

BAB 7

KLASIFIKASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI

A. DASAR-DASAR KLASIFIKASI

1. Sifat Umum

Bakteri merupakan organisme bersel-tunggal yang bereproduksi dengan cara sederhana, yaitu dengan pembelahan biner. Sebagian besar hidup bebas dan mengandung informasi genetik dan memiliki sistem biosintetik dan penghasil – energi yang penting untuk pertumbuhan dan reproduksinya. Sejumlah bakteri, bersifat parasit intraseluler obligat contohnya *Chlamydiae* dan *Rickettsiae*.

Dalam beberapa hal bakteri berbeda dari eukariot. Bakteri tidak memiliki ribosom 80S maupun organel bermembran, seperti nukleus, mitokondria, lisosom, retikulum endoplasma maupun badan golgi, bakteri tidak memiliki flagela fibril 9+2 atau struktur silia seperti pada sel eukariot. Bakteri memiliki ribosom 70S dan kromosom sirkuler tunggal (nukleoid) tanpa sampul yang disusun oleh asam deoksiribonukleat untai-ganda (DNA) yang bereplikasi secara amitosis. Jika terjadi pergerakan sering disebabkan adanya struktur flagela filamen-tunggal. Sejumlah bakteri memiliki mikrofibril eksternal (pili atau fimbria) yang berfungsi untuk menempel. *Mycoplasma* tidak memiliki dinding sel, sedangkan eubakteria lainnya menghasilkan struktur sampul dengan susunan senyawa kimianya mirip peptidoglikan dinding sel. Eubakteria yang berdinding sel dan archaebakteria dapat berbentuk kokus (bola), basil (batang), batang melengkung atau spiral. Struktur kimia sampul eubakteria sering digunakan untuk membedakannya ke dalam kelompok bakteri Gram-positif, Gram-negatif, dan “acid-fast” (tahan-asam).

2. Konsep Spesies

Spesies bakteri didefinisikan secara deskriptif (fenotipik). Setiap macam bakteri dianggap sebagai suatu spesies, yang dibentuk dari kumpulan strain yang memberikan beberapa gambaran sangat berbeda dari strain lain. Suatu strain merupakan merupakan progeni atau subkultur dari isolat koloni tunggal dalam kultur murni. Spesies bakteri didefinisikan melalui (1) sifat struktural dari bentuk, ukuran, cara pergerakan, tahap istirahat, reaksi pewarnaan Gram, dan pertumbuhan secara

makroskopik, (2) sifat nutrisi dan biokimia, produk akhir dan informasi biokimia lain pada metabolit dan komponen seluler, (3) sifat fisiologi relatif terhadap oksigen, temperatur, pH, dan respon terhadap zat antibakteri, (4) sifat ekologi dan (5) komposisi basa DNA, homologi, dan sifat genetik.

3. Konsep Biovar (Biotipe Spesies/Strain)

Kumpulan spesies bakteri terdiri dari strain-strain yang saling berhubungan tetapi berbeda organisme, kadang-kadang disebut sebagai “cluster”. Dalam setiap kumpulan spesies atau “cluster”, suatu strain dipilih secara acak untuk menjadi wakil terbaik dari spesies tersebut. Strain ini disebut biotipe (atau biovar) dari spesies, dan sesudah itu sifatnya digunakan untuk menggambarkan spesies tersebut. Strain biotipe digunakan sebagai “strain referensi”, tersedia pada koleksi kultur seperti “The American Type Culture Collection” (ATCC), Rockville, Maryland, USA.

Strain biotipe tidak memperlihatkan semua sifat strain dalam kumpulan spesies. Oleh karena itu, penandaan subspecies, seperti serotipe (serovar), patotipe (patovar), morfotipe (morfovar), atau tipe faga (fagovar) kadang-kadang digunakan untuk menunjukkan sifat tertentu dari variasi strain.

Pada bakteri, tidak adanya kriteria gabungan definitif untuk penandaan spesies dapat difahami akibat variasi pada tingkat dimana kelompok dipisahkan, bergantung pada gambaran peneliti, sebagai kolektor dan pemisah. Menurut kategori pemisah yang menandai setiap serotipe (serovar) *Salmonella* sebagai suatu spesies dengan nama yang dimilikinya. Di pihak lain, pengumpul menandai serotipe individu sebagai jumlah tipe dalam spesies tunggal, contohnya, *Klebsiella* atau *Streptococcus*.

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 fiksasi panas serta selama proses pewarnaan mengakibatkan beberapa perubahan. Suatu teknik pengamatan mikroskop yang baik adalah dengan membuat sediaan tetesan gantung, karena bakteri yang diamati dalam keadaan utuh.

