

Menik Kasiyati | Siti Raudah | Yulita Maulani | Emma Ismawatie
Eva Runi Khristiani | Bambang Supriyanta | Angriani Fusvita
M. Atik Martsiningsih | Muhammad Yashir | Arif Mulyanto



**PENGETAHUAN MEDIA
UNTUK MAHASISWA**

TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS

EDITOR:

Astuti Amin, S.Si., M.Sc.
Jekmal Malau, S.Si., M.Si.



**PENGETAHUAN MEDIA
UNTUK MAHASISWA**

TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS



Buku pengetahuan Media untuk mahasiswa teknologi laboratorium Medis ini disusun dengan bahasa yang sederhana dengan maksud untuk memudahkan mahasiswa memahaminya. Buku ini tersusun oleh 10 bab terdiri dari :

Bab 1 Pengantar Media

Bab 2 Jenis Media Menurut Komposisi, Bentuk, dan Fungsi

Bab 3 Sterilisasi dan Desinfeksi

Bab 4 Cara Pembuatan Media

Bab 5 Faktor yang Mempengaruhi Kualitas dan Cara menguji Kualitas Media

Bab 6 Uji Biokimia

Bab 7 Pembuatan, Komposisi, dan Kegunaan Media BAP

Bab 8 Pembuatan, Komposisi, dan Kegunaan Media MC

Bab 9 Pembuatan, Komposisi, dan Kegunaan Media LB dan BGLB

Bab 10 Pembuatan, Komposisi, dan Kegunaan Media NA



eureka
media aksara

Anggota IKAPI
No. 225/TE/2021

☎ 0858 5343 1992

✉ eurekamediaaksara@gmail.com

📍 Jl. Banjaran RT.20 RW.10

Bojongsari - Purbalingga 53362

ISBN 978-623-151-897-2



9 786231 518972

PENGETAHUAN MEDIA UNTUK MAHASISWA TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS

**Menik Kasiyati, S.ST, M.Imun
Siti Raudah, S.Si., M.Si
Yulita Maulani, S.Tr.Kes., M.Kes
Emma Ismawatie ,S.ST., M.Kes
Eva Runi Khristiani, S.Si., MT
Bambang Supriyanta, S.Si., M.Sc
Angriani Fusvita, S.Si., M.Si
M. Atik Martsiningsih, S.Si, M.Sc
Muhammad Yashir, S.E., M.KM
Arif Mulyanto, S.Si., M.Si**



eureka
media aksara

PENERBIT CV.EUREKA MEDIA AKSARA

**PENGETAHUAN MEDIA UNTUK MAHASISWA
TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS**

Penulis : Menik Kasiyati, S.ST, M.Imun
Siti Raudah, S.Si., M.Si
Yulita Maulani, S.Tr.Kes., M.Kes
Emma Ismawatie, S.ST., M.Kes
Eva Runi Khristiani. S.Si., MT
Bambang Supriyanta, S.Si., M.Sc
Angriani Fusvita, S.Si., M.Si
M. Atik Martsiningsih, S.Si., M.Sc
Muhammad Yashir, S.E., M.KM
Arif Mulyanto, S.Si., M.Si

Editor : Astuti Amin, S.Si., M.Sc
Jekmal Malau, S.Si., M.Si

Desain Sampul : Eri Setiawan

Tata Letak : Rizki Rose Mardiana

ISBN : 978-623-151-897-2

Diterbitkan oleh : **EUREKA MEDIA AKSARA, NOVEMBER 2023**
ANGGOTA IKAPI JAWA TENGAH
NO. 225/JTE/2021

Redaksi:

Jalan Banjaran, Desa Banjaran RT 20 RW 10 Kecamatan Bojongsari
Kabupaten Purbalingga Telp. 0858-5343-1992

Surel : eurekamediaaksara@gmail.com

Cetakan Pertama : 2023

All right reserved

Hak Cipta dilindungi undang-undang

Dilarang memperbanyak atau memindahkan sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk apapun dan dengan cara apapun, termasuk memfotokopi, merekam, atau dengan teknik perekaman lainnya tanpa seizin tertulis dari penerbit.

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum warohmatullahi wabarokatuh

Puji Syukur kehadirat Allah SWT, Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga buku referensi yang telah ditulis dan disusun dapat diterbitkan sesuai dengan waktu yang telah direncanakan. Buku ini disusun untuk menambah referensi bagi mahasiswa dan petugas dilaboratorium mikrobiologi dalam menyiapkan media yang akan digunakan untuk pertumbuhan bakteri atau mikororganisme lain dalam praktikum sehari-hari. Kami harap buku ini akan berguna dan menjadi bekal dalam proses penyiapan media.

Buku pengetahuan Media untuk mahasiswa teknologi lobaratorium Medis ini disusun dengan bahasa yang sederhana dengan maksud untuk memudahkan mahasiswa memahaminya. Buku ini tersusun oleh 10 bab terdiri dari :

Bab 1 Pengantar Media

Bab 2 Jenis Media Menurut Komposisi, Bentuk, dan Fungsi

Bab 3 Sterilisasi dan Desinfeksi

Bab 4 Cara Pembuatan Media

Bab 5 Faktor yang Mempengaruhi Kualitas dan Cara Menguji Kualitas Media

Bab 6 Uji Biokimia

Bab 7 Pembuatan, Komposisi, dan Kegunaan Media BAP

Bab 8 Pembuatan, Komposisi, dan Kegunaan Media MC

Bab 9 Pembuatan, Komposisi, dan Kegunaan Media LB dan BGLB

Bab 10 Pembuatan, Komposisi, dan Kegunaan Media NA

Buku ini masih memiliki banyak kekurangan, oleh karena itu kami mohon adanya saran dan kritik yang membangun untuk penyempurnaan dan perbaikan buku ini.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu hingga terselesaikan dan terbitnya buku ini. Semoga dapat menjadi sumber rujukan bagi mahasiswa dan petugas laboratorium terutama laboratorium mikrobiologi.

Wassalamualaikum warohmatullahi wabarokatuh

Yogyakarta, 04 November 2023

Tim Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	iii	
DAFTAR ISI	v	
DAFTAR TABEL	viii	
DAFTAR GAMBAR	ix	
BAB 1	PENGANTAR MEDIA	1
	A. Pendahuluan	1
	B. Bahan untuk Pertumbuhan Bakteri.....	2
	C. Klasifikasi Media Pertumbuhan Bakteri.....	4
	D. Persiapan Pembuatan Media Bakteri Pertumbuhan.....	8
	E. Kontrol Kualitas Media Kultur	12
	F. Kesalahan Paling Umum dan Penyebabnya	14
	DAFTAR PUSTAKA	16
BAB 2	JENIS MEDIA MENURUT KOMPOSISI, BENTUK DAN FUNGSI	17
	A. Pendahuluan	17
	B. Prinsip Media	18
	C. Jenis Media Berdasarkan Komposisi.....	20
	D. Jenis Media Berdasarkan Bentuk	20
	E. Jenis Media Berdasarkan Fungsi	23
	DAFTAR PUSTAKA	38
BAB 3	STERILISASI DAN DESINFEKSI	43
	A. Pendahuluan	43
	B. Macam-Macam Sterilisasi	44
	C. Macam-Macam Desinfeksi	52
	DAFTAR PUSTAKA	55
BAB 4	CARA PEMBUATAN MEDIA	56
	A. Pendahuluan	56
	B. Media Dibedakan Menjadi 3 Berdasarkan Konsistensinya	58
	C. Karakteristik dan Persyaratan Media	59
	D. Cara Pembuatan Media.....	60
	DAFTAR PUSTAKA	65

BAB 5	FAKTOR YANG MEMPENGARUHI KUALITAS DAN CARA MENGUJI KUALITAS MEDIA.....	66
	A. Pendahuluan	66
	B. Bahan-Bahan Media Pertumbuhan	68
	C. Quality Control Media.....	73
	DAFTAR PUSTAKA.....	76
BAB 6	UJI BIOKIMIA	77
	A. Pengertian Uji Biokimia	77
	B. Berbagai Macam Uji Biokimia	77
	DAFTAR PUSTAKA.....	111
BAB 7	PEMBUATAN, KOMPOSISI, DAN KEGUNAAN MEDIA BLOOD AGAR PLATE	113
	A. Pendahuluan	113
	B. Komposisi Media BAP	114
	C. Pembuatan Media BAP.....	115
	D. Manfaat Media BAP	117
	E. Penyimpanan dan Pembuangan Media BAP	118
	DAFTAR PUSTAKA.....	119
BAB 8	PEMBUATAN, KOMPOSISI, DAN KEGUNAAN MEDIA MAC CONKEY	121
	A. Pendahuluan	121
	B. Macam-Macam Media	122
	C. Sejarah Media Mac Conkey	125
	D. Pengertian Media Mac Conkey	126
	E. Prinsip Mac Conkey	127
	F. Fungsi Media Mac Conkey	128
	G. Komposisi Media Mac Conkey	130
	H. Cara Pembuatan	131
	I. Interpretasi Hasil Mac Conkey	131
	J. Kontrol Kualitas Media Mac Conkey	133
	K. Kelemahan Media Mac Conkey	133
	L. Kesimpulan	134
	DAFTAR PUSTAKA.....	135
BAB 9	PEMBUATAN, KOMPOSISI, DAN KEGUNAAN MEDIA LB DAN BGLB.....	137
	A. Pendahuluan	137

	B. Pembuatan dan Komposisi.....	138
	DAFTAR PUSTAKA	143
BAB 10	PEMBUATAN, KOMPOSISI, DAN	
	KEGUNAAN MEDIA NUTRIENT AGAR (NA)	144
	A. Nutrisi Pertumbuhan Bakteri.....	144
	B. Media Nutrient Agar (NA).....	147
	C. Komposisi Nutrient Agar	149
	D. Pembuatan Media Nutrient Agar dan	
	Nutrient Broth	150
	DAFTAR PUSTAKA	155
	TENTANG PENULIS	156

DAFTAR TABEL

Tabel 1. 1	Unsur dalam Media dan Sumbernya	3
------------	---------------------------------------	---

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. 1	Proses Pembuatan Media Kultur	9
Gambar 2. 1	(a) Alkaline Peptone Water (Tankeshwar, 2022a), (b) media MR (Tankeshwar, 2022h) dan (c) media VP (Dahal, 2023c)	21
Gambar 2. 2	(a) Media Sulfur indole Motility (Tankeshwar, 2022j) dan (b) Cary-Blair (Tankeshwar, 2022c)	21
Gambar 2. 3	(a) Media Blood agar (Tankeshwar, 2022b), (b) Mac Conkey Agar (Tankeshwar, 2022g), (c) Chocolate agar (Tankeshwar, 2022d), dan TSIA (Dahal, 2023b)	22
Gambar 2. 4	Media Lowenstein Jensen (Rao, 2020)	23
Gambar 2. 5	(a) Media Alkaline Peptone Water (Tankeshwar, 2022a) dan (b) Nutrient Agar (Tankeshwar, 2023b)	24
Gambar 2. 6	Tipe hemolisis pada media blood agar. Pertumbuhan bakteri <i>Streptococcus pneumoniae</i> menunjukkan α -hemolisis, <i>Streptococcus pyogenes</i> menunjukkan β -hemolisis dan γ -hemolisis (Cappuccino and Chand Welsh, 2019)	25
Gambar 2. 7	(a) <i>Haemophilus influenzae</i> pada media coklat and Chocolate agar slants (Tankeshwar, 2022d), (b) Loeffler medium (Aryal, 2022a) dan (c) Lowenstein Jensen (Tankeshwar, 2022f)	26
Gambar 2. 8	(a) Selenite broth (Aryal, 2022c), (b) Telurit blood agar (Burkovski LA, 2014), (c) Geolity broth (Bhatia and Ichhpujani, 2008), dan (d) Tetrathionate broth (Oxoid Limited, 2023)	27
Gambar 2. 9	Media differensial (Cappuccino and Chand Welsh, 2019)	29
Gambar 2. 10	Media Blood Tellurite plate (Burkovski LA, 2014), TBX (Jorgensen, 2015) dan TCBS (Singh, 2022)	30

Gambar 2. 11	Media Brain Heart Infusion (BHI) (Rijal, 2022b), Tryptose Soy Agar (TSA) (Aryal, 2022d), dan media nutrient agar (Fatima, 2022) ...	31
Gambar 2. 12	Pertumbuhan <i>E. coli</i> dan <i>S. aureus</i> pada media nutrient agar dan fenil etil alkohol (Cappuccino and Chand Welsh, 2019).....	32
Gambar 2. 13	Pertumbuhan bakteri <i>Salmonella typhimurium</i> dan <i>Shigella flexneri</i> (koloni dengan titik hitam menunjukkan bakteri <i>Salmonella</i>) (Leboffe and Pierce, 2011)	32
Gambar 2. 14	Pertumbuhan bakteri gram negatif pada media mac conkey agar. <i>Escherichia coli</i> dan <i>Enterobacter aerogenes</i> memproduksi warna pink menghasilkan asam dari fermentasi laktosa. <i>Shigella sonnei</i> dan <i>Proteus mirabilis</i> non laktosa fermenter (Leboffe and Pierce, 2011).....	34
Gambar 2. 15	Media XLD, kiri: koloni <i>Salmonella typhimurium</i> berwarna merah muda berpusat hitam dan kanan: koloni <i>Shigella sp.</i> berwarna merah muda (Rijal, 2022e)	34
Gambar 2. 16	Media Cary-Blair (Tankeshwar, 2022c) dan media transport amies (Rijal, 2022a).....	35
Gambar 2. 17	(a) Karakteristik pertumbuhan bakteri pada media thioglycollate broth (Rijal, 2022c), dan (b) Robertson's Cooked Meat Medium (Tankeshwar, 2022i)	36
Gambar 2. 18	Media fermentasi karbohidrat (Dahal, 2023a) dan media simon's citrat agar (Tankeshwar, 2022e).....	37
Gambar 3. 1	Sterilisasi Pemijaran Ose.....	45
Gambar 3. 2	Sterilisasi Cara Pembakaran.....	45
Gambar 3. 3	Alat Sterilisasi Oven	47
Gambar 3. 4	Alat Sterilisasi Autoklaf	47
Gambar 3. 5	Biology Safety Cabinet	51
Gambar 4. 1	Media dalam Botol Kemasan	57

