pembuatan apusan bakteri



Gambar 7.2 Teknik dasar pewarnaan sel bakteri untuk pengamatan mikroskopik

ensial diantaranya:

#### 1). Agar Garam Mannitol

Mengandung konsentrasi garam tinggi (7,5% NaCl), yang dapat menghambat pertumbuhan kebanyakan bakteri, kecuali staphylococcus. Media ini juga mengadakan fungsi differensial karena mengandung karbohidrat mannitol, dimana beberapa staphylococcus dapat melakukan fermentasi, phenol red (pH indikator) digunakan untuk mendeteksi adanya asam hasil fermentasi manitol. staphylococcus ini memperlihatkan suatu zona berwarna kuning di sekeliling pertumbuhannya, staphylococcus yang tidak melakukan fermentasi tidak akan menghasilkan perubahan warna.

#### 2). Agar Darah

Darah dimasukkan ke dalam medium untuk memperkaya unsur dalam penanaman mikroorganisme pilihan seperti Streptococcus sp. Darah juga akan memperlihatkan sifat hemolysis yang dimiliki streptococcus:

- a). gamma hemolysis: tidak terjadi lysis sel darah merah, tidak adanya perubahan medium di sekitar koloni
- b). alpha hemolysis: terjadi lysis sel darah merah dengan reduksi hemoglobin menjadi methemoglobin menghasilkan lingkaran kehijauan sekitar pertumbuhan bakteri
- c). beta hemolysis: terjadi lysis sel darah merah dilengkapi kerusakan dan penggunaan hemoglobin oleh organisme, menghasilkan zona bening sekeliling koloni.

#### 3). Agar McConkey

Menghambat pengaruh kristal violet terhadap pertumbuhan bakteri gram-positif, selanjutnya bakteri gram-negatif dapat diisolasi. Media dilengkapi dengan karbohidrat (laktosa), garam empedu, dan neutral red sebagai pH indikator yang mampu membedakan bakteri enterik sebagai dasar kemampuannya untuk memfermentasi laktosa. Pada dasarnya bakteri enterik dipisahkan ke dalam dua kelompok:

- a). Coliform basil menghasilkan asam dari fermentasi laktosa. Bakteri memperlihatkan warna merah pada permukaannya. E. coli menghasilkan kuantitas asam lebih banyak dibandingkan spesies coliform yang lain. Jika ini terjadi medium di sekitar pertumbuhan juga akan berubah menjadi merah seharusnya pengaruh asam terjadi pengendapan garam empedu yang diikuti penyerapan neutral red.
- b). Disentri, tifoid, dan paratifoid basill tidak memfermentasi laktosa, maka tidak menghasilkan asam. Koloni kelihatan tidak berwarna dan seringkali transparan

#### 4). Agar Eosin-Methylene Blue (EMB agar)

Laktosa dan zat pewarna eosin serta metilen biru mampu membedakan antara enterik fermenter laktosa dengan nonfermenter sebagai identifikasi terhadap basilus colon *Escherichia coli*. Koloni *E. coli* tersebut kelihatan biru kehitaman dengan kilat hijau logam/metalik yang disebabkan besarnya kuantitas asam yang dihasilkan dan pengendapan zat pewarna di atas permukaan pertumbuhan. Bakteri coliform lain seperti *Enterobacter aerogenes* terbentuk tebal, mukoid, koloni berwarna pink di atas medium ini. Bakteri enterik nonfermenter laktosa membentuk koloni tidak berwarna maka kelihatan transparan, kelihatan di atas medium yang berwarna ungu (merah lembayung). Medium ini juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram-positif, sedangkan bakteri gram-negatif tumbuh lebih baik.

#### 5). Agar DarahTelurit

Untuk mengisolasi *Corynebacterium* digunakan agar darah telurit (McLeod), sebagai media selektif, setelah inkubasi selama 24 jam koloni bakteri terlihat berwarna abu-abu tua-hitam. Selanjutnya untuk biakan murni *Corynebacterium* digunakan media perbenihan Loeffler dalam tabung.

#### 6). Agar Tioglikolat/Tarrozi (Perbenihan Anaerob)

Perbenihan tioglikolat, mengandung asam tioglikolat yang dapat mengikat oksigen sehingga tercapai suasana anaerob dalam perbenihan. Perbenihan Tarrozi, kaya akan enzim peroksidase sehingga zat toksik ( $H_2O_2$ ) yang dihasilkan *Clostridium tetani* berubah menjadi tidak toksik ( $H_2O$  dan  $O_2$ ) dan kuman dapat tumbuh terus dalam perbenihan.