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 genus *Mycobacterium*.
- b). Untuk melihat struktur digunakan pewarnaan flagela, 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 mikrobiologi 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 kertas saring 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 biakan kaldu cair atau medium biakan kaldu agar dengan berbagai cara.
- 3) Dari biakan kaldu cair, pengambilan satu atau dua loop biakan sel dapat langsung dipindahkan ke kaca objek dengan loop inokulasi steril dan sebarkan secara merata kira-kira sebesar uang logam (kurang lebih ϕ 1 – 2 cm).
- 4) Dari medium kaldu agar: mikroorganisme yang diambil dari medium padat menghasilkan pertumbuhan yang tebal dan rapat, tidak dapat langsung dipindahkan ke atas kaca objek. Pemandahan sel dari biakan dilakukan dengan menggunakan jarum inokulasi steril. Hanya ujung jarum yang menyentuh biakan, 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.

Proses pembuatan apusan bakteri biasanya dengan menggunakan 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 atau lampu spirtus.

c. Karakteristik Biakan Mikroorganisme

Ketika dibiakan pada berbagai medium, mikroorganisme akan memperlihatkan perbedaan pertumbuhannya secara makroskopik. Perbedaan tersebut dinamakan karakteristik biakan (cultural), yang digunakan sebagai dasar pemisahan mikroorganisme ke dalam kelompok taksonomi. Karakteristik biakan untuk semua bakteri yang sudah diketahui terdapat dalam "*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*". Semua diidentifikasi berdasarkan pembiakan bakteri dalam kaldu agar miring dan lempeng agar, kaldu nutrisi cair dan nutrisi gelatin. Pola pertumbuhan pada setiap medium tersebut digambarkan dan menunjukkan pola pertumbuhan yang khas.

1). Kaldu Agar Miring

Merupakan satu garis goresan inokulasi pada permukaan agar miring, hasilnya dievaluasi dengan cara melihat:

- banyaknya pertumbuhan: jumlah koloni yang tumbuh
- pigmentasi koloni
- konsistensi
- bentuk koloni

2). Kaldu Lempeng Agar

Memperlihatkan pertumbuhan koloni isolat, dievaluasi dengan cara melihat:

- ukuran
- pigmentasi
- bentuk: belat, tak beraturan, serupa akar dll.
- tepi koloni: rata, bergerigi, berlekuk, serupa benang dll.
- ketinggian permukaan: rata, cembung, dll.

3). Biakan dalam Kaldu Nutrisi

Memperlihatkan distribusi pertumbuhan, dievaluasi dengan melihat medium:

- seragam sedikit keruh
- mengendap
- bergerombol
- menggumpal

4). Nutrisi Gelatin

Medium padat ini dapat berubah menjadi cair akibat pengaruh enzim gelatinase, Pencairan terjadi dalam berbagai pola:

- “Crateriform “
- “Napiform”
- “Infundibuliform”
- “Saccate”
- “Stratiform”

d. Media Selektif dan Differensial

Media selektif digunakan untuk mengisolasi kelompok khusus bakteri. Media ini dilengkapi bahan kimia untuk menghambat pertumbuhan satu tipe bakteri dan menyebabkan pertumbuhan yang lainnya, sehingga memberi kemudahan untuk mengisolasi bakteri yang diinginkan

Media differensial digunakan untuk membedakan kelompok mikroorganisme dari sifat morfologi dan biokimianya. Media ini dilengkapi campuran bahan kimia, setelah inokulasi dan inkubasi, menghasilkan perubahan karakteristik pada penampakan pertumbuhan bakteri dan atau pada medium sekitar koloni, yang menyebabkan perbedaan.

Yang termasuk ke dalam media selektif dan differensial 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 pembiakan mikroorganisme terpilih seperti *Streptococcus* sp. Darah juga akan memperlihatkan sifat hemolysis yang dimiliki *Streptococcus*.

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

3). “Agar McConkey”

Menghambat pengaruh kristal ungu terhadap pertumbuhan bakteri Gram-positif, selanjutnya bakteri Gram-negatif dapat diisolasi. Medium 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. *Escherichia 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 pewarna “neutral red”.
- b). Disentri, tifoid, dan paratifoid batang 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 yang memfermentasi laktosa dengan nonfermenter sebaik 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 ping 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 Darah Telurit

Untuk mengisolasi *Corynebacterium* digunakan agar darah telurit (McLeod), sebagai medium 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 kaldu agar alkalis yang mengandung Na-tourokolat), digunakan untuk mengisolasi genus *Vibrio*. Setelah diinkubasi selama 24 jam pada temperatur $37^\circ C$ di atas media berwarna hijau kehitaman koloni akan terlihat bundar berwarna kuning muda, "translucent" dan permukaannya rata.