Gambar 4. 2	Media Nutrien Broth dalam tabung reaksi	58
Gambar 4. 3	Media Cair, Semi Solid, dan Media Solid	59
Gambar 4. 4	Penimbangan, Pemanasan dan Pelarutan Media	60
Gambar 4. 5	Tampilan Media Padat Miring dan Tegak	62
Gambar 4. 6	Proses Penuangan Media	62
Gambar 6. 1	(a) Media Uji Fermentasi Karbohidrat yang belum mengalami fermentasi oleh bakteri	78
Gambar 6. 2	(b) Media Uji Fermentasi Karbohidrat yang sudah mengalami fermentasi oleh bakteri sehingga berubah warna	78
Gambar 6. 3	Uji Methyl Red Setelah Media Ditambah dengan Methyl Red 1% Menunjukkan Hasil Negatif (Kiri) Karena Media Tidak Berubah Warna atau Tetap Kuning dan Hasil Positif (Kanan) Karena Media Berubah Warna Menjadi Merah	82
Gambar 6. 4	Uji Voges-Proskauer Setelah Media Ditambah dengan KOH 40% dan Larutan α - Naftol 5% Dalam Etanol Menunjukkan Hasil Negatif (Kiri) karena Media Tidak Berubah Warna (Tetap Kuning) dan Hasil Positif (Kanan) Karena Media Berubah Warna Menjadi Merah	84
Gambar 6. 5	Uji Katalase dengan hasil positif pada koloni Staphylococcus aureus Ditambah H ₂ O ₂ 3%	86
Gambar 6. 6	Transport Elektron pada Respirasi Anaerob (Kiri) dan Transport Elektron pada Respirasi Aerob (Kanan)	88
Gambar 6. 7	Media Uji Nitrat Sebelum Direduksi Bakteri (Kiri) dan Setelah Direduksi oleh Bakteri (Kanan)	90
Gambar 6. 8	Hidrolisis Tryptofan dan Uji Indol	90
Gambar 6. 9	Media Uji Indol Sebelum Diberi Reagens Kovacks (kiri) dan Setelah Diberi Reagens Kovacks (kanan)	92

Gambar 6. 10	Uji Hidrogen Sulfida (H ₂ S) pada Media TSIA	94
Gambar 6. 11	Media Simmon's Citrat dengan Hasil Negatif (Kiri) dan Hasil Positif (Kanan)	95
Gambar 6. 12	Rumus Bangun Amilosa	97
Gambar 6. 13	Rumus Bangun Amilopektin	97
Gambar 6. 14	Peruraian Amilose Menjadi Maltosa dan Maltotriose (Prescott, 2017)	99
Gambar 6. 15	Peruraian maltose menjadi glukose dan glukose dan Peruraian Maltriose menjadi maltose dan glukose (Prescott, 2017)	100
Gambar 6. 16	Peruraian amilopektin menjadi glukose, maltose dan oligosakarida (Prescott, 2017)	101
Gambar 6. 17	Rumus Bangun selulosa (Prescott, 2017)	102
Gambar 6. 18	Media Uji Urease dengan Hasil Reaksi Negatif (kiri) dan Hasil Reaksi Positif	106
Gambar 6. 19	Media Agar Darah (Blood Agar Plate =BAP)	108
Gambar 6. 20	Pola β -hemolisis pada Media Agar Darah	109
Gambar 6. 21	Pola α-hemolisis pada Media Agar Darah	109
Gambar 6. 22	Pola γ-hemolisis pada Media Agar Darah	110
Gambar 7. 1	Media Blood Agar sebelum dilakukan penggoresan pada media (Buxton, 2016)	115
Gambar 7. 2	Interpretasi hasil pada Media Blood Agar Plate (Buxton, 2016)	117
Gambar 9. 1	Media Lactose Broth dan Brilliant Green Lactose Bile 2% (Broth) by Oxoid.com (Sumber : Inventory Laboratorium)	142
Gambar 10. 1	Media Nutrient Agar (Merck)	148
Gambar 10. 2	Media Nutrient Agar (Oxoid)	148
Gambar 10. 3	Media Nutrient Agar (Difco)	149
Gambar 10. 4	Melarutkan Agar dan bahan lain di wadah berbeda	151
Gambar 10. 5	Memanaskan agar di atas hot plate stirrer dan hanya melarutkan di akuades saja	151
Gambar 10. 6	Mencampurkan agar dan bahan lainnya dalam satu wadah, mengukur pH media	152
Gambar 10. 7	Pseudomonas Aeruginosa Di Media NA	154

Gambar 10. 8 Escherichia coli di media NA154



**PENGETAHUAN MEDIA UNTUK
MAHASISWA TEKNOLOGI
LABORATORIUM MEDIS**

**Menik Kasiyati, S.ST, M.Imun
Siti Raudah, S.Si., M.Si
Yulita Maulani, S.Tr.Kes., M.Kes
Emma Ismawatie, S.ST., M.Kes
Eva Runi Khristiani, S.Si.,MT
Bambang Supriyanta, S.Si., M.Sc
Angriani Fusvita, S.Si., M.Si
M. Atik Martsiningsih, S.Si, M.Sc
Muhammad Yashir, S.E., M.KM
Arif Mulyanto, S.Si., M.Si**



BAB

1

PENGANTAR MEDIA

Menik Kasiyati, S.ST., M.Imun

A. Pendahuluan

Bakteriologi klinis berkontribusi dalam diagnosa dan perawatan pasien dan pengawasan terhadap adanya resistensi antimikroba. Di era digitalisasi ini, Teknik diagnosis berbasis kultur tetap menjadi standar bakteriologi klinis. Media kultur merupakan produk kompleks berdasarkan larutan buffer nutrisi biologis (berbahan dasar hewani, tumbuhan atau ragi). Media kultur terdiri dari pepton dan ekstrak (sumber N) serta polisakarida (sumber C), mineral garam, faktor pertumbuhan dan vitamin. Pembuatan media kultur perlu adanya penambahan agar-agar supaya media padat menjadi padat dan dapat digunakan untuk isolasi bakteri. Banyaknya jenis atau spesies bakteri di alam, maka variasi komposisi media juga akan semakin banyak (Orekan *et al.*, 2021).

Media kultur pada dasarnya terdiri dari unsur-unsur dasar (air, nutrisi), yang harus ditambahkan faktor pertumbuhan berbeda yang spesifik untuk setiap bakteri dan diperlukan untuk pertumbuhannya. Bakteri dapat ditumbuhkan pada media kultur, suatu zat yang dirancang untuk menciptakan kondisi nutrisi yang mirip dengan lingkungan alami tempat mikroorganisme biasanya bertahan hidup dan berkembang biak. Media kultur adalah istilah yang digunakan untuk menggambarkan suatu zat kompleks atau sintetik yang

ditemukan dalam salah satu dari dua wujud materi cair (kaldu) atau padat (seperti agar-agar dalam cawan petri).

Media kultur bergantung pada sejumlah faktor penting termasuk rangkaian nutrisi yang optimal, oksigen atau gas lainnya, kelembaban, pH dan suhu. Nutrisi penting termasuk sumber karbon, nitrogen, fosfat anorganik dan belerang, logam sisa, air dan vitamin. Setiap nutrisi, dalam berbagai kombinasi, merupakan bahan utama media kultur mikrobiologis. Nutrisi berfungsi sebagai faktor pertumbuhan. Faktor pertumbuhan adalah zat alami, seperti asam amino, yang mampu merangsang pertumbuhan sel, proliferasi, dan diferensiasi sel (Sandle, 2011).

Pada tahun 1860, Pasteur adalah orang pertama yang menggunakan media kultur untuk menumbuhkan bakteri di laboratorium. Media ini terdiri dari abu ragi, gula dan garam amonium. Pada tahun 1881, W. Hesse menggunakan agar-agar istrinya sebagai bahan pematatan untuk pertumbuhan bakteri. Pada tahun 1887, alat sederhana yang disebut cawan petri merevolusi mikrobiologi. Dengan ditemukannya cawan petri, fokusnya beralih ke formulasi media kultur. Dengan semua penelitian yang dilakukan, para ilmuwan mulai mengganti gelatin dengan agar-agar karena tahan terhadap pencernaan dan pencairan mikroba. Sekitar tahun 1930, faktor pertumbuhan tertentu, termasuk faktor X dan V, terbukti penting dalam nutrisi bakteri. Pada awal tahun 1950-an, sebagian besar vitamin juga dikarakterisasi sebagai ko-enzim. Informasi terperinci ini mengarahkan para ilmuwan untuk mengembangkan pemahaman tentang jalur biokimia (Zimbro *et al.*, 2009).

B. Bahan untuk Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan mikroorganisme dapat menjadi optimal tergantung pada beberapa hal penting factor yaitu,

1. Nutrisi yang tepat harus tersedia.
2. Oksigen atau gas lainnya harus tersedia, sesuai kebutuhan.
3. Kelembaban diperlukan.
4. Media harus memiliki pH yang sesuai.
5. Hubungan suhu yang tepat harus dipertahankan.

6. Media harus bebas dari gangguan bioburden.
7. Kontaminasi harus dicegah.

Awalnya media pertumbuhan mikroorganisme dibuat dalam bentuk infus daging. Ekstrak daging sapi atau ragi sering menggantikan infus daging dalam media kultur. Penambahan pepton, yang merupakan protein, menyediakan sumber nitrogen dan karbon yang tersedia. Protein merupakan sumber nitrogen dan karbon. pH media kultur penting untuk pertumbuhan mikroorganisme. Suhu adalah parameter penting lainnya, bakteri dan jamur mesofilik memiliki pertumbuhan optimal pada suhu 25-40°C; organisme termofilik (menyukai panas) hanya tumbuh pada suhu lebih dari 45°C; organisme psikrofilik (menyukai dingin) memerlukan suhu di bawah 20°C. Organisme patogen manusia umumnya mesofil. Konstituen media umumnya diformulasikan berdasarkan kemampuan bakteri dalam menggunakan komponen media. Tabel 1.1 menjelaskan tentang kebutuhan media dan sumbernya (Zimbardo *et al.*, 2009).

Tabel 1. 1 Unsur dalam Media dan Sumbernya

Unsur	Sumber
Amino-nitrogen	Pepton, protein hydrolysate, infusions dan ekstrak
Faktor pertumbuhan	Darah, serum, ekstrak ragi atau vitamin, NAD
Sumber energi	Gula, alcohol dan karbohidrat
Garam buffer	Phosphat, sulfat, dan sitrat
Mineral dan logam	Phosphat, sulfat, magnesium, kalsium, besi
Agen selektif	Bahan Kimia, antimikroba, pewarna
Indikator pewarna	Phenol Red, Neutral Red
Agen memadat	Agar, gelatin, alginate dan silica gel

1. Komposisi Media
 - a. Aquades
 - b. Pepton, protein hydrolysate, infusa dan ekstrak
 - c. Karbohidrat
 - d. Buffer
 - e. Agen penselektif
 - f. Indikator pewarna
 - g. Anti Mikroba
 - h. Agen pensolid
 - i. Kromogen dan Fluorogen
2. Faktor Lingkungan dalam Media
 - a. Tekanan Udara
 - b. Kelembaban udara
 - c. Agen pelindung dan faktor pertumbuhan

C. Klasifikasi Media Pertumbuhan Bakteri

Media kultur mengandung nutrisi dan faktor pertumbuhan fisik yang diperlukan untuk pertumbuhan mikroba. Semua mikroorganisme tidak dapat tumbuh sendiri dalam satu media dan banyak yang tidak dapat tumbuh pada media apapun. Media kultur bakteri sering diklasifikasikan berdasarkan konsistensi, dan tujuannya (Sukhorukov, 2021).

1. Klasifikasi Media Kultur Bakteri Berdasarkan Konsistensinya

a. Media padat

Media padat mengandung komposisi agar 1,5-2,0% dan zat pepadatan inert. Media padat mengandung struktur fisik dan memungkinkan bakteri tumbuh dengan cara yang informatif atau berguna secara fisik (misalnya sebagai koloni atau garis-garis). Media padat bermanfaat untuk mengisolasi bakteri atau untuk menentukan karakteristik koloni isolat.

b. Media Setengah Padat

Medium setengah padat siap dengan konsentrasi agar 0,5%. Media semi padat mengandung konsistensi lembut seperti SIM yang bermanfaat untuk budidaya

bakteri mikroaerofilik atau untuk penentuan motilitas bakteri.

c. Media Cair (Kaldu).