#### 7). Agar TCBS dan Agar Monsur

Agar TCBS (thiosulfat citrat bile sucrose), Agar Monsur (mengandung telurit gelatin agar atau agar bulyon alkalis yang mengandung Na-tourokholat), digunakan untuk mengisolasi genus *Vibrio*. Setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}C$  di atas media berwarna hijau kehitaman koloni akan terlihat bundar berwarna kuning muda, translucent dan permukaannya rata.

#### 8). Agar Coklat atau Thayer-Martin

Media agar coklat (Thayer-Martin) merupakan media terpilih untuk genus *Neisseria*. Untuk pertumbuhannya diperlukan suasana anaerob (fakultatif) dengan sedikit gas  $CO_2$  dan tidak boleh kekeringan, sehingga pembiakan yang cocok digunakan dalam eksikator yang diberi kapas basah pada bagian bawah petri yang berisi biakan.

#### 9). Media Agar Lowenstein-Jensen

Media padat tersebut banyak digunakan untuk perbenihan genus *Mycobacterium*, bakteri ini dapat tumbuh walaupun dalam waktu relatif lama, kecuali jenis atipik golongan “rapid growers” dapat tumbuh dalam 3-7 hari.

#### e. Aktivitas Biokimia Mikroorganisme

Mikroorganisme dapat dipisahkan dan diidentifikasi karena berbagai alasan yaitu:

Determinasi patogen yang bertanggung jawab terhadap penyakit menular

Seleksi dan isolasi strain mikroorganisme fermentatif penting untuk industri penghasil alkohol, pelarut, vitamin, asam organik, antibiotik, dan industri enzim.

Isolasi dan perkembangan strain mikrobial yang cocok untuk pabrik dan peningkatan kualitas dan rasa dalam bahan-bahan makanan tertentu seperti yogurt, keju, produk susu.

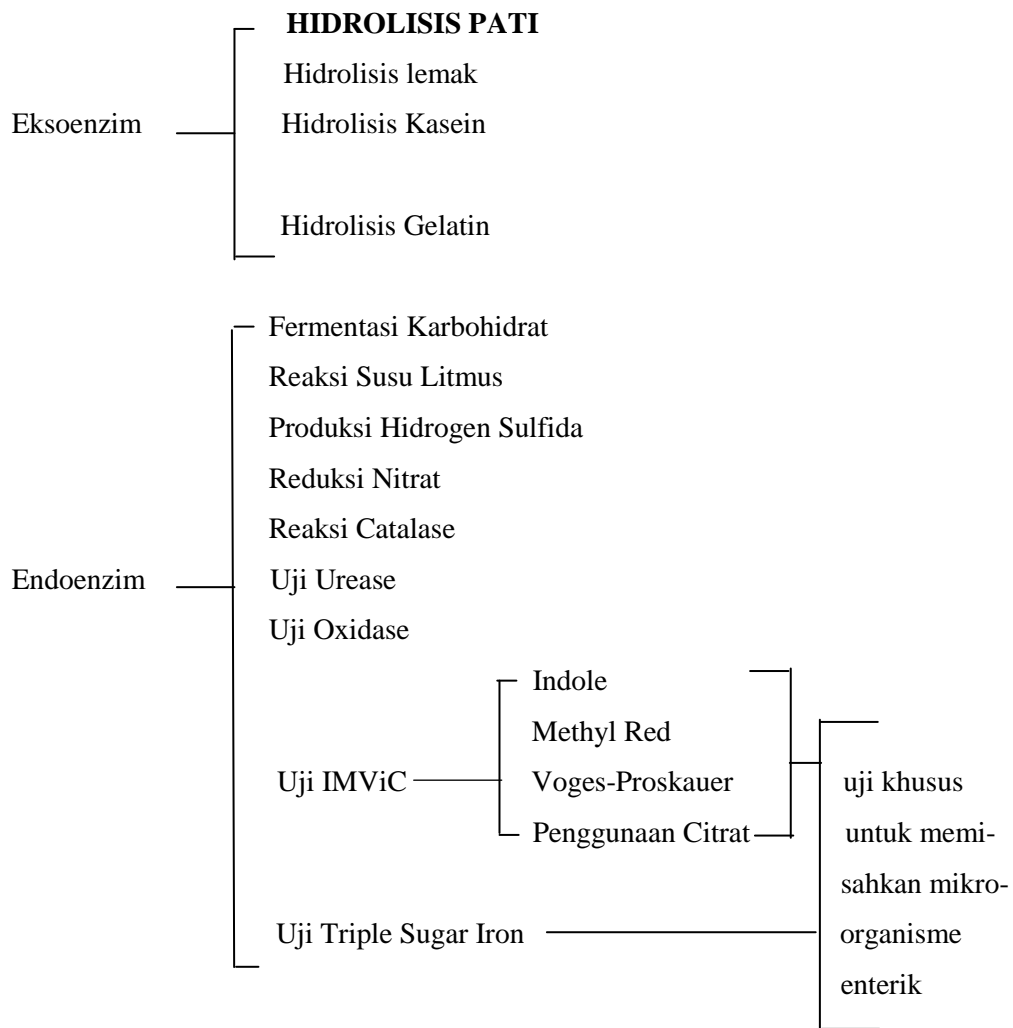
Membandingkan aktifitas biokimia untuk kepentingan taxonomi.