8). Agar Coklat atau Thayer-Martin

Medium 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). Medium Agar Lowenstein-Jensen

Medium agar 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:

- 1) Determinasi patogen yang bertanggung jawab terhadap penyakit menular
- 2) Seleksi dan isolasi strain mikroorganisme fermentatif penting untuk industri penghasil alkohol, pelarut, vitamin, asam organik, antibiotik, dan industri enzim.
- 3) Isolasi dan perkembangan strain mikroorganisme yang cocok untuk pabrik dan peningkatan kualitas dan rasa dalam bahan-bahan makanan tertentu seperti yogurt, keju, produk susu.
- 4) Membandingkan aktifitas biokimia untuk kepentingan taxonomi.

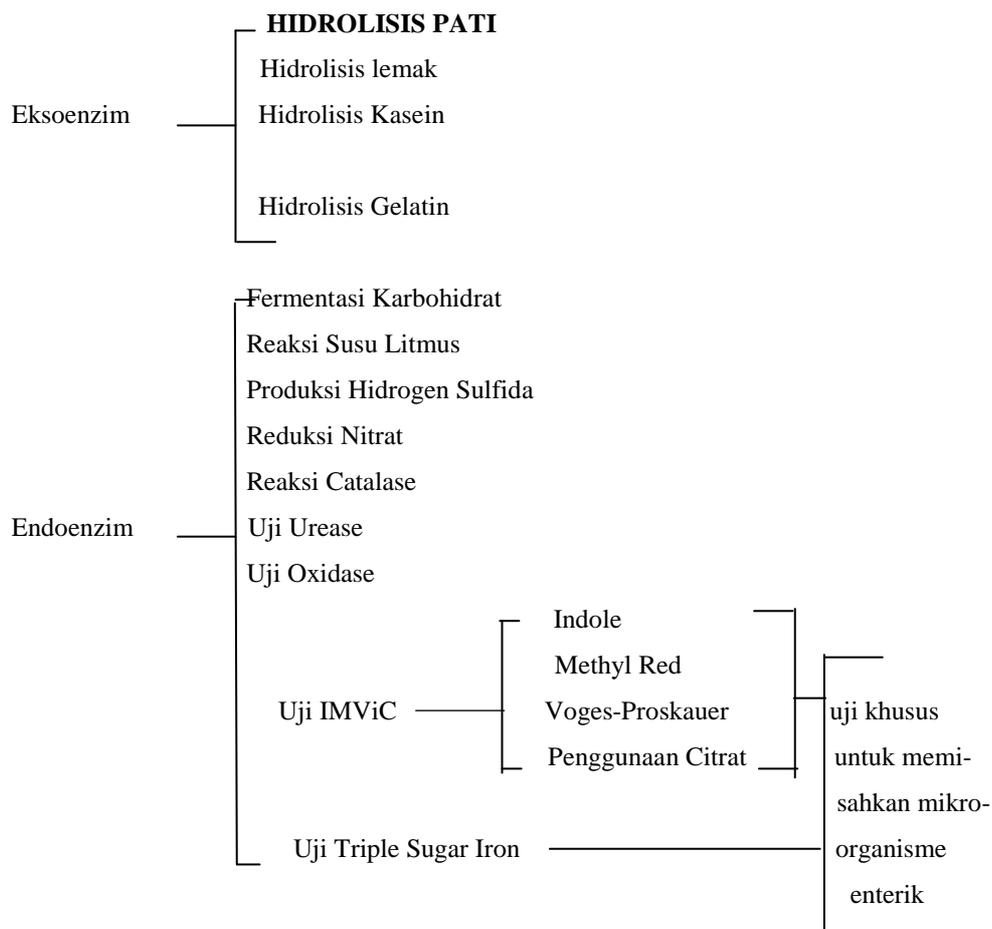
Untuk melakukan kegiatan identifikasi tersebut, para ahli mikrobiologi dibantu oleh data tersebut, seperti halnya manusia memiliki suatu karakteristik dan seperangkat sidik jari yang khas. Mikroorganisme memiliki sifat tersebut untuk mengidentifikasi karakteristik biokimianya. Hal tersebut dinamakan “sidikjari” biokimia yang dikendalikan oleh aktivitas enzimatik 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 katalis biologi yang disebut enzim. Hampir semua aktivitas biokimia dalam sel mikroorganisme melibatkan peran katalis biologi enzim, terutama dalam reaksi-reaksi reduksi dan oksidasi, hidrolisis, transfer energi dll.

Salah satu jenis enzim yang berperan dalam metabolisme sel adalah eksoenzim. Enzim ini bekerja pada substrat di luar sel. Terutama substrat yang

mempunyai berat molekul besar tidak dapat melewati membran sel, oleh karena itu molekul kompleks berupa polisakarida, lemak, dan protein, harus dipecah menjadi bahan 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).