Media kaldu mengandung nutrisi dalam jumlah tertentu tetapi tidak mengandung bahan pembentuk gel seperti gelatin atau agar. Media kaldu memiliki berbagai tujuan seperti untuk menumbuhkan populasi organisme, studi fermentasi, dan berbagai pengujian lainnya. Misalnya, Tes fermentasi gula, kaldu MRVP (Erkmen, 2021).

2. Klasifikasi Media Kultur Bakteri Berdasarkan Tujuannya

Media pertumbuhan bakteri dibuat dengan tujuan khusus diperlukan untuk membantu pengenalan, identifikasi, dan isolasi jenis bakteri tertentu. Terdapat beberapa media pertumbuhan yang digunakan untuk memenuhi kebutuhan tersebut (Sukhorukov, 2021).

a. Media Tujuan Umum

Media basal juga disebut sebagai media serba guna adalah media sederhana yang mendukung kondisi pertumbuhan sebagian besar bakteri. Air pepton, kaldu nutrisi, dan agar Nutrient Agar (NA) dianggap sebagai media dasar. Media semacam ini umumnya digunakan untuk isolasi pertama mikroorganisme.

b. Media yang Diperkaya

Dengan menambahkan nutrisi tambahan seperti darah, serum, kuning telur ke media dasar menjadikan media diperkaya. Media agar coklat, Media serum Loeffler juga merupakan beberapa contoh media yang diperkaya. Agar sering kali dibuat dengan menambahkan 5-10% (berdasarkan volume) darah ke dasar agar.

c. Media Selektif dan Media Pengayaan

Media ini dirancang untuk menghambat bakteri komensal atau kontaminasi yang tidak diinginkan dan membantu memulihkan patogen dari populasi campuran bakteri. Meskipun media selektif berbahan dasar agar, media pengayaan memiliki konsistensi cair. Kedua media

ini mempunyai tujuan yang sama. Media agar apa pun dapat berfungsi selektif dengan penambahan zat penghambat tertentu yang tidak mempengaruhi patogen yang diinginkan. Berbagai pendekatan untuk menciptakan media selektif meliputi penambahan antibiotik, pewarna, bahan kimia, perubahan pH, atau campuran dari semua ini.

d. Media Selektif

Prinsip dari media ini adalah penekanan pertumbuhan diferensial. Media selektif dirancang untuk menekan pertumbuhan beberapa mikroorganisme sekaligus memungkinkan pertumbuhan mikroorganisme lainnya. Media selektif adalah media berbasis agar (padat) sehingga masing-masing koloni dapat diisolasi. Contoh dari media ini adalah:

- 1) Thayer Martin Agar yang digunakan untuk mengisolasi kandungan *Neisseria gonorrhoeae* antibiotik; vankomisin, colistin, dan nistatin.
- 2) Mannitol Salt Agar dan Salt Milk Agar yang digunakan untuk mengisolasi *S. aureus* mengandung NaCl 10%.
- 3) Media kalium telurit yang digunakan untuk mengisolasi *C. difteriae* mengandung 0,04% kalium telurit.
- 4) Agar MacConkey (MC) yang digunakan untuk anggota *Enterobacteriaceae* mengandung garam empedu yang menghambat pertumbuhan bakteri gram positif.

e. Media Enrichmen/Pengaya

Media pengayaan digunakan untuk memperluas konsentrasi relatif mikroorganisme tertentu dalam kultur sebelum ditanam pada media selektif padat. Berbeda dengan media selektif, kultur pengayaan biasanya digunakan sebagai media kaldu. Media pengayaan adalah media cair yang juga berfungsi untuk menghambat komensal dalam spesimen klinis. Kaldu Selenite F, kaldu

tetrationsat, dan air pepton alkali (APW) digunakan untuk memulihkan patogen dari spesimen tinja.

f. Media Differential/Pembeda

Media tertentu dirancang sedemikian rupa sehingga bakteri yang berbeda dapat hidup berdasarkan warna koloninya. Berbagai pendekatan mencakup penggabungan pewarna, substrat metabolik sehingga bakteri yang memanfaatkannya tampak sebagai koloni dengan warna berbeda. Media seperti ini disebut media diferensial atau media indikator. Media diferensial memungkinkan pertumbuhan lebih dari satu mikroorganisme yang diinginkan tetapi dengan koloni yang dapat dibedakan secara morfologis.

g. Media Transportasi

Spesimen klinis harus diangkut ke laboratorium segera setelah pengumpulan untuk menghentikan pertumbuhan berlebih organisme kontaminasi atau komensal dan menjaga kelangsungan hidup patogen potensial. Hal ini dapat dicapai dengan menggunakan media transportasi. Media tersebut mencegah pengeringan suatu spesimen, menjaga rasio patogen terhadap komensal, dan menghambat pertumbuhan berlebih bakteri yang tidak diinginkan. Beberapa dari media ini (Stuart & Amie) memiliki konsistensi semi-padat.

h. Media Anaerobik

Bakteri anaerob memerlukan media khusus untuk pertumbuhannya karena memiliki kandungan oksigen yang rendah, potensi reduksi oksidasi yang berkurang, dan tambahan nutrisi. Media untuk bakteri anaerob mungkin perlu ditambah dengan nutrisi seperti hemin dan vitamin K. Media tersebut juga perlu dikurangi dengan cara fisik atau kimia. Merebus media berfungsi untuk mengeluarkan oksigen terlarut. Penambahan glukosa 1%, tioglikolat 0,1%, vitamin C 0,1%, sistein 0,05%, atau dipanaskan. Sebelum digunakan, media harus

direbus dalam penangas air untuk mengeluarkan oksigen terlarut kemudian ditutup dengan parafin cair steril.

i. Media Uji

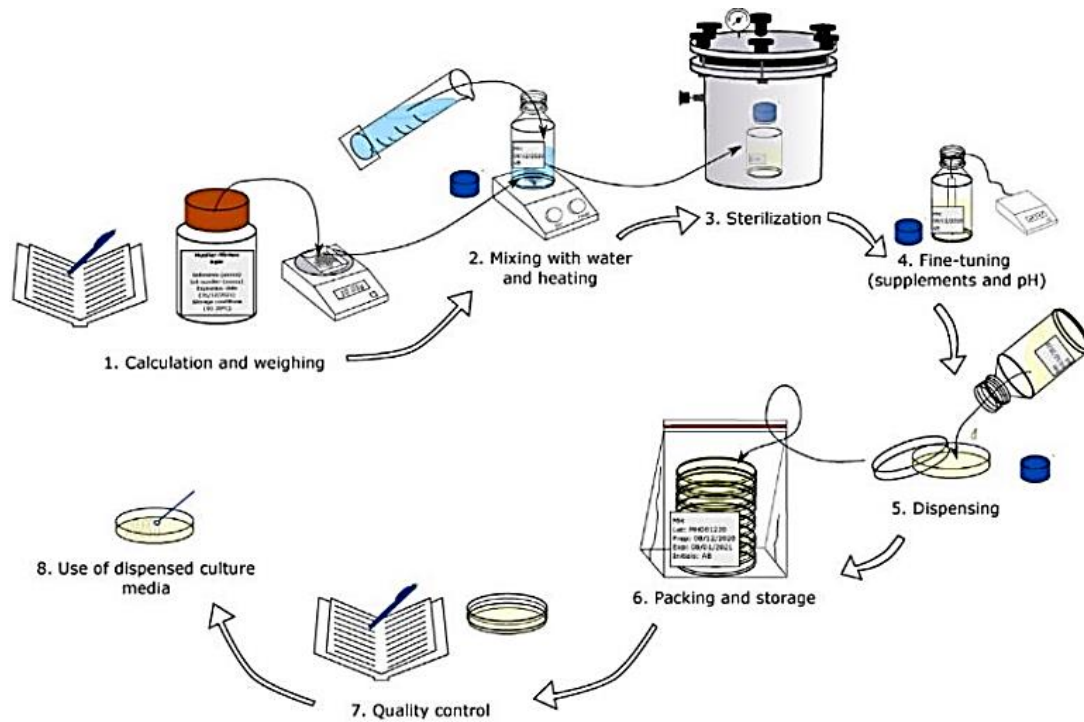
Media ini digunakan untuk pengujian vitamin, asam amino, dan antibiotik. Misalnya, media uji antibiotik digunakan untuk menentukan potensi antibiotik dengan teknik uji mikrobiologi.

Jenis media lainnya meliputi;

- 1) Media pencacahan mikroorganisme,
- 2) Media untuk karakterisasi mikroorganisme,
- 3) Media pemeliharaan, dll.

D. Persiapan Pembuatan Media Bakteri Pertumbuhan

Ketika memilih media kultur, perlu adanya beberapa pertimbangan. Antara lain merk, bahan produknya karena mungkin setiap merk akan memberikan komposisi yang berbeda. Kemasan dengan tutup ulir yang akan menjaga kelembaban. Verifikasi lembar data sheet, petunjuk penggunaan serta tanggal kadaluarsanya.



Gambar 1. 1 Proses Pembuatan Media Kultur

Media kultur hidrolisat sebelum digunakan harus diperhatikan nama dan nomor lot, integritas sampel, dan masa kadaluarsa dari media tersebut. Media yang masih berbentuk serbuk di simpan di tempat sejuk dan kering serta terlindung dari cahaya dan debu atau sesuai dengan instruksi dari pabrik pembuatnya, karena ada beberapa media yang harus disimpan pada suhu tertentu, misalnya media bubuk kaldu urea harus disimpan pada suhu 2-8°C. Suhu dan kelembaban harus terus dipantau karena media bersifat higroskopis sehingga cepat mengalami dehidrasi dan cepat rusak bila terkena kelembaban.

Proses persiapan pembuatan media plate meliputi beberapa tahap yaitu:

1. Perhitungan dan Penimbangan Media Dehidrat

Media murni harus dihitung dan ditimbang di lingkungan dengan tingkat kelembaban yang rendah. Pada saat melakukan penimbangan harus menggunakan masker untuk mencegah resiko menghirup partikel halus dari media murni dan sarung tangan untuk menghindari kontak kulit. Ada beberapa media yang menyebabkan iritasi kulit dan mata sehingga saat melakukan penimbangan sebaiknya menggunakan kaca mata pengaman (baca petunjuk produk). Setiap media murni sudah mencantumkan berat dan volume tertentu dalam membuat media. Sehingga pada saat akan membuat media, tinggal menyesuaikan dengan kebutuhan media yang akan dibutuhkan. Untuk menyiapkan media padat sedalam 4 mm dalam cawan petri dengan diameter 9 cm, diperlukan volume sebanyak 20-25 mL.

2. Pencampuran dengan Air dan Pemanasan

Pemanasan sering kali diperlukan untuk melarutkan bubuk media, namun tergantung juga instruksi spesifik dari produsen yang tercetak di label kemasan media. Gunakan air tawar yang dibuat melalui distilasi, deionisasi, atau osmosis balik. Kehadiran ion tembaga, konduktivitas tinggi, dan pH tinggi dapat secara signifikan mengubah kualitas media yang disiapkan sendiri. Jangan gunakan air keran karena mempengaruhi selektivitas dan pH.

3. Sterilisasi

Kebanyakan media memerlukan sterilisasi, sehingga hanya bakteri dari spesimen pasien yang akan tumbuh dan bukan kontaminan dari air atau media bubuk. Beberapa media tidak dapat diautoklaf (misalnya agar ss, agar cary blair). Media cair didistribusikan ke masing-masing tabung atau botol sebelum sterilisasi. Autoklaf media hanya bila bahan-bahan telah larut seluruhnya.

4. Penambahan Suplemen

Jika bahan lain ingin ditambahkan (misalnya, suplemen seperti darah domba atau vitamin tertentu, nutrisi, pemacu pertumbuhan, atau antibiotik), bahan tersebut harus dimasukkan ketika agar cair sudah dingin, sebelum didistribusikan ke cawan petri. Kualitas darah berperan penting dalam kinerja media yang mengandung darah, misalnya reaksi hemolitik dapat dibedakan dengan baik pada media yang mengandung darah domba. Konsentrasi, homogenitas, viskositas, dan warna darah harus diperiksa sebelum digunakan untuk persiapan media. Sertifikat analisis dan kondisi steril harus dipertimbangkan untuk bahan tambahan lainnya.

5. Penuangan di Cawan Petri

Media kultur didinginkan dalam penangas air (45-50°C) atau pengaduk hot plate sebelum dikeluarkan untuk meminimalkan kondensasi. Anda dapat memeriksa suhu dengan termometer inframerah tanpa sentuhan. Pengeluaran pada suhu yang terlalu tinggi menyebabkan penguapan yang berlebihan. Jika media berada terlalu lama dalam penangas air, dapat menyebabkan pengendapan (panaskan kembali, namun jangan terlalu panas). Jangan gunakan air dingin untuk mendinginkan media agar, karena dapat menyebabkan serpihan atau pembentukan awan.

6. Pengemasan dan Penyimpanan

Label diberikan pada masing-masing pelat dengan nama (singkatan/kode), tanggal persiapan, dan nomor lot.