Untuk mengerjakan tugas tersebut, ahli mikrobiologi dibantu oleh data tersebut, seperti manusia memiliki suatu karakteristik dan seperangkat sidik jari yang khas, mikroorganisme memiliki sifat tersebut untuk mengidentifikasi karakteristik biokimianya. Hal tersebut dinamakan “sidikjari” biokimia yang dikendalikan oleh aktifitas enzimatis sel, dan kemampuan untuk menanggapi bioenergetik, biosintesis, dan biodegradasi.

Jumlah total semua reaksi kimia tersebut ditetapkan sebagai metabolisme sel, dan transformasi biokimia yang terjadi diluar dan dalam sel serta dibangun oleh catalis biologis yang disebut enzim.

Eksoenzim. Mempengaruhi substrat di luar sel. Terutama substrat yang mempunyai berat molekul besar tidak dapat melewati membran sel, oleh karena itu material kasar – bahan makanan berupa polisakarida, lemak, dan protein, harus dipecah menjadi bahan-nutrisi dengan berat molekul lebih rendah sebelum dapat diangkut ke dalam sel. Karena melibatkan reaksi, eksoenzim sebagian besar berperan sebagai enzim hidrolitik untuk mereduksi bahan yang memiliki berat molekul besar ke dalam kompleks yang dibangunnya dengan memasukkan air ke dalam molekul. Molekul-molekul kecil yang terlepas kemudian diangkut ke dalam sel dan diassimilasi (dicerna).

Endoenzim. Berfungsi di dalam sel, terutama bertanggung jawab untuk sintesis protoplasma baru yang dibutuhkan dan menghasilkan energi seluler dari bahan-bahan yang diasimilasi. Kemampuan sel untuk menyerap substrat nutrisi melalui membran sel, menunjukkan adanya beberapa kemampuan endoenzim dalam mengubah substrat kimia spesifik menjadi bahan-bahan esensial.



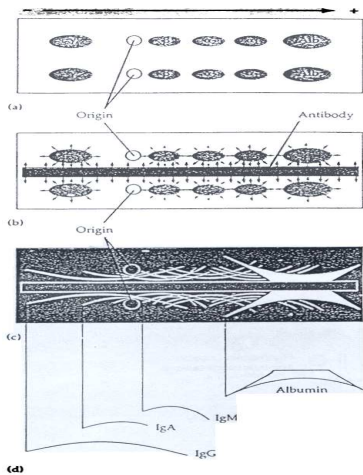
**Gambar 7.5 Uji Aktivitas Biokimia Mikroorganisme**

Pengubahan tersebut penting untuk fungsi dan pertahanan sel, dan sebagai dasar metabolisme seluler. Akibat proses-proses metabolisme tersebut produk metabolik dibentuk dan diekskresikan oleh sel ke lingkungan. Pengujian produk akhir tersebut tidak hanya membantu dalam identifikasi sistem enzim spesifik, tetapi juga untuk mengidentifikasi, memisahkan, dan mengklasifikasi mikroorganisme. Berikut ini sebuah skema sederhana tentang prosedur percobaan untuk mempelajari aktivitas eksoenzim dan endoenzim pada mikroorganisme

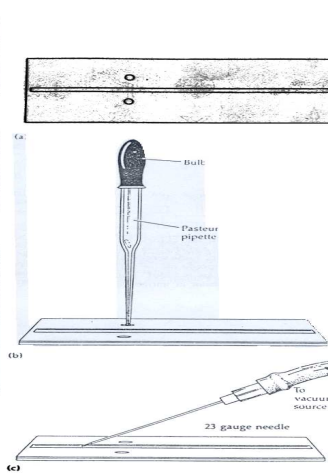
f. Pengujian Kultur Untuk Sensitivitas Antibiotik

Kultur mikroba yang diisolasi dari pasien sakit penting untuk menegaskan diagnosis dan untuk membantu keputusan terhadap terapi. Determinasi sensitivitas isolat mikroba terhadap zat antimikroba merupakan satu hal terpenting dalam tugas ahli mikrobiologi klinis.