Jenis enzim lain adalah endoenzim. Enzim ini 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
(Sumber : Cappucino:1987)

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 Biakan Untuk Sensitivitas Antibiotika

Biakan mikroorganisme yang diisolasi dari berbagai sumber seperti dari pasien sakit, sangat penting untuk diagnosis dan untuk membantu keputusan terhadap terapi. Determinasi sensitivitas isolat mikroorganisme terhadap zat antimikroba merupakan satu hal terpenting dalam tugas ahli mikrobiologi klinis.

Prosedur yang dianjurkan dinamakan Metode “Kirby-Bauer”. Sensitivitas biakan sangat mudah ditentukan dengan metoda difusi agar. Sebuah medium lempeng agar diinokulasi dengan cara penyebaran biakan 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 sensitivitas atau resisten. Sesudah inkubasi adanya zona hambat sekeliling potongan kertas saring dengan zat yang berbeda dicatat.

Gambar 7.6 Uji immunoelektroforesis pada

objek

Gambar 7.7 Uji immunoelektroforesis

pada gelas objek

Prosedur lain untuk uji sensitivitas antibiotika adalah uji pengenceran antibiotika. Satu deret pengenceran ganda setiap antibiotika dibuat dalam tabung atau sumur/lubang pada pelat mikrotiter. Selanjutnya diinokulasi dengan organisme uji

yang sama. Sesudah inkubasi, hambatan pertumbuhan bermacam antibiotika 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

g. Plasmid Fingerprinting

Dengan berkembangnya teknologi asam nukleat, saat ini dalam laboratorium dapat digunakan DNA klinis sebagai alat diagnostik untuk mengidentifikasi bakteri

patogen yang belum diketahui identitasnya.

Plasmid fingerprinting termasuk karakterisasi plasmid yang dibutuhkan dari sel bakteri patogen yang dicurigai. Sebagian besar bakteri mengandung satu plasmid atau lebih dan banyak dalam tipe bakteri enterik. Setiap plasmid merupakan ikatan kovalen lingkaran DNA dan memiliki karakteristik berat molekul. Plasmid yang berbeda ukuran dapat dipisahkan dengan cara elektroforesis di atas gel agarosa. Untuk mengerjakan “plasmid fingerprint”, mula-mula sel dihancurkan dan DNA plasmid dipisahkan dari DNA kromosom melalui suatu prosedur ekstraksi spesifik. DNA merupakan bahan pokok untuk elektroforesis di atas gel agarosa, kemudian gel diwarnai dengan etidium bromida untuk visualisasi DNA. Jarak perpindahan DNA plasmid pada gel berbanding terbalik dengan berat molekul. Plasmid yang berukuran kecil berpindah lebih cepat dibanding plasmid besar. Posisi dan jumlah pita plasmid pada gel (plasmid “fingerprint”) adalah karakteristik yang diberikan suatu spesies, adanya jumlah plasmid terbesar, menjadikan spesies paling mudah dibedakan.

h. Epidemiologi (Tipe Faga dan Serotipe)

Seorang ahli epidemiologi sering menemukan bakteriofaga dan tipe serologi dalam menelusuri sumber wabah penyakit yang disebabkan oleh bakteri tertentu. Pendekatan tersebut termasuk penentuan pola tipe bakteriofaga (fagovar) strain spesifik dari *S. aureus* yang dapat menyebabkan epidemik di ruangan rumah sakit dan memperlihatkan reaksi lisis hanya terhadap bakteriofaga tertentu. Penentuan serotipe juga sering digunakan untuk menelusuri serovar sebagai sumber wabah keracunan makanan oleh *Salmonella*.

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 komputer 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 komputer yang dinamakan PRS (*profile recognition system*). Yang mencakup sebuah API coder, profile register dan selector.

Gambar 7.13 Sistem API-20E

b. API strip

Gambar 7.18 Teknik bantuan komputer dalam identifikasi Enterobacteriaceae

C. KELOMPOK BAKTERI

Empat kelompok utama bakteri (berdasarkan fenotipik) menurut Bergey's Manual determinative of Bacteriology digambarkan secara singkat, dilanjutkan dengan daftar sifat-sifat yang sering digunakan untuk membedakan beberapa dari kelompok tersebut.