Cawan Petri dibungkus dalam kantong plastik tertutup dan berlabel, maksimal sepuluh piring per kantong, untuk menghindari kelembaban. Simpan secara terbalik, pada suhu 2-8°C, di tempat gelap dengan mengikuti petunjuk pabrik.

7. Penggunaan Media Kultur

Terakhir, semua media, harus melalui kontrol kualitas yang ketat sebelum digunakan dalam pengaturan diagnostik. Pengendalian mutu (QC) harus didasarkan pada pendekatan pragmatis dan berbasis risiko. Media yang baru disiapkan dan dibagikan harus dikarantina sampai lolos qc.

8. Pembuangan Media Kultur Bekas

Bawa media kultur ke suhu kamar sebelum digunakan. Pastikan tidak ada tetesan air yang terlihat pada permukaan agar-agar atau di dalam tutupnya. Jika terlihat, jangan kibaskan air kondensasi dari tutupnya. Sebagai gantinya, keringkan pelat selama 20-30 menit pada suhu 35-37°C dengan pelat agar-agar terbalik dan dasar agar-agar diletakkan miring pada tutupnya (jika perlu, keringkan pelat pada suhu 20-25°C semalaman).

E. Kontrol Kualitas Media Kultur

Setiap laboratorium harus menerapkan proses kontrol kualitas. Pada persiapan pembuatan media kultur diperlukan kontrol kualitas antara lain:

1. Secara Makroskopis

- a. Secara makroskopis plast terlihat halus, tidak terlihat adanya retakan
- b. Agar-agar lepas dari cawan petri
- c. Agar-agar membeku atau meleleh
- d. Volume pengisian plat hampir sama
- e. Ketinggian agar-agar harus lebih dari 3 mm. (Untuk agar Mueller Hinton, kedalaman agar harus $4 \pm 0,5$ mm)
- f. Media yang diberi suplemen darah tidak boleh hemolisis
- g. Kontrol terhadap perubahan warna media yang diharapkan setelah ditumbuhi mikroorganisme tertentu
- h. Adanya Gelembung berlebihan atau permukaan plat

- i. Adanya kontaminasi
 - j. Adanya presipitasi
 - k. Integritas kemasan
 - l. Adanya cawan Petri/tabung reaksi yang pecah atau retak
 - m. Adanya kebocoran dari cawan Petri
 - n. Akurasi pelabelan
2. Verifikasi pH
 3. Cek sterilitasnya
 - a. Inkubasi media selama 48 jam pada 35-37°C (variasi dari 24 jam - 5 hari tergantung pada referensinya)
 - b. Jika membuat kurang dari 100 buah, maka kontrolnya diperiksa sebanyak 2%, jika lebih dari 100 buah maka diambil 10 plat secara random
 - c. Jika ada kasus kontaminasi maka harus membuat yang baru.
 - d. Jangan menggunakan ulang cawan patri yang sudah digunakan untuk
 - e. Perhatikan bahwa pemeriksaan isuela tambahan harus dilakukan sebelum digunakan
 4. Pemeriksaan kinerja
 - a. Gunakan organisme QC:
 - 1) Pilih organisme QC yang sesuai berdasarkan standar, pedoman atau
 - 2) Instruksi manufaktur
 - 3) Jenis organisme pengumpul kultur (misalnya ATCC) direkomendasikan tetapi sebelumnya
 - 4) Organisme klinis yang ditandai atau strain EQA yang terbukti stabil secara fenotip (diperlukan dokumentasi) juga diterima
 - b. Organisme QC harus dipelihara dan disimpan dengan benar
 - c. Gunakan suspensi standar untuk menginokulasi media kultur
 - d. Periksa dan catat pertumbuhan (ukuran koloni dan morfologi), selektivitas dan diferensiasi:

5. Kontrol kualitas secara menyeluruh
 - a. Harus didasarkan pada pendekatan pragmatis dan berbasis risiko
 - b. Melakukan QC untuk setiap batch yang baru disiapkan
 - c. Karantina media yang baru disiapkan dan dibagikan hingga lolos QC

F. Kesalahan Paling Umum dan Penyebabnya

Menurut Orekan *et al.*, tahun 2021, ada beberapa kesalahan yang sering terjadi pada pembuatan media kultur untuk mikrobiologi, diantaranya:

1. Penggumpalan media kultur yang mengalami dehidrasi
 - a. Kelembaban terlalu tinggi selama penyimpanan
 - b. Wadah dibiarkan terbuka terlalu lama
 - c. Wadah tidak tertutup rapat setelah dibuka
 - d. Media kultur mengalami dehidrasi melebihi umur simpan
2. pH salah
 - a. pH meter tidak dikalibrasi
 - b. Verifikasi pH dilakukan pada media yang terlalu panas (umumnya dilakukan pada suhu 25°C)
 - c. Panas berlebih, sterilisasi berlebihan, pencampuran heterogen, media disimpan pada suhu 50°C terlalu lama, pencairan ulang berulang kali atau pada suhu yang terlalu tinggi
 - d. Penggunaan air atau wadah berkualitas buruk
 - e. Penggunaan wadah yang terkontaminasi bahan kimia
 - f. Pelarutan/campuran medium tidak sempurna
 - g. Media dehidrasi disimpan secara tidak benar (misalnya tidak tertutup rapat) atau melebihi umur simpan
3. Kelarutan tidak sempurna
 - a. Penggunaan air yang tidak memadai
 - b. Pemanasan tidak tepat/waktu pelarutan tidak tepat
 - c. Perendaman kurang atau pencampuran tidak sempurna
 - d. Labu terlalu kecil untuk memungkinkan pencampuran dan/atau konveksi yang memadai

4. Media menjadi lebih gelap, karamelisasi
 - a. Panas berlebih: sterilisasi berlebihan, pencampuran heterogen, media disimpan pada suhu 50°C terlalu lama, pencairan ulang berulang kali atau pada suhu yang terlalu tinggi
 - b. Pembubaran medium tidak sempurna
5. Pembentukan gel atau agar-agar lunak yang tidak lengkap
 - a. Proporsi produk dengan air yang salah: kesalahan dalam penimbangan atau pengenceran berlebihan
 - b. Agar tidak larut dengan baik: pencampuran buruk, penyimpanan lama pada suhu 50°C
 - c. Media kultur terlalu panas, kemungkinan pada pH rendah
 - d. Peleburan berulang kali menyebabkan panas berlebih
6. Kekeruhan, curah hujan
 - a. Kualitas media dehidrasi yang buruk
 - b. Penggunaan air atau wadah yang berkualitas buruk
 - c. Panas berlebih, sterilisasi berlebihan, pencampuran heterogen, media disimpan pada suhu 50°C terlalu lama, diulangi meleleh kembali atau pada suhu yang terlalu tinggi
 - d. pH salah
 - e. Pelarutan/campuran medium tidak sempurna
 - f. Hilangnya air pada media budidaya yang disiapkan karena penguapan
7. Pertumbuhan yang buruk atau hilangnya diferensial properti
 - a. Organisme QC yang digunakan salah atau tidak dirawat dengan benar
 - b. Panas berlebih: sterilisasi berlebihan, pencampuran heterogen, media disimpan pada suhu 50°C terlalu lama, diulangi meleleh kembali atau pada suhu yang terlalu tinggi
 - c. Pelarutan/campuran medium tidak sempurna
 - d. Zat penghambat dalam air, wadah atau inokulum
 - e. pH salah

DAFTAR PUSTAKA

- Erkmen, O. (2021) 'Preparation of media and sterilization techniques', *Laboratory Practices in Microbiology*, pp. 3-18. Available at: <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91017-0.00004-4>.
- Orekan, J. *et al.* (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), pp. 1400-1408. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.05.016>.
- Sandle, T. (2011) 'History and development of microbiological culture media', *The Journal (Institute of Science and Technology)*, (April), pp. 10-14.
- Sukhorukov, V.S. (2021) 'Open Access Journal of Microbiology and Pathology Perspective Growth Media for Bacteria: Types of Culture Media Enriched Media', 5, p. 2021.
- Zimbro, M.J. *et al.* (2009) *Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media*, Citeseer. Available at: [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010316\)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010316)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C).

BAB

2

JENIS MEDIA MENURUT KOMPOSISI, BENTUK DAN FUNGSI

Siti Raudah, S.Si., M.Si

A. Pendahuluan

Nutrisi dalam media pertumbuhan harus mengandung semua elemen yang diperlukan untuk sintesis biologis organisme baru. Nutrisi diklasifikasikan menurut elemen yang harus dipenuhi adalah sumber karbon, sumber nitrogen, sumber sulfur, sumber fosfor, sumber mineral dan faktor pertumbuhan (Brooks *et al.*, 2007). Nutrisi adalah proses dimana zat kimia yang disebut nutrisi diperoleh dari lingkungan sekitar dan digunakan dalam aktivitas seluler seperti metabolisme dan pertumbuhan (Bhatia and Ichhpujani, 2008).

Media untuk budidaya mikroorganisme mengandung zat-zat yang diperlukan untuk mendukung pertumbuhan mikroorganisme. Karena keanekaragaman mikroorganisme dan jalur metabolisme yang beragam, maka diperlukan berbagai macam media. Bahkan sedikit perbedaan dalam komposisi posisi suatu media dapat mengakibatkan perbedaan karakteristik pertumbuhan mikroorganisme (Atlas, 2005). Dalam studi metabolisme mikroba, diperlukan persiapan media yang sepenuhnya sintetis dimana telah diketahui karakteristik dan konsentrasi yang tepat dari setiap bahan (Brooks *et al.*, 2007). Penting untuk mengikuti petunjuk produsen/merk dalam menyiapkan media. Bahan-bahan dalam media dilarutkan, kemudian disterilkan (Jorgensen, 2015).

Media kultur memiliki beberapa tujuan di laboratorium seperti mengisolasi strain mikroorganisme tertentu, mengidentifikasi patogen penyebab penyakit, menyiapkan kultur murni spesies mikroba, membedakan spesies bakteri, dan mempelajari respon mereka terhadap antibiotik tertentu. Sehingga, sebelum memutuskan media kultur mana yang akan digunakan, sangat penting untuk menentukan tujuan penelitian dalam beberapa kasus, jenis mikroorganisme yang ingin dipelajari. Hal ini akan memudahkan dan membantu memilih media mana yang terbaik untuk penelitian (Singh, 2022).

B. Prinsip Media

Prinsip media adalah kebutuhan nutrisi: media untuk budidaya bakteri secara rutin. Untuk memenuhi kebutuhan nutrisi bakteri yang beragam, ahli bakteriologi menggunakan dua kategori utama media untuk kultivasi rutin: media yang ditentukan secara kimiawi media yang didefinisikan secara kimiawi dan media kompleks.

1. Media yang Didefinisikan Secara Kimiawi

Media ini terdiri dari sejumlah senyawa organik dan/atau anorganik tertentu yang murni secara kimiawi dan spesifik. Penggunaannya membutuhkan pengetahuan tentang kebutuhan nutrisi spesifik organisme.

a. Kaldu sintesis anorganik: Ini sepenuhnya media anorganik ini dibuat dengan memasukkan memasukkan garam-garam berikut ini per 1000 ml air:

Sodium chlorida (NaCl)	5.0 g
Magnesium sulfate ($MgSO_4$)	0.2 g
Ammonium dihydrogen phosphate ($NH_4H_2PO_4$)	1.0 g
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	1.0 g
Atmospheric carbon dioxide (CO_2)	

Media ini dibuat secara eksklusif dari zat kimia murni, sehingga komposisi jumlah yang tepat dari setiap bahan kimia yang digunakan dapat diketahui.

- 1) Media sintetis sederhana, mengandung sumber karbon dan energi, seperti glukosa, atau laktosa, dan sumber anorganik amonium klorida, fosfat atau sulfat dan berbagai garam anorganik dalam larutan berair yang disangga. Media ini menyediakan kebutuhan dasar untuk pertumbuhan banyak heterotrof yang non *fastidious*, tetapi tidak akan mendukung pertumbuhan bakteri yang *fastidious*.
 - 2) Media sintetis yang kompleks, didalamnya terdapat asam amino, purin, pirimidin, dan faktor pertumbuhan yang lain (Sastry and Bhat, 2019).
- b. Kaldu garam glukosa: Media ini terdiri dari garam yang dimasukkan ke dalam anorganik media kaldu sintetis ditambah glukosa, 5 g per liter, yang berfungsi sebagai satu-satunya sumber karbon organik.

2. Media Kompleks

Komposisi kimia yang tepat dari media ini tidak diketahui. Media ini terbuat dari ekstrak tanaman dan jaringan hewan dan bervariasi dalam komposisi kimianya. Sebagian besar media ini mengandung asam amino, gula, vitamin, dan mineral, namun, jumlah konstituen ini tidak diketahui. Media ini mendukung pertumbuhan sebagian besar heterotrof. Ada dua media kompleks sebagai berikut:

- a. Kaldu nutrisi merupakan media kompleks dasar ini dalam per 1000 ml air suling terdapat Peptone 5.0 g dan Beef extract 3.0 g. Pepton, sebagai sumber nitrogen dan beef extract sebagai sumber karbon organik, nitrogen, vitamin, dan garam anorganik.
- b. Kaldu ekstrak ragi terdiri dari bahan dasar media buatan yang digunakan dalam kaldu nutrisi ditambah ekstrak ragi, 5 g per liter, yang kaya akan vitamin B dan memberikan tambahan nitrogen organik dan senyawa karbon. Kaldu ekstrak ragi digunakan menumbuhkan mikroorganisme yang *fastidious*. Bakteri ini tidak tumbuh atau tumbuh dengan buruk pada media buatan dasar, dan membutuhkan penambahan satu atau lebih pendukung

pertumbuhan, pengayaan seperti tanaman tambahan atau ekstrak hewan, vitamin, atau darah (Cappuccino and Chand Welsh, 2019).