Prosedur yang dianjurkan dinamakan Metoda Kirby-Bauer. Sensitivitas kultur sangat mudah ditentukan dengan metoda difusi agar. Sebuah lempeng medium kultur diinokulasi dengan cara penyebaran kultur pada permukaan agar. Potongan kertas saring bentuk bundar yang mengandung zat antimikroba yang berbeda dengan konsentrasi sudah diketahui, ditempatkan di atas permukaan agar. Perbedaan konsentrasi zat antimikroba dibuat khusus sehingga ukuran zona hambat yang dihasilkan sekitar potongan kertas menunjukkan sensitifitas atau resisten. Sesudah inkubasi adanya zona hambat sekeliling potongan kertas saring dengan zat yang berbeda dicatat.

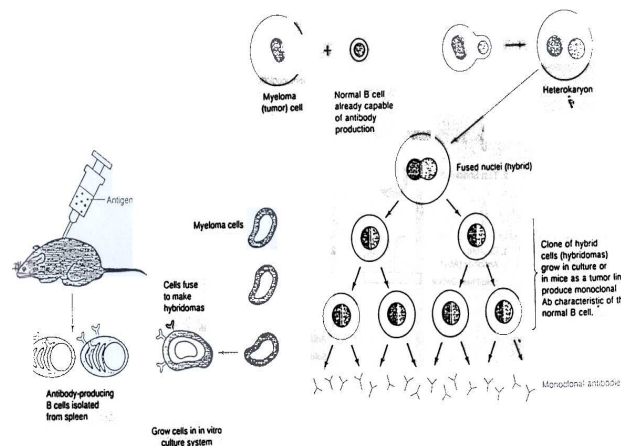


Gambar 7.6 Uji immunoelektroforesis objek



Gambar 7.7 Uji immunoelektroforesis pada gelas objek

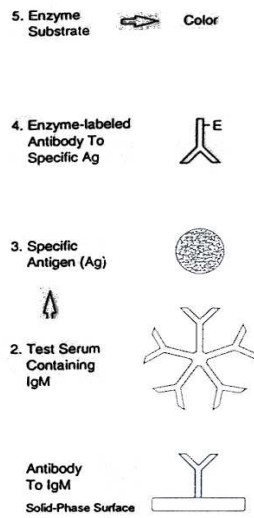
Prosedur lain untuk uji sensitivitas antibiotik adalah uji pengenceran antibiotik. Satu deret pengenceran berlipat dua setiap antibiotik dibuat dalam tabung atau mangkuk-mangkuk (well) pada pelat microtiter. Selanjutnya diinokulasi dengan organisme uji yang sama. Sesudah inkubasi, hambatan pertumbuhan bermacam antibiotik dapat diamati. Sensitivitas dapat diperlihatkan dalam pengenceran tertinggi yang disertai hambatan pertumbuhan.



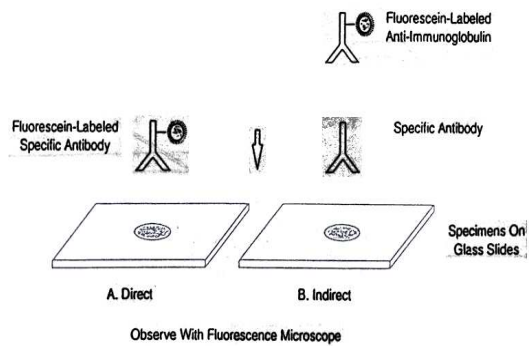


Gambar 7.8 Prinsip dasar pembentukan antibody monoklonal

Gambar 7.9 Produksi antibody monoklonal



Gambar 7.10 Uji antigen-antibodi



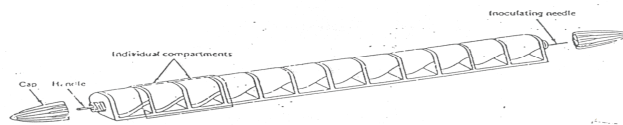
Gambar 7.11 Prosedur uji immunofluoresensi