Kelompok I. Eubakteria Gram-negatif Yang Memiliki Dinding Sel

Kelompok ini merupakan prokariot yang memiliki suatu profil dinding sel (tipe Gram-negatif) kompleks yang terdiri dari satu membran luar dan satu membran dalam, lapisan peptidoglikan yang tipis (yang mengandung asam muramat yang terdapat pada semua peptidoglikan tapi sejumlah organisme tidak memiliki bagian ini pada dinding selnya). Dan suatu variabel pelengkap dari komponen lain di luar atau di antara lapisan ini. Kelompok ini biasanya bersifat Gram-negatif. Bentuk sel berupa bola, oval, batang lurus atau melengkung, memutar, atau filamen; beberapa bentuk tersebut dapat berselubung atau berkapsul. Reproduksi dengan cara pembelahan biner tetapi beberapa kelompok terlihat membentuk tunas, dan suatu kelompok jarang memperlihatkan pembelahan multipel. Fruiting body (kumpulan sel dan lendir) dan miksospora dapat dibentuk oleh Miksobacteria. Gerakan berenang, meluncur, dan gerak tanpa berpindah tempat biasanya teramati. Anggota divisi mungkin bakteri fototropik atau nonfototrof (di antara litotropik dan heterotropik), dan termasuk aerobik, fakultatif anaerobik, dan spesies mikroaerofilik; beberapa anggota merupakan parasit intraseluler obligat.

Kelompok II. Eubakteria Gram-positif yang Memiliki Dinding Sel

Kelompok ini merupakan prokariot dengan profil dinding sel tipe Gram-

positif; umumnya berreaksi terhadap pewarnaan Gram, tetapi tidak selalu positif. Sel berbentuk bola, batang, atau filamen; batang dan filamen mungkin tidak bercabang, tetapi beberapa memperlihatkan adanya percabangan. Reproduksi seluler umumnya dengan pembelahan biner; beberapa menghasilkan spora sebagai bentuk istirahat (endospora atau spora pada hifa). Kelompok ini umumnya tidak berfotosintesis, melakukan kemosintesis, heterotrof dan termasuk aerobik, anaerobik, fakultatif anaerobik, dan spesies mikroaerofilik. Anggota divisi ini termasuk bakteri asporogenous sederhana dan bakteri sporogenous, juga actinomycetes dan yang berhubungan.

Kelompok III. Eubakteria Tanpa Dinding Sel

Kelompok ini merupakan prokariot yang tidak memiliki dinding sel (biasa disebut *Mycoplasma* dan termasuk kelas Mollicutes) dan tidak mensintesis bahan baku (prekursor) peptidoglikan. Sel dilindungi oleh suatu unit membran, membran plasma. Sel sangat pleomorfik, dengan ukuran mulai dari yang besar, mampu merusak vesikula sampai ke yang sangat kecil (0.2 μ m), elemen yang dapat tersaring. Bentuk filamen biasa ditemukan dengan penonjolan-penonjolan percabangan. Reproduksi dapat dengan pertunasan, fragmentasi, dan/atau pembelahan biner. Beberapa kelompok memperlihatkan suatu derajat keteraturan bentuk yang semestinya terhadap penempatan struktur internal.. Biasanya tidak bergerak, tetapi beberapa spesies memperlihatkan suatu pergerakan meluncur. Bentuk istirahat tidak diketahui. Sel berwarna Gram-negatif. Sebagian besar membutuhkan media yang kompleks untuk pertumbuhannya (tekanan-osmotik-tinggi yang mengelilinginya) dan memelihara diri dengan menembus permukaan media padat dengan cara membentuk sifat khusus koloni berupa “Fried egg” (telur goreng mata sapi). Organisme terlihat dengan mata telanjang, bentuk-L dapat dihasilkan oleh beberapa spesies bakteri (khususnya eubakteria Gram-positif), tetapi perbedaannya pada mycoplasma tidak mampu membuat dinding sel. Sebagian besar spesies selanjutnya dibedakan oleh kebutuhan akan kolesterol dan asam lemak rantai-panjang untuk pertumbuhannya; kolesterol takteresterifikasi merupakan komponen khusus pada membran di antara spesies yang membutuhkan dan tidak membutuhkan sterol, jika terdapat dalam medium. Kandungan guanin dan sitosin dalam RNA ribosom adalah

43-48 mol% (lebih rendah dari yang terkandung dalam dinding eubakteria Gram-negatif dan Gram-positif, 50-54 mol%); kandungan guanin dan sitosin pada DNA juga lebih rendah, 23-46 mol%, dan ukuran genom *Mycoplasma* lebih kecil dari prokariot lain, $0.5-1.0 \times 10^9$ Dalton. *Mycoplasma* dapat bersifat saprofit, parasit, atau patogenik, dan patogen penyebab penyakit pada hewan, tumbuhan, dan kultur jaringan.

Kelompok IV. Archaeobacteria

Archaeobacteria merupakan mikroba utama dalam lingkungan terrestrial dan akuatik, hidup dalam lingkungan anaerobik, dalam kadar garam tinggi, atau air panas, dan dalam lingkungan yang terkena panas bumi; serta beberapa terdapat sebagai simbiosis saluran pencernaan hewan. Kelompok yang termasuk aerob, anaerob, dan fakultatif aerob yang tumbuh secara kemolitotrofik, organotrofik. Archaeobacteria dapat bersifat mesofil atau termofil, bahkan beberapa spesies dapat tumbuh pada suhu di atas 100 derajat.