C. Jenis Media Berdasarkan Komposisi

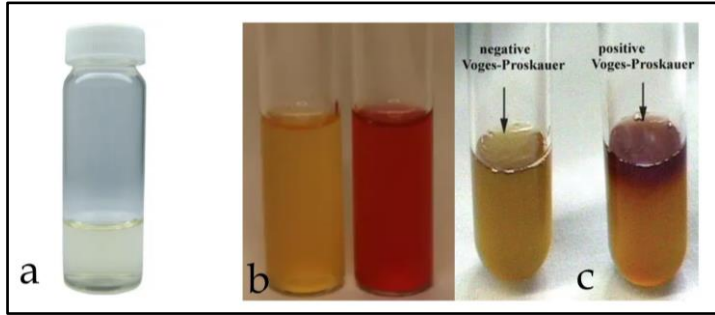
Media berdasarkan susunan kimia, terdapat berbagai jenis media yaitu:

1. Media anorganik merupakan media yang tersusun dari bahan anorganik, misalnya silika gel.
2. Media organik, merupakan media yang tersusun dari bahan organik.
3. Media sintetis merupakan media buatan dengan racikan tertentu, baik siap pakai maupun racikan sendiri.
4. Media non sintetis merupakan media alamiah, misalnya media wortel, media kentang dan lainnya (Kemenkes RI, 2014).

D. Jenis Media Berdasarkan Bentuk

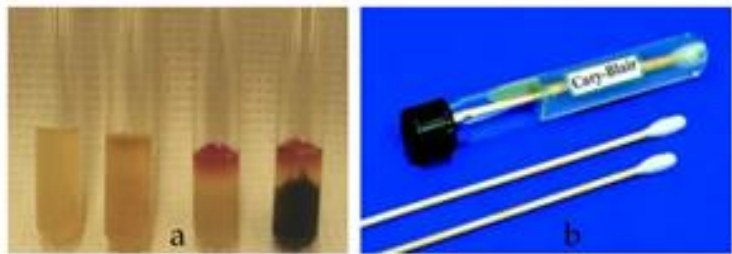
Media berdasarkan bentuk/konsistensinya, terdapat berbagai jenis media yaitu:

1. Media cair (liquid medium), yaitu media berbentuk cair (broth), media ini tidak mengandung zat pematat, seperti agar atau gelatin. Media cair juga disebut kaldu, media ini memungkinkan pertumbuhan strain bakteri yang seragam dan keruh saat diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Tankeshwar, 2022a). Media ini digunakan untuk melihat pertumbuhan mikroorganisme dan uji fermentasi (gambar 2,1). Contoh media ini adalah Alkaline pepton water, kaldu karbohidrat merah fenol, kaldu MR-VP, dan lainnya



Gambar 2. 1 (a) Alkaline Peptone Water (Tankeshwar, 2022a), (b) media MR (Tankeshwar, 2022h) dan (c) media VP (Dahal, 2023c)

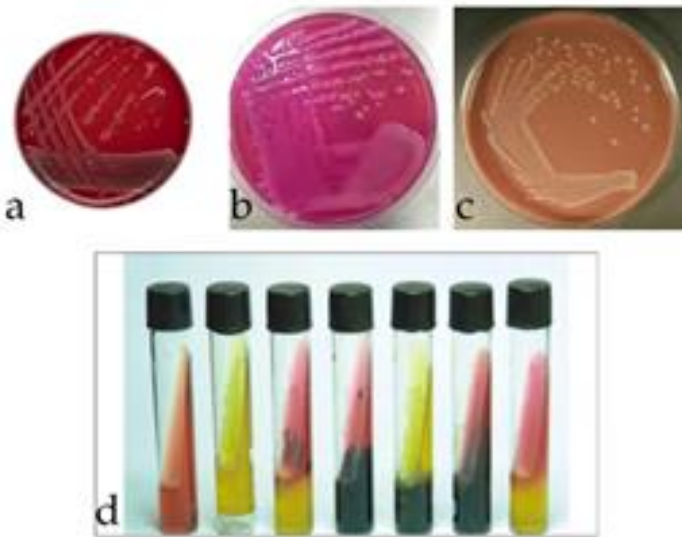
2. Media setengah padat (semi solid medium), Media ini memiliki konsentrasi agar 0,2-0,5%, dan karena konsentrasi agar yang berkurang, media ini tampak seperti zat lunak seperti jeli. Media ini digunakan untuk mempelajari motilitas mikroorganisme, membedakan strain bakteri motil dan non-motil, dan menumbuhkan bakteri mikroaerofilik (Tankeshwar, 2023a). Contoh media ini adalah SIM agar, Carry-Blair dan lainnya (gambar 2.2).



Gambar 2. 2 (a) Media Sulfur indole Motility (Tankeshwar, 2022j) dan (b) Cary-Blair (Tankeshwar, 2022c)

3. Media padat (solid medium), yaitu media bentuk padat dengan penambahan bahan pematat sekitar 1,5-2,0%. Media ini akan memadat pada suhu 37°C. Media ini digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme, menyiapkan kultur murni bakteri, atau mengisolasi bakteri untuk mempelajari karakteristik koloni (Tankeshwar, 2023a). Contoh media

padat adalah blood agar, McConkey, dan agar coklat, dan TSIA (gambar 2.3).



Gambar 2. 3 (a) Media Blood agar (Tankeshwar, 2022b), (b) Mac Conkey Agar (Tankeshwar, 2022g), (c) Chocolate agar (Tankeshwar, 2022d), dan TSIA (Dahal, 2023b)

Selain itu, ada juga media bifasik, yang terdiri dari media padat dan cair, kadang-kadang sebagai pengganti agar, kuning telur dan serum ditambahkan ke media sebagai zat pemat. Meskipun secara alami, zat-zat ini berbentuk cair, namun dipadatkan menggunakan panas, dan media yang sudah disiapkan disterilkan dengan menggunakan teknik inspusi. Contoh media ini adalah media Lowenstein Jensen dan media telur Dorset, yang mengandung kuning telur, dan lereng serum Loeffler, yang mengandung serum (gambar 2.4) (Rao, 2020).



Gambar 2. 4 Media Lowenstein Jensen (Rao, 2020)

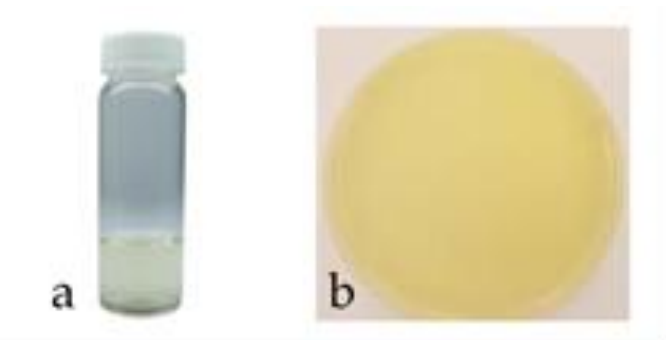
E. Jenis Media Berdasarkan Fungsi

Media berdasarkan fungsinya, terdapat berbagai jenis media yaitu:

1. Media Dasar/Sederhana

Media ini mengandung bahan minimum yang mendukung pertumbuhan bakteri *non fastidious* dan sebagai media dasar untuk persiapan banyak media lainnya. Media ini umumnya digunakan untuk mengisolasi mikroorganisme di laboratorium atau dalam proses subkultur. Contoh dari media dasar/ sederhana sebagai berikut:

- a. Air pepton: mengandung pepton (1%) + NaCl (0,5%) + Air
- b. Kaldu nutrisi terdiri dari air pepton + ekstrak daging (1%). Kaldu nutrisi digunakan untuk mempelajari kurva pertumbuhan bakteri. Nutrient agar merupakan media digunakan untuk melakukan uji biokimia, seperti oksidase, katalase, dan uji aglutinasi slide untuk mempelajari morfologi dan demonstrasi pigmen.
- c. Media semi padat dibuat dengan mengurangi konsentrasi agar menjadi 0,2 - 0,5%. Media semi padat digunakan untuk melihat motilitas bakteri, bakteri motil menyebar ke seluruh media semi padat, membuat media menjadi keruh (gambar 2.5) dan mempertahankan kultur stok (Sastri and Bhat, 2019).



Gambar 2. 5 (a) Media Alkaline Peptone Water (Tankeshwar, 2022a) dan (b) Nutrient Agar (Tankeshwar, 2023b)

2. Media pengaya (*enrichment*), merupakan media yang digunakan untuk memperbanyak bakteri. Media yang diperkaya adalah media yang telah dilengkapi dengan bahan bernutrisi tinggi, seperti darah, serum, atau ekstrak ragi, dengan tujuan menumbuhkan organisme yang sukar tumbuh.
 - a. Media Blood agar, darah yang dimasukkan ke dalam media sebagai bahan pengayaan untuk menumbuhkan organisme yang sukar tumbuh, seperti *Streptococcus* spp (Tankeshwar, 2022b). Berdasarkan sifat hemolitik pada media blood agar dapat dibedakan sebagai berikut:
 - 1) Hemolisis gamma, tidak terjadi lisis sel darah merah sehingga tidak menghasilkan perubahan dalam penampilan media yang mengelilingi koloni.
 - 2) Hemolisis alfa: Lisis yang tidak lengkap dari sel darah merah, dengan pengurangan hemoglobin menjadi methemoglobin, menghasilkan lingkaran cahaya kehijauan di sekitar pertumbuhan bakteri.
 - 3) Hemolisis beta: Lisis sel darah merah dengan penghancuran total dan penggunaan hemoglobin oleh mikroorganisme menghasilkan zona bening mengelilingi koloni. Hemolisis ini diproduksi oleh dua jenis hemolisin beta, yaitu streptolisin O - sebuah enzim antigenik, oksidatif enzim yang bersifat labil

secara genetik-dan streptolisin S, lisin yang tidak antigenik dan stabil terhadap oksigen. Reaksi hemolitik reaksi hemolitik ditingkatkan ketika darah lempeng agar digoreskan dan secara bersamaan ditusuk untuk menunjukkan hemolisis bawah permukaan oleh streptolisin O dalam lingkungan dengan pengurangan ketegangan oksigen. Berdasarkan hemolitik pola hemolitik pada agar darah, β - *Streptococcus* patogen, α - *Streptococcus* hemolitik patogen dapat dibedakan dari *Streptococcus* lainnya (gambar 2.6) (Cappuccino and Chand Welsh, 2019).



Gambar 2. 6 Tipe hemolisis pada media blood agar.

Pertumbuhan bakteri *Streptococcus pneumoniae* menunjukkan α -hemolisis, *Streptococcus pyogenes* menunjukkan β -hemolisis dan γ -hemolisis (Cappuccino and Chand Welsh, 2019)

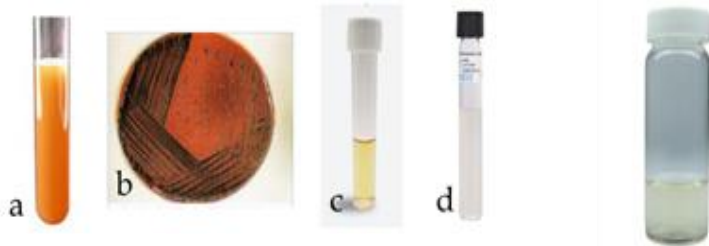
- b. Agar-agar coklat, adalah media yang diperkaya secara nonselektif yang digunakan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi patogen *fastidious* seperti spesies *Haemophilus* dan *Neisseria*. Dengan penambahan 5-10% darah domba ke dalam media, sehingga RBCs akan lisis dan kandungan RBCs akan terlepas, mengubah warna medium menjadi coklat (gambar 2.7) (Sastry and Bhat, 2019; Tankeshwar, 2022d).
- c. Löwenstein-Jensen (LJ) adalah media padat yang mengandung gliserol mendukung pertumbuhan *M. tuberculosis* sedangkan media LJ tanpa gliserol tetapi mengandung piruvat mendorong pertumbuhan *M. bovis*.

M. tuberculosis tumbuh dengan lambat dan membutuhkan waktu 3-6 minggu atau lebih lama untuk menghasilkan koloni berwarna krem (*buff*). Media Loeffler digunakan untuk isolasi mikroorganisme patogen *fastidious*, terutama dari hidung dan tenggorokan seperti *Corynebacterium diphtheriae* (gambar 2.7) (Tankeshwar, 2022f).