**i. Identifikasi Mikroorganisme Enterik Dengan Computer Dibantu Microsystem Multitest**

1) Enterotube Multitest System dan Encise II

Merupakan sederet tabung terdiri dari 12 bagian dan masing-masing ujungnya dilengkapi jarum inokulasi. Jarum ini dapat menyentuh satu koloni tunggal yang diisolasi dan selanjutnya dalam sekali tarikan dapat melewati seluruh (12) bagian, dengan cara demikian semua media uji terinokulasi. Dengan cara tersebut, 15 uji biokimia standar, dilakukan dalam sekali prosedur penginokulasian. Selanjutnya diinkubasi, perubahan warna yang terjadi pada setiap bagian tabung ditafsirkan sesuai dengan instruksi yang dibuat pabrik untuk mengidentifikasi organisme. Metode ini telah dilaksanakan sedemikian rupa untuk identifikasi bakteri enterik dengan menggunakan sistem computer yang dinamakan ENCISE (*Enterobacteriaceae numerical coding and identification system for enterotube.*).

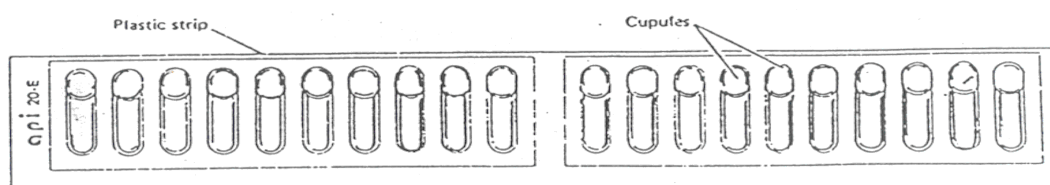
yang dinamakan ENCISE (*Enterobacteriaceae numerical coding and identification system for enterotube.*).



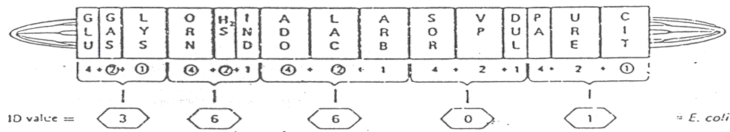
**Gambar 7.12 Sistem multites enterotube**

2) API (Analytical Profile Index) SYSTEM.

API-20E menggunakan sebuah strip plastik dengan susunan 20 mikrotabung, masing-masing berisi suatu medium kering, dan sebuah *cupule* di atasnya. Media menjadi berair selama penginokulasian suspensi organisme yang diuji, selanjutnya strip diinkubasi, plastik ditutup baki untuk mencegah evaporasi. Sesudah inkubasi, identifikasi organisme dibuat dengan menggunakan peta yang berbeda, yang diberi oleh pabrik, dengan menggunakan sistem computer yang dinamakan PRS (*profile recognition system*). Yang mencakup sebuah API coder, profile register dan selector.

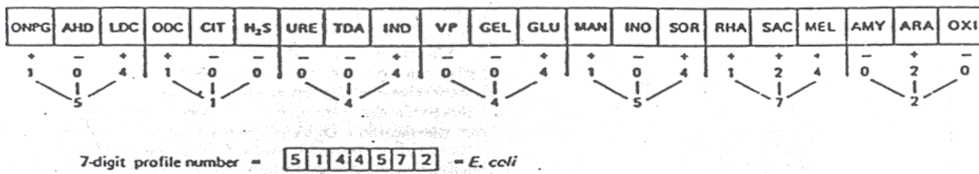


**Gambar 7.13 Sistem API-20E**



a. enterotube

(b) The API strip



b. API strip

**Gambar 7.18 Teknik bantuan komputer dalam identifikasi Enterobacteriaceae**

a

**PERTANYAAN DAN TUGAS**

1. Jelaskan metode identifikasi berdasarkan:
  - a. morfologi sel
  - b. uji aktivitas biokimia
  - c. analisis DNA
  - d. uji serologis
2. Jelaskan dasar-dasar klasifikasi bakteri ?
3. Sebutkan macam-macam klasifikasi ?
4. Jelaskan dasar pengelompokkan bakteri, sehingga dikelompokkan menjadi 4 kelompok besar !
5. Jelaskan prosedur pewarnaan:
  - a. negatif
  - b. endospora
  - c. gram

**ISTILAH PENTING**

- biovar
- strain
- fenotipik

- uji serologis
- taksonomi numeris
- taksonomi genetik
- actinomycetes
- Mycoplasma
- Archaeobacteria