Suatu gambaran khusus biokimia archaeobacteria yaitu adanya gliserol isoprenil ether lipid. Tidak ada murein (asam muramat terkandung dalam peptidoglikan) pada dinding sel membuat archaeobacteria tidak sensitif terhadap antibiotika beta-laktam. "Common arm" (berhubungan dengan lengan) tRNA mengandung pseudouridin atau 1-metilpseudouridin sebagai pengganti ribotimidin. Urutan rRNA 5S, 16S, dan 23S sangat berbeda dari yang ada dalam eubakteria dan eukariot.

Archaeobacteria memberikan beberapa gambaran molekuler seperti pada eukariot:

- a). Elongation Factor 2 (EF-2) mengandung asam amino diftamid dan oleh karena itu dapat terjadi ribosilasi-ADP oleh toksin difteria,
- b). Urutan asam amino protein "A" ribosom menunjukkan urutan yang bersifat homolog dengan protein eukariotik (L7/L12),
- c). Methionin yang mengawali tRNA tidak mengandung formil,
- d). Beberapa gen tRNA mengandung intron,
- e). Cabang aminoasil tRNA inisiator diakhiri dengan pasangan basa "AU",
- f). DNA-dependent RNA polimerase merupakan enzim multikomponen dan tidak

sensitif terhadap antibiotika rifampisin dan streptolidigin,
g). Seperti (-DNA polimerase pada eukariot, replikasi DNA polimerase
archaeobakteria tidak dihambat oleh aphidikolin atau butilfenil-dGTP, dan
h). Sintesis protein dihambat oleh anisomisin tetapi tidak oleh kloramfenikol.

Archaeobakteria autotrof tidak mengasimilasi CO₂ melalui siklus Calvin. Pada *Methanobacterium*, CO₂ difiksasi melalui suatu jalur asetil-CoA, tetapi *Acidianus* dan *Thermoproteus*, bersifat autotrof CO₂ difiksasi melalui jalur asam trikarboksilat reduktif. Fiksasi N₂ hanya diperlihatkan oleh beberapa methanogen.

Hasil pewarnaan Gram dapat positif atau negatif karena tipe pembungkus sel sangat berbeda. Spesies Gram-positif memiliki pseudomurein, metanokondroitin, dan heteropolisakarida dinding sel; sel Gram-negatif memiliki glikoprotein pada lapisan permukaan. Sel memiliki keragaman bentuk, termasuk berbentuk bola, spiral, pelat atau bentuk batang; unisel; multisel bentuk dalam filamen atau berupa kumpulan. Diameter sel individu 0.1- >15 µm, dan panjang filamen dapat mencapai 200 µm. Perbanyakkan melalui pembelahan biner, pertunasan, penyempitan, fragmentasi, atau mekanisme lain. Warna massa sel dapat biru, ungu, pink, oranye-coklat, kuning, hijau, hitam kehijauan, abu-abu dan putih.

Kelompok utama archeobakteria termasuk; a). archeobakteria methanogenik, b) archeobakteria pereduksi sulfat, c). archaeobakteria halofilik ekstrim, d). archaeobakteria tanpa dinding sel, dan e). termofilik ekstrim "So-metabolizer."

D. MACAM-MACAM CARA KLASIFIKASI

1. Taksonomi Numeris

Taksonomi numeris, yang juga dinamakan taksonomi komputer, didasarkan pada asas-asas yang dipublikasikan bertahun-tahun yang lalu dan baru belakangan ini diterapkan bagi taksonomi mikroba. Taksonomi numeris mensyaratkan tersedianya sejumlah besar informasi mengenai mikroorganisme yang bersangkutan, informasi sebanyak-banyaknya mengenai ciri-ciri yang tidak berkaitan. Setiap ciri diberi bobot yang sama dalam membentuk taksa. Kesamaan menyeluruh didasarkan pada proporsi ciri-ciri yang dimiliki bersama. Dalam prakteknya ahli mikrobiologi menghimpun data untuk setiap biakan.

Dengan menggunakan komputer maka data setiap biakan dibandingkan dengan data biakan yang lain. Hasil akhirnya ialah ahli mikrobiologi dapat menghitung dengan angka, derajat kesamaan setiap biakan dengan biakan yang lain. Taksa ditetapkan berdasarkan derajat kesamaan yang disetujui. Taksonomi numeris memberi dua keuntungan. Pertama, dapat dibuat objektif, prasangka (bias) taksonomiwan tidak terbawa di dalam prosedur, sehingga hasilnya (jika prosedur diterapkan dengan benar) tidak terbuka untuk dipertentangkan. Kedua, hasil penemuan satu taksonomiwan dapat diulang-ulang : taksonomiwan yang lain, yang mengikuti prosedur yang sama dengan data yang sama akan memperoleh hasil yang sama pula.