Gambar 2. 7 (a) *Haemophilus influenzae* pada media coklat and Chocolate agar slants (Tankeshwar, 2022d), (b) Loeffler medium (Aryal, 2022a) dan (c) Lowenstein Jensen (Tankeshwar, 2022f)

3. Media pengaya eksklusif, merupakan media yang dapat memperbanyak golongan bakteri sedangkan bakteri lainnya dihambat atau tidak dapat tumbuh. Media cair ini ditambahkan dengan beberapa penghambat yang secara selektif memungkinkan organisme tertentu untuk tumbuh dan menghambat yang lain. Hal ini penting untuk isolasi patogen dari spesimen klinis yang juga mengandung flora normal (misalnya spesimen feses dan sputum) (Sastry and Bhat, 2019). Contoh dari media ini adalah alkalis pepton water untuk *Vibrio* spp., Selenite broth/ Ravaport untuk *Salmonella* spp., Telurite broth untuk *Corynebacterium diphtheriae*., Geolity broth untuk *Staphylococcus aureus*, Tetrathionate broth untuk *Salmonella typhi* (gambar 2.8).

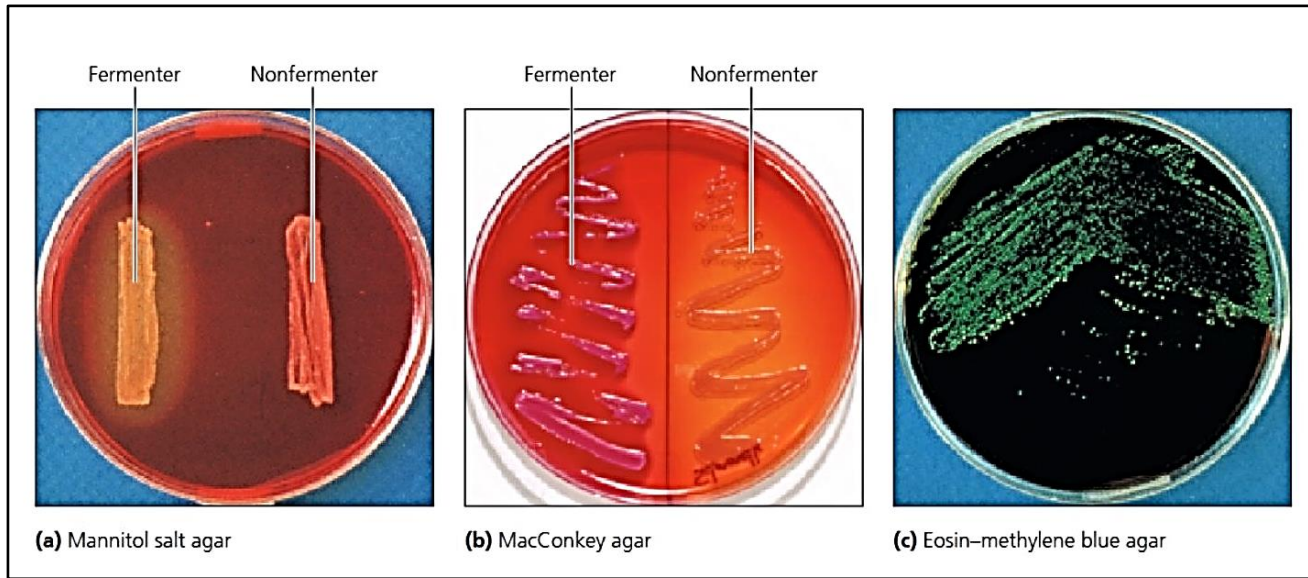


Gambar 2. 8 (a) Selenite broth (Aryal, 2022c), (b) Telurit blood agar (Burkovski LA, 2014), (c) Geolity broth (Bhatia and Ichhpujani, 2008), dan (d) Tetrathionate broth (Oxoid Limited, 2023)

4. Media differensial yaitu media ini dapat membedakan antara mikroorganismenya secara morfologi dan biokimia. Media ini menggabungkan senyawa kimia yang menghasilkan perubahan karakteristik pada pertumbuhan bakteri. Pertumbuhan bakteri dan/atau media yang mengelilingi koloni, yang memungkinkan diferensiasi. Terkadang karakteristik differensial dan selektif digabungkan dalam satu media (gambar 2.9). Contoh dari media differensial sebagai berikut:
 - a. Mannitol salt agar (MSA): Media ini mengandung konsentrasi garam yang tinggi, 7,5% NaCl, sehingga media ini menjadi media selektif. Karena sebagian besar bakteri tidak dapat tumbuh pada konsentrasi garam tinggi kecuali *Staphylococcus*. Media ini mengandung karbohidrat manitol, yang dapat difermentasi oleh beberapa, dan fenol merah, indikator pH untuk mendeteksi asam *Staphylococcus* yang dihasilkan oleh *Staphylococcus* yang memfermentasi manitol. *Staphylococcus* ini menunjukkan zona kuning di sekitar pertumbuhannya.
 - b. MacConkey agar, memiliki penghambatan dari kristal violet pada pertumbuhan gram positif organisme dan isolasi bakteri gram negatif. Penggabungan karbohidrat-laktosa, garam empedu, dan indikator pH merah netral memungkinkan diferensiasi enterik bakteri untuk

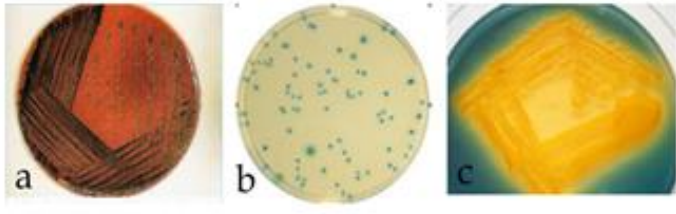
memfermentasi laktosa. Sehingga bakteri enterik dikelompokkan menjadi:

- 1) Bakteri coliform menghasilkan asam sebagai fermentasi laktosa. Bakteri menunjukkan koloni berwarna merah. *E. coli* menghasilkan asam dalam jumlah yang lebih besar dari laktosa dibandingkan dengan spesies coliform lainnya. Media yang mengelilingi pertumbuhan bakteri menjadi merah muda, karena aktivitas asam yang mengendapkan garam empedu, diikuti oleh penyerapan warna merah netral.
 - 2) Disentri, tifus, dan paratifus basil bukan merupakan fermentor laktosa, sehingga tidak menghasilkan asam. Koloni-koloni terlihat warna cokelat dan transparan.
- c. Agar eosin-metilen biru terdapat Laktosa dan pewarna eosin dan metilen biru, memungkinkan diferensiasi antara enterik fermentor laktosa dan non-fermentor sebagai serta identifikasi bakteri usus besar (*E. coli*). Koloni *E. coli* berwarna biru kehitaman dengan kilau hijau metalik yang disebabkan oleh asam yang diproduksi dan mengendapkan pewarna ke permukaan koloni. Bakteri coliform lainnya, *Enterobacter aerogenes*, menghasilkan koloni yang tebal, koloni berlendir dan berwarna merah muda pada media ini. Bakteri enterik yang tidak memfermentasi laktosa menghasilkan koloni yang tidak berwarna atau transparansi (Cappuccino and Chand Welsh, 2019).



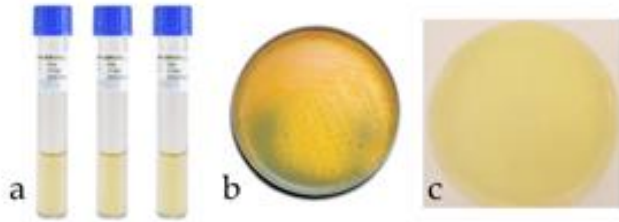
Gambar 2. 9 Media differensial (Cappuccino and Chand Welsh, 2019)

5. Media eksklusif, merupakan media yang hanya dapat ditumbuhi segolongan bakteri, sedangkan bakteri yang lain tidak tumbuh dan dapat membedakan antara koloni spesies satu dengan yang lain (Kemenkes RI, 2014). Contoh: Blood Tellurite plate untuk *Corynebacterium diphtheriae*, Azide agar untuk *Enterococcus* spp. dan TCBS untuk *Vibrio cholerae* (gambar 2.10).



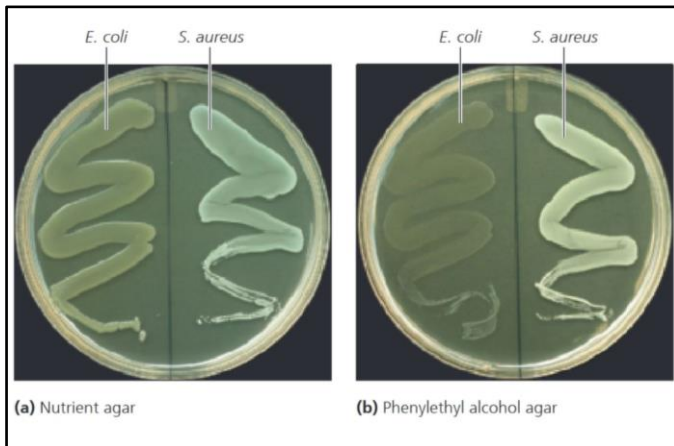
Gambar 2. 10 Media Blood Tellurite plate (Burkovski LA, 2014), TBX (Jorgensen, 2015) dan TCBS (Singh, 2022)

6. Media universal yaitu media yang dapat ditumbuhi oleh hampir semua jenis bakteri (gambar 2.11). Contoh dari media universal sebagai berikut:
- a. Kaldu Brain Heart Infusion (BHI) adalah media cair serbaguna yang digunakan untuk menumbuhkan dan pemeliharaan berbagai macam mikroorganisme, termasuk bakteri aerobik dan anaerobik, ragi, dan jamur dari berbagai spesimen klinis dan non-klinis (Rijal, 2022b).
 - b. Tryptose Soy Agar (TSA) adalah media yang menyediakan nutrisi yang cukup untuk memungkinkan berbagai macam mikroorganisme tumbuh (Aryal, 2022d).
 - c. Nutrient Agar (NA), digunakan sebagai media serbaguna untuk menumbuhkan berbagai macam mikroorganisme (Tankeshwar, 2023b).

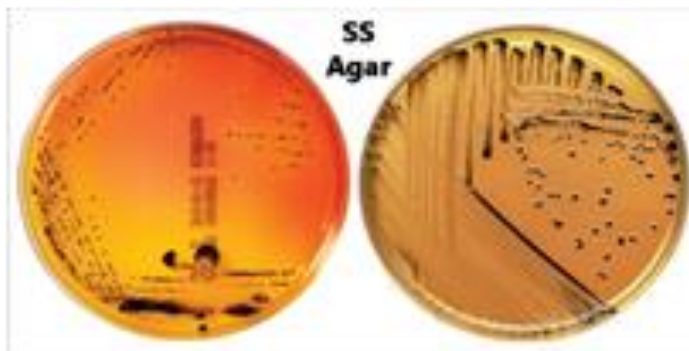


Gambar 2. 11 Media Brain Heart Infusion (BHI) (Rijal, 2022b), Tryptose Soy Agar (TSA) (Aryal, 2022d), dan media nutrient agar (Fatima, 2022)

7. Media Selektif yaitu media yang digunakan untuk membedakan golongan bakteri dari satu satu dengan yang lain, sehingga dapat dipilih koloni yang diinginkan. Media ini digunakan untuk memilih (mengisolasi) kelompok bakteri tertentu. Penggabungan bahan kimia zat kimia yang menghambat pertumbuhan satu jenis bakteri sementara memungkinkan pertumbuhan bakteri lain, sehingga memudahkan isolasi bakteri (Kemenkes RI, 2014). Pertumbuhan selektif mikroba ditentukan dengan menambahkan zat-zat seperti antibiotik, pewarna, garam empedu, atau dengan penyesuaian pH (Rao, 2020).
 - a. Agar fenil etil alkohol, media ini digunakan untuk isolasi sebagian besar gram positif organisme. Fenil Etil alkohol sebagian penghambatan terhadap organisme gram negatif, yang dapat membentuk koloni yang terlihat yang ukurannya dan jumlahnya jauh lebih kecil daripada yang lain media. Contoh penggunaan fenil etil alkohol agar, mampu menghambat bakteri gram negatif *Escherichia coli* dan menumbuhkan bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* (gambar 2.12).
 - b. Salmonella-shigella Agar, yaitu media yang dapat mengisolasi Salmonella dan beberapa spesies Shigella dari spesimen klinis dan non-klinis (gambar 2.13) (Aryal, 2022b).



Gambar 2. 12 Pertumbuhan *E. coli* dan *S. aureus* pada media nutrient agar dan fenil etil alkohol (Cappuccino and Chand Welsh, 2019)



Gambar 2. 13 Pertumbuhan bakteri *Salmonella typhimurium* dan *Shigella flexneri* (koloni dengan titik hitam menunjukkan bakteri *Salmonella*) (Leboffe and Pierce, 2011)

- c. Mac Conkey agar, media yang membedakan bakteri gram negatif berdasarkan fermentasi laktosa. Bakteri fermentasi laktosa, seperti *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Citrobacter sp.*, dan *Enterobacter sp.* membentuk koloni berwarna merah jambu-merah, sedangkan bakteri non-fermentasi laktosa, seperti *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, dan *Morganella*

membentuk koloni berwarna pucat atau tidak berwarna (gambar 2.14) (Singh, 2022).

- d. XLD agar, media yang dapat mengisolasi dan membedakan *Salmonella* dan *Shigella*. Media ini juga menghambat patogen enterik lainnya dan membedakan bakteri enterik Gram-negatif berdasarkan fermentasi xilosa, dekarboksilasi lisin, dan produksi hidrogen sulfida dari natrium tiosulfat. Xilosa difermentasi dengan cepat oleh sebagian besar bakteri enterik Gram negatif, termasuk *Salmonella*. Hal ini menyebabkan pengasaman media, mengubah indikator merah fenol menjadi kuning. Karena *Shigella* spp tidak menggunakan xilosa, pengasaman tidak terjadi, dan koloni menjadi merah (Rijal, 2022e).

Setelah xilosa habis, *Salmonella* spp mendekarboksilasi lisin, meningkatkan pH menjadi basa, dan menghasilkan koloni merah seperti *Shigella* spp. *Salmonella* juga melakukan metabolisme tiosulfat untuk menghasilkan hidrogen sulfida, ditandai dengan pembentukan koloni dengan bagian tengah berwarna hitam (gambar 2.15). Organisme yang memfermentasi laktosa, sukrosa, dan xilosa tetapi lisin dekarboksilase negatif menyebabkan pH asam dan menghasilkan koloni berwarna kuning (Rijal, 2022e).



Gambar 2. 14 Pertumbuhan bakteri gram negatif pada media mac conkey agar. *Escherichia coli* dan *Enterobacter aerogenes* memproduksi warna pink menghasilkan asam dari fermentasi laktosa. *Shigella sonnei* dan *Proteus mirabilis* non laktosa fermenter (Leboffe and Pierce, 2011)



Gambar 2. 15 Media XLD, kiri: koloni *Salmonella typhimurium* berwarna merah muda berpusat hitam dan kanan: koloni *Shigella* sp. berwarna merah muda (Rijal, 2022e)

8. Media transport, yaitu media yang digunakan untuk mengirimkan spesimen klinis ke laboratorium, apabila terjadi penundaan atau jarak yang jauh untuk menjaga kelangsungan hidup patogen potensial dan untuk mencegah pertumbuhan komensal atau mikroorganisme yang mengkontaminasi secara berlebihan (gambar 2.16). Beberapa di antaranya media ini memiliki konsistensi semi-padat (Rao, 2020). Contoh dari media transport sebagai berikut
- a. Carry-Blair untuk sampel feses/rectal swab, untuk meningkatkan kelangsungan hidup patogen bakteri enterik (Fatima, 2022). Media ini mengandung nutrisi minimal untuk memfasilitasi kelangsungan hidup organisme tanpa perbanyakan. pH basa medium meminimalkan kerusakan bakteri akibat pembentukan asam (Tankeshwar, 2022c).
 - b. Stuart atau Amies dengan charchoal untuk sekret genital, isolasi *Neisseria* spp (Fatima, 2022). Media ini berupa media semi padat yang banyak digunakan dan efektif untuk transportasi spesimen usap ke laboratorium mikrobiologi. Media amies dengan charchoal membantu menghilangkan produk metabolisme pertumbuhan bakteri, yang mungkin sangat berguna dalam mengisolasi organisme yang sukar tumbuh (Rijal, 2022d).

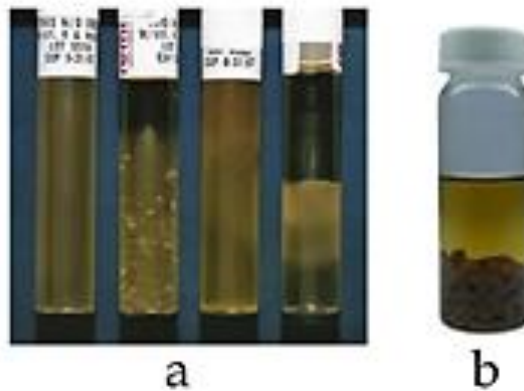


Gambar 2. 16 Media Cary-Blair (Tankeshwar, 2022c) dan media transport amies (Rijal, 2022a).

9. Media anaerobik, merupakan media untuk menumbuhkan bakteri anaerobik. Bakteri ini membutuhkan media khusus untuk pertumbuhannya karena membutuhkan kandungan oksigen yang rendah, potensi pengurangan oksidasi yang berkurang, dan nutrisi ekstra (gambar 2.17). Media untuk

anaerob dilengkapi dengan nutrisi seperti hemin, dan vitamin K. Sebelum digunakan, media harus direbus dalam penangas air untuk mengeluarkan oksigen terlarut dan kemudian ditutup dengan parafin cair steril (Tankeshwar, 2023a). Contoh dari media anaerobic sebagai berikut:

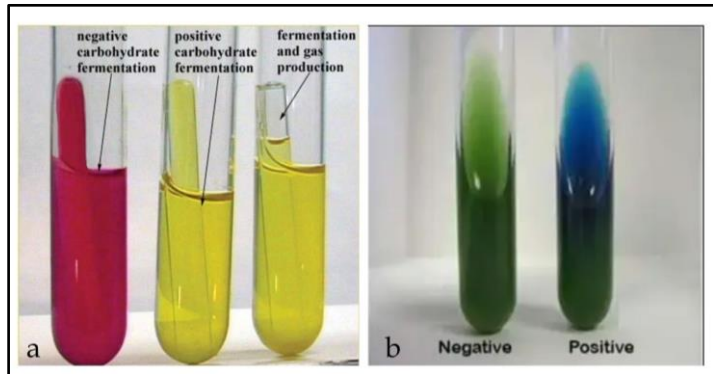
- a. Kaldu thioglikolat adalah kaldu pengayaan yang paling sering digunakan dalam bakteriologi diagnostik, mendukung pertumbuhan anaerob, aerob, mikroaerofilik, dan mikroorganisme yang sukar tumbuh. Suplemen agar ini dan adanya zat pereduksi asam thioglikolat menciptakan lingkungan anaerobik yang lebih dalam di dalam tabung yang memungkinkan bakteri anaerobik tumbuh (Rijal, 2022c).
- b. Media Robertson Cooked Meat (RCM), digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme aerobik, mikroaerofilik, dan anaerob, terutama spesies *Clostridium* spp. Media ini mendukung pertumbuhan anaerob obligat pembentuk spora dan non-spora, serta membedakan spesies pembusuk dan sakarolitik (Tankeshwar, 2022i).



Gambar 2. 17 (a) Karakteristik pertumbuhan bakteri pada media thioglycollate broth (Rijal, 2022c), dan (b) Robertson's Cooked Meat Medium (Tankeshwar, 2022i)

10. Media identifikasi, merupakan media yang digunakan untuk menentukan jenis bakteri, biasanya menggunakan beberapa

jenis media penguji (gambar 2.18). Contoh: Media karbohidrat: glukosa, laktosa, manitol, dll; Media dekarboksilasi: Lysin, Arginin, Ornitin, dll dan Media karbon: Simon's Citrat Agar (Kemenkes RI, 2014).



Gambar 2. 18 Media fermentasi karbohidrat (Dahal, 2023a) dan media simon's citrat agar (Tankeshwar, 2022e)

DAFTAR PUSTAKA

- Aryal, S. (2022a) *Loeffler Medium: Composition, Principle, Preparation, Results, Uses, Microbe Notes*. Available at: <https://microbenotes.com/loeffler-medium/> (Accessed: 1 January 2022).
- Aryal, S. (2022b) *Salmonella Shigella (SS) Agar- Composition, Principle, Preparation, Results, Uses, Microbe Notes*. Available at: <https://microbenotes.com/salmonella-shigella-ss-agar/> (Accessed: 6 January 2022).
- Aryal, S. (2022c) *Selenite F Broth: Composition, Principle, Preparation, Results, Uses, Microbe Notes*.
- Aryal, S. (2022d) *Tryptic Soy Agar: Composition, Principle, Preparation, Results, Uses, Microbe Notes*. Available at: <https://microbenotes.com/tryptic-soy-agar/> (Accessed: 7 January 2022).
- Atlas, R.M. (2005) *Handbook Of Media for Environmental Microbiology*. 2nd edn. United States of America: Taylor & Francis Group; CRC Press.
- Bhatia, R. and Ichhpujani, R.L. (2008) *Essentials Of Medical Microbiology*. 4th edn. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.
- Brooks, G.F. et al. (2007) *Medical Microbiology*. 24th edn. United State of America: Mc Graw Hill Lange. Available at: <https://doi.org/10.1036/0071476660>.
- Burkovski LA, E. (2014) *Corynebacterium diphtheriae and Related Toxigenic Species: Genomics, Pathogenicity and Applications*. Bayern : Germany: Springer.
- Cappuccino, J.G. and Chand Welsh (2019) *Microbiology A Laboratory Manual*. Twelfth Edi, Pearson. Twelfth Edi. New York.

- Dahal, P. (2023a) *Carbohydrate Fermentation Test (Sugar Fermentation Test)*, *Microbe Notes*. Available at: <https://microbenotes.com/carbohydrate-fermentation-test/> (Accessed: 13 April 2023).
- Dahal, P. (2023b) *TSIA Test: Principle, Media, Procedure, Results, Uses*, *Microbe Notes*. Available at: <https://microbenotes.com/triple-sugar-iron-agar-tsia-test/>.
- Dahal, P. (2023c) *VP Test: Principle, Reagents, Procedure, Results, Uses*, *Microbe Notes*. Available at: <https://microbenotes.com/voges-proskauer-vp-test/>.
- Fatima, A. (2022) *Microbial Culture Media- Definition, Types, Examples, Uses*. Available at: <https://microbenotes.com/types-of-culture-media/#application-of-culture-media> (Accessed: 21 January 2021).
- Jorgensen, J.H. (2015) *Manual of Clinical Microbiology*. Edited by J.H. Jorgensen, Pfaller, Michael A., and K.C. Carroll. American Society For Microbiology (ASM) Press.
- Kemenkes RI (2014) *Prosedur Pemeriksaan Bakteriologi Klinik, Direktorat Jenderal Bina Upaya Kesehatan*. Jakarta.
- Leboffe, M.J. and Pierce, B.E. (2011) *A Photographic Atlas For The Microbiologi Laboratory*. 4 th, *Paper Knowledge . Toward a Media History of Documents*. 4 th. Colorado: Douglas N. Morton.
- Oxoid Limited (2023) 'Tetrathionate Broth Base', *Thermo Fisher Scientific Inc.* [Preprint]. Thermo Fisher Scientific. Available at: http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0337&c=UK&lang=EN&org=&print=N.
- Rao, S. (2020) *Bacterial culture media*. microrao. Available at: https://www.microrao.com/micronotes/pg/culture_media.pdf.
- Rijal, N. (2022a) *Amies Transport Medium, Microbe Online*. Available at: <https://microbeonline.com/amies-transport-medium/>.

- Rijal, N. (2022b) *BHI Broth: Composition, Preparation, Uses, Microbe online*. Available at: <https://microbeonline.com/brain-heart-infusion-bhi-broth-composition-preparation-and-uses/>.
- Rijal, N. (2022c) *Thioglycollate broth: Composition, Principle, and Uses, Microbe Online*. Available at: <https://microbeonline.com/thioglycollate-broth/>.
- Rijal, N. (2022d) *Transport Media Used in Microbiology Lab, Microbe Online*. Available at: <https://microbeonline.com/transport-medium-bacterial-viral-sample-transport-used-microbiology-laboratory/> (Accessed: 27 September 2022).
- Rijal, N. (2022e) *XLD Agar: Composition, Principle, Results, and Uses, Microbe Online*. Available at: <https://microbeonline.com/xylose-lysine-deoxycholate-xld-agar-composition-preparation-results-uses/> (Accessed: 5 November 2022).
- Sastry, A.S. and Bhat, S. (2019) *Essentials of Medical Microbiology*. 2nd edn. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Lt.
- Singh, A. (2022) *Culture Media: Classification, Types, and Relevance, Microbiology Science*. Available at: <https://conductscience.com/culture-media/#:~:text=Liquid media are also called,VP broth%2C and nutrient broth.> (Accessed: 24 February 2022).
- Tankeshwar, A. (2022a) *Alkaline Peptone Water (APW): Composition, Preparation, and Uses, Microbe Online*. Available at: <https://microbeonline.com/alkaline-peptone-water-apw-principle-preparation-uses/>.
- Tankeshwar, A. (2022b) *Blood Agar and Types of Hemolysis, Microbe Online*. Available at: <https://microbeonline.com/blood-agar-composition-preparation-uses-and-types-of-hemolysis/> (Accessed: 5 November 2022).

- Tankeshwar, A. (2022c) *Cary-Blair transport medium: Composition, Preparation, Uses, Microbe Online*. Available at: <https://microbeonline.com/cary-blair-transport-medium-composition-preparation-uses/>.
- Tankeshwar, A. (2022d) *Chocolate Agar: Composition, Preparation, Uses, Microbe Online*. Available at: <https://microbeonline.com/chocolate-agar-composition-uses-colony-characteristics/> (Accessed: 5 November 2022).
- Tankeshwar, A. (2022e) *Citrate Utilization Test: Principle, Procedure, Results • Microbe Online, Microbe Online*. Available at: <https://microbeonline.com/citrate-utilization-test/>.
- Tankeshwar, A. (2022f) *Löwenstein–Jensen (LJ) Medium: Preparation, Uses, Microbe Online*. Available at: <https://microbeonline.com/preparation-uses-lowenstein-jensen-lj-medium/>.
- Tankeshwar, A. (2022g) *MacConkey Agar: Composition, Uses, Colony Characteristics, Microbe Notes*. Available at: <https://microbeonline.com/macconkey-agar-mac-composition-preparation-uses-and-colony-characteristics/> (Accessed: 5 November 2022).
- Tankeshwar, A. (2022h) *Methyl Red (MR) Test: Principle, procedure and results, Microbe Online*. Available at: <https://microbeonline.com/methyl-red-mr-test-principle-procedure-results/>.
- Tankeshwar, A. (2022i) *Robertson's Cooked Meat (RCM) Medium, Microbe Online*. Available at: <https://microbeonline.com/robertsons-cooked-meat-medium-principle-composition-procedure-and-uses/>.
- Tankeshwar, A. (2022j) *Sulfide Indole Motility (SIM) Medium: Principle, Procedure, and Results, Microbe Online*. Available at: <https://microbeonline.com/sulfide-indole-motility-sim-medium/>.

Tankeshwar, A. (2023a) *Bacterial Culture Media: Classification, Types, Uses, Microbe online*. Available at: <https://microbeonline.com/types-of-bacteriological-culture-medium/> (Accessed: 13 September 2023).

Tankeshwar, A. (2023b) *Nutrient Agar: Composition, Preparation, Uses, Microbe Online*. Available at: <https://microbeonline.com/nutrient-agar-composition-preparation-uses/>.

BAB 3

STERILISASI DAN DESINFEKSI

Yulita Maulani, S.Tr.Kes., M.Kes

A. Pendahuluan

Sterilisasi laboratorium merupakan faktor penting untuk menghindari kesalahan positif akibat kontaminasi. Sterilisasi adalah proses atau kegiatan pelepasan materi atau benda segala bentuk kehidupan. Sterilisasi dapat diartikan sebagai suatu cara untuk memusnahkan mikroorganisme, termasuk yang berbentuk spora. Desinfeksi merupakan suatu proses yang bertujuan untuk memusnahkan organisme penyebab penyakit, namun tidak dapat menghilangkannya dalam bentuk spora. Desinfeksi melibatkan pembunuhan mikroorganisme penyebab penyakit dengan menggunakan bahan kimia atau fisika, yang dapat mengurangi risiko infeksi dengan membunuh mikroorganisme penyebab penyakit. Dapat digunakan disinfektan yang tidak membahayakan permukaan tubuh dan bahan tersebut disebut antiseptik.

Sterilisasi : Semua proses (kimia dan fisik) yang mematikan semua bentuk hidup terutama mikroorganisme.

Desinfeksi : Proses membunuh organisme-organisme patogen (kecuali spora kuman) dengan cara fisik atau kimia; dilakukan terhadap benda mati.

Desinfektan : Zat yang dipakai dalam proses desinfeksi.

Antisepsi : Mencegah pertumbuhan atau aktivitas mikroorganisme baik dengan cara menghambat

atau membunuh; dipakai untuk zat-zat kimia terhadap jaringan hidup.

Antiseptik : Zat kimia yang dipakai dalam proses antiseptik.

B. Macam-Macam Sterilisasi

Sterilisasi yang baik dapat mencegah tumbuhnya mikroba lain yang tidak diharapkan dalam bahan yang telah disterilisasi. Teknik sterilisasi yang digunakan berbeda antara satu dengan lainnya, tergantung dari jenis material yang digunakan. Alat-alat yang digunakan dalam praktikum harus dalam keadaan steril atau bebas dari kuman serta bakteri, virus dan jamur.

Sterilitas merupakan syarat mutlak keberhasilan pekerjaan di laboratorium mikrobiologi. Dalam melaksanakan sterilisasi diperlukan teknik agar proses sterilisasi dapat terlaksana dengan sempurna, dalam artian tidak ada mikroorganisme lain yang mencemari lingkungan. Teknik sterilisasi ada beberapa macam, yaitu cara fisik dengan menggunakan panas, cara mekanis dengan menggunakan filtrasi, dan cara kimia dengan menggunakan senyawa kimia. Membersihkan benda atau permukaan tubuh akan menurunkan jumlah bakteri sehingga mengurangi risiko infeksi.

Pada prinsipnya sterilisasi dapat dilakukan dengan tiga cara yaitu mekanis, fisika dan kimia. Sterilisasi mekanis (filtrasi) menggunakan filter dengan pori-pori yang sangat kecil (0,22 mikron atau 0,45 mikron) sehingga bakteri tetap tertahan pada filter. Proses ini dimaksudkan untuk mensterilkan bahan yang peka terhadap panas, misalnya larutan enzim dan antibiotik. Sterilisasi fisik dapat dilakukan dengan pemanasan dan penyinaran. Teknik pemanasannya meliputi pembakaran (pembakaran langsung). Panas kering dilakukan dalam oven dengan suhu sekitar 60-180°C. Sterilisasi panas kering cocok untuk peralatan gelas, misalnya Erlenmeyer, tabung reaksi, dll. Pengukusan air panas dilakukan dengan menggunakan bahan hidrofilik. Penggunaan cara ini sebaiknya dilakukan untuk menghindari dehidrasi. Uap panas bertekanan menggunakan autoklaf. Penyinaran sinar UV, sinar ultraviolet juga dapat

digunakan untuk proses sterilisasi, misalnya membunuh bakteri yang menempel pada permukaan bagian dalam lemari pengaman dengan penyinaran sinar UV. Sterilisasi kimia biasanya menggunakan senyawa disinfektan, termasuk alkohol.

1. Sterilisasi dengan Metode Fisika

a. Pemanasan

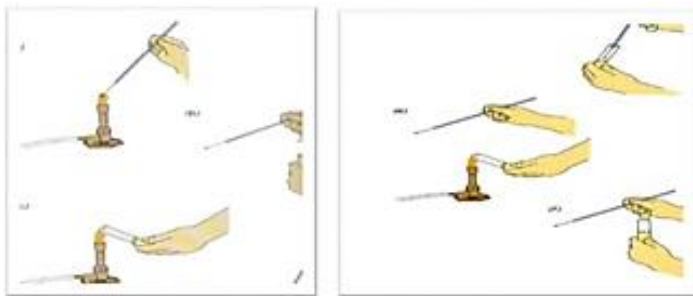
1) Pemijaran

Cara ini dilakukan dengan memanaskan suatu alat, biasanya berbentuk jarum inokulum (ohse), di atas api bunsen hingga ujung ohse menyala pijar. Pemijaran merupakan cara sterilisasi yang paling efektif 100%. Dengan menggunakan cara ini semua bentuk hidup akan dimatikan.



Gambar 3. 1 Sterilisasi Pemijaran Ose

2) Pembakaran



Gambar 3. 2 Sterilisasi Cara Pembakaran

Pembakaran peralatan logam atau kaca dilakukan dengan cara membakarnya langsung di atas api bunsen, namun tidak sampai menyala. Contoh:

- a) Melewatkan mulut tabung kultur bakteri melalui nyala bunsen;
 - b) Panaskan pisau di atas api unggun sebelum digunakan;
 - c) Panaskan pinset sebelum memasukkan cakram antibiotik ke dalam cawan petri tempat bakteri dibiakkan untuk menguji sensitivitas antibiotik.
- 3) Sterilisasi Dengan Udara Panas Kering

Alat-alat yang akan disterilkan dengan cara ini, ditempatkan di dalam oven dimana suhunya mencapai 160°C dan 180°C . Pada suhu ini, kerusakan akan terjadi pada sel dan jaringan hidup; Ini karena oksidasi otomatis memungkinkan pembakaran bakteri patogen. Dalam sistem pemanas kering terdapat udara; Diketahui bahwa udara merupakan penghantar panas yang buruk, sehingga sterilisasi dengan metode pemanasan kering memerlukan waktu yang cukup lama, rata-rata 45 menit. Pada suhu 160°C dibutuhkan waktu 1 jam, sedangkan pada suhu 180°C dibutuhkan waktu 30 menit. Metode pemanasan kering biasa digunakan untuk mensterilkan pipet, tabung reaksi, kapas, jarum bedah, spuit, dan ampul. Karena suhu tinggi sangat mempengaruhi ketajaman jarum atau gunting, maka menghindari sterilisasi dengan menggunakan panas kering untuk jarum dan gunting. Sterilisasi dengan udara panas ini baik dipergunakan untuk mensterilkan alat-alat gelas seperti piring petri, pipet, tabung reaksi, labu dan sebagainya.



Gambar 3. 3 Alat Sterilisasi Oven

4) Sterilisasi Pemanasan Basah

Konsep sterilisasi ini mirip dengan mengukus. Bahan yang mengandung air lebih tepat menggunakan metode ini agar menghindari terjadinya dehidrasi.



Gambar 3. 4 Alat Sterilisasi Autoklaf

Benda yang akan dibersihkan diletakkan pada pelat saringan dan tidak langsung menyentuh air di bawahnya. Pemanasan dilakukan hingga air mendidih (perkiraan suhu sekitar 100°C), pada tekanan 15 lb suhu mencapai 121°C. Organisme yang tidak membentuk spora dapat dibunuh hanya dalam waktu 10 menit. Banyak spora yang hanya dapat mati jika dipanaskan pada suhu hingga 100°C selama 30 menit, namun beberapa spora dapat bertahan pada suhu ini selama beberapa jam. Spora yang mampu bertahan selama 10 jam pada suhu 100°C dapat dimusnahkan hanya dalam waktu 30 menit jika ditambahkan air mendidih yang mengandung natrium karbonat (Na_2CO_3). Autoclave/autoklaf merupakan alat yang mensterilkan berbagai macam alat dan bahan dengan menggunakan tekanan 15 psi (1,02 atm) dan suhu 121°C. Suhu dan tekanan tinggi yang diterapkan pada instrumen dan kendaraan yang memerlukan sterilisasi memberikan daya bunuh sel yang lebih besar dibandingkan udara panas.

Biasanya, untuk mensterilkan media, digunakan suhu hingga 121°C dan tekanan 15 lb/in² (SI = 103,4 Kpa) selama 15 menit. Alasan menggunakan suhu 121°C atau 249,8°F adalah karena air mendidih pada suhu 121°C jika digunakan tekanan 15 psi. Untuk tekanan 0 psi pada ketinggian permukaan laut (sea level) air mendidih pada suhu 100°C, perlu diingat bahwa peristiwa ini berlaku pada permukaan laut. Jika laboratorium berada pada ketinggian tertentu, maka perlu diatur ulang pengaturan tekanan. Misalnya autoklaf terletak pada ketinggian 2700 kaki di atas permukaan laut, maka tekanan dinaikkan menjadi 20 psi hingga mencapai suhu 121°C untuk merebus air. Semua bentuk kehidupan akan mati jika direbus pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 15 menit. Bila sumber panas dihidupkan maka air dalam autoklaf

akan mendidih dan uap yang terbentuk akan mendorong keluar udara yang masuk ke dalam autoklaf. Setelah seluruh udara dalam autoklaf digantikan dengan uap, uap akan keluar atau katup udara ditutup sehingga tekanan udara di dalam autoklaf meningkat. Ketika tekanan dan suhu yang sesuai tercapai, sterilisasi dimulai pada waktu dan penghitungan dimulai. Setelah sterilisasi selesai, sumber panas dimatikan dan tekanan dibiarkan turun perlahan hingga mencapai 0 psi. Jangan membuka autoklaf sampai tekanan mencapai 0 psi. Di Dalam autoklaf yang mensterilkan adalah panas basah, dan bukan tekanannya. Oleh karena itu, setelah air di dalam tangka mendidih dan mulai membentuk uap air, maka uap air ini akan dialirkan ke ruang pensteril guna mendesak keluar semua udara didalamnya.

Autoklaf manual cara penggunaannya harus diperhatikan karena ketinggian air yang harus dijaga dalam autoklaf. Sterilisasi dengan autoklaf manual tidak bisa dibiarkan dalam waktu lama. Steamer manual bila suhu mencapai 121°C setelah 15 menit, jika tidak dimatikan suhu akan terus meningkat, air bisa habis dan bisa meledak. Pada autoklaf digital alat ini dapat diatur suhunya hingga 121°C selama 15 menit. Ketika suhu tercapai, suhu akan otomatis turun hingga 50°C dan tetap stabil pada suhu tersebut. Jika digunakan untuk mensterilkan media bakteri, suhu tersebut sesuai karena untuk membuat media memerlukan suhu 50 hingga 700°C.

Untuk mendeteksi autoklaf yang berfungsi sempurna, kita dapat menggunakan bakteri uji termofilik yang dilengkapi dengan endospora, khususnya *Bacillus stearothermophilus*, biasanya bakteri ini tersedia secara komersial dalam bentuk strip spora. Kertas strip spora ini dimasukkan ke

dalam autoklaf dan disterilkan. Setelah proses sterilisasi dikultur pada medium, jika medium tetap bening berarti sterilisasi autoklaf berfungsi dengan baik.

5) Insinerator

Ini merupakan cara sterilisasi yang 100% efektif. Bahan menular seperti jarum bekas disimpan dalam kotak biohazard dan disterilkan dalam insinerator. Pemanasan hingga 8700-9800°C menghasilkan polutan berupa asap atau debu. Hal