Taksonomi numeris membandingkan ciri di antara dua bakteri yang dapat mengekspresikan suatu koefisien kesamaan Jaccard (Sj), atau suatu koefisien kecocokan sederhana tunggal (SSM): pembentuk Sj, termasuk gambaran positif, sedangkan SSM, termasuk gambaran positif dan negatif. (Koefisien lain dapat digunakan untuk maksud khusus). Koefisien tersebut mengekspresikan presentase ciri yang terdapat di antara dua organisme tersebut. Penandaan kelompok dikenal sebagai fenons atau taksa (taksospesies atau taksogenus), selanjutnya dibuat sebagai dasar rentang derajat kesamaan. Taksospesies (suatu kelompok strain dari kesamaan fenotipik bersama yang tinggi) dapat atau tidak termasuk genospesies (kemampuan bertukar gen), sedangkan keduanya akan menghasilkan nama binomial yang sama (binomen). Koefisien tersebut adalah sebagai berikut:

$$\text{Koefisien kesamaan} \quad : \quad S_j = \frac{a}{a + b + c}$$

$$\text{Koefisien sebanding tunggal} \quad : \quad S_{sm} = \frac{a + d}{a + b + c + d}$$

Dimana, a = jumlah gambaran yang ada pada kedua strain yang dibandingkan, b = jumlah gambaran yang ada hanya pada strain pertama, c = jumlah gambaran yang ada hanya pada strain ke-dua, d = jumlah gambaran negatif pada kedua strain yang

dibandingkan.

2. Taksonomi Genetik

Perkembangan dalam biokimia perbandingan (atau biologi molekuler) menunjukkan bahwa urutan komposisi basa DNA, DNA dan homologi urutan RNA ribosomal (rRNA), juga pola metabolik stabil terkontrol-gen, polimer sel, struktur organel, dan pola regulasinya, menghasilkan informasi dari organisme yang berhubungan pada tingkat genetik. Homologi urutan DNA sering digunakan untuk membandingkan strain dan spesies yang berhubungan dekat, sedangkan perbandingan homologi rRNA sering digunakan sebagai kriteria hubungan di antara bermacam-macam organisme. Hal ini muncul dari suatu catatan evolusi bakterial (contoh, kehidupan, termasuk catatan fosil) yang terdapat dalam urutan asam amino dari protein bakteri dan dalam urutan basa nukleotida DNA dan RNA bakteri.

Komposisi materi genetik bakteri sudah diketahui, yaitu DNA. Dengan prosedur laboratorium, komposisi basa spesifik (Adenin, Guanin, Sitosin, dan Timin) pada suatu mikroorganisme, kemudian dibandingkan dengan komposisi basa spesifik pada mikroorganisme lain. Derajat kekerabatan dan kesamaan komposisi basa spesifik pada mikroorganisme dapat diketahui melalui proses hibridisasi. Dalam teknik ini rantai tunggal DNA suatu mikroorganisme digabungkan dengan rantai tunggal DNA mikroorganisme lain. Derajat penyatuan kembali rantai-rantai tunggal DNA ini mencerminkan derajat kesamaan. Penemuan informasi baru mengenai komposisi basa spesifik pada setiap mikroorganisme (khususnya bakteri), terus menerus dikembangkan untuk menentukan keabsahan kelompok-kelompok takson.

3. Taksonomi Berdasarkan Homologi Asam Nukleat

Informasi disandi oleh urutan basa DNA. Setelah beribu-ribu tahun, perubahan suatu organisme diperkirakan terjadi melalui mutasi, rekombinasi dan seleksi dalam lingkungan yang berbeda (contoh, evolusi), genomnya berubah dalam hal ukuran, komposisi basa nukleotida, dan urutan basa nukleotida. Perkiraan ukuran genom beberapa bakteri terdapat pada Tabel 7-1. Komposisi basa, konstan untuk setiap organisme, umumnya ditampilkan dalam pecahan mol guanin ditambah sitosin (yaitu, $[G + C]/[G + C + A + T]$ dalam persen).

Tabel 7.1 Perkiraan Kandungan DNA pada Berbagai Organisme

Spesies	Dalton
Sperma mamalia	18×10^{11}
<i>Salmonella typhimurium</i>	28×10^8
<i>Escherichia coli</i>	25×10^8
<i>Bacillus subtilis</i>	20×10^8
<i>Haemophilus influenzae</i>	16×10^8
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	$9,8 \times 10^8$
<i>Rickettsia rickettsii</i>	$9,8 \times 10^8$
<i>Chlamydia trachomatis</i>	$6,6 \times 10^8$
<i>Mycoplasma sp.</i>	5×10^8
Colifaga T4	$1,3 \times 10^8$

Nilai persen G + C untuk organisme yang berbeda bervariasi mulai dari 25% sampai lebih dari 75% (Tabel 7-2). Kesamaan komposisi basa DNA tidak menjamin homologi pada urutan basa : genom vertebrata dan bakteri dengan 44 mol persen GC, jelas memiliki urutan basa yang heterolog. Homologi urutan DNA bakteri diukur dengan beberapa prosedur yang menentukan besarnya formasi dupleks hibrid dari rantai DNA atau DNA dan rRNA tersendiri yang diperoleh dari bakteri yang berbeda. Pendekatan ini sering digunakan dalam penampilan kesamaan DNA dari spesies, genera dan famili bakteri yang berhubungan dekat.

Tabel 7.2 Komposisi Basa Nukleotida Pada DNA Berbagai Bakteri

Organisme	G + C (%)
<i>Clostridium perfringens</i> , <i>C. tetani</i>	24-28
<i>Rickettsia prowazekii</i> , <i>R. rickettsia</i>	29-33
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus anthracis</i>	32-36
<i>Streptococcus faecalis</i> , <i>S. agalactiae</i>	34-38
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i>	38-40
<i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Proteus mirabilis</i>	39
<i>Chlamydia psittaci</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>Bacteroides fragilis</i>	41-44
<i>Yersinia pestis</i> , <i>Vibrio cholerae</i>	46-49
<i>E. coli</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Salmonella spp.</i>	48-53
<i>Neisseria meningitidis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i>	49-53
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	52-55
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	56-60
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	67
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	62-70

Pada Tabel 7.2 tersebut memperlihatkan tidak adanya homologi DNA di

antara organisme yang berbeda. Homologi DNA tidak akan melebihi tingkat genus atau famili. Di lain pihak, urutan rRNA nampaknya lebih homolog dibandingkan DNA, di antara sejumlah besar organisme yang berbeda. Perubahan mutasional pada urutan RNA melalui umur jelas sangat rendah. Oleh karena itu, penelitian mengenai RNA ribosomal memberikan informasi yang sangat menarik tentang kepentingan filogenetik potensial. Hal yang mengherankan terjadi pada hasil penelitian tentang perbedaan yang ada di antara eubacteria dengan methanogen, halofil, dan termoplasma dalam hal dinding sel dan lipid membran, kepekaan eksotoksin, koenzim, dan cara metabolisme ternyata berhubungan dengan perbedaan urutan rRNA yang dimilikinya. Penelitian ini menghasilkan suatu anggapan bahwa methanogen, halofil, dan termoplasma menempati kingdom tersendiri yang disebut Archaeobacteria.

Tabel 7.3 Persentase Perkiraan Hubungan DNA dan RNA ribosom di Antara Beberapa Bakteri.

Sumber Asam Nukleat	% Homologi (terhadap <i>E. coli</i>)		
	DNA/DNA	DNA/RNA	rRNA
<i>Escherichia coli</i>	100	100	100
<i>Shigella dysenteriae</i>	89		99
<i>Salmonella typhimurium</i>	45		98
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	35	75	
<i>Serratia marcescens</i>	25		96
<i>Yersinia pestis</i>	15		
<i>Proteus mirabilis</i>	10	75	94
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1-3		87
<i>Neisseria meningitidis</i>	1-3		84
<i>Bacillus subtilis</i>	1	16	80
<i>Streptococcus faecalis</i>			79
<i>Clostridium perfringens</i>			79
<i>Mycoplasma pneumonia</i>			73
<i>Chlamydia trachomatis</i>			75
<i>Bacteroides fragilis</i>			72
Eukariot (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)			50-55

RANGKUMAN

Laboratorium mikrobiologi memiliki prosedur khusus dalam identifikasi mikroorganisme. Identifikasi bakteri dapat dilakukan secara fenotipik dan genotipik.

Identifikasi fenotipik meliputi pengamatan bentuk koloni, sel serta morfologi bakteri lainnya. Identifikasi genotipik dilakukan dengan analisis molekuler materi genetik. Selanjutnya dilakukan identifikasi dengan menguji aktivitas biokimia dan uji serologis.

Bakteri dapat dikelompokkan menjadi empat kelompok besar berdasarkan kelengkapan selnya, yaitu 1) Terdiri dari kelompok bakteri yang termasuk dalam Eubakteria Gram-negatif Yang Memiliki Dinding Sel; 2) terdiri dari kelompok bakteri yang termasuk dalam Eubakteria Gram-positif yang Memiliki Dinding Sel; 3) terdiri dari kelompok bakteri yang termasuk dalam Eubakteria Tanpa Dinding Sel; dan 4) Archaeobakteria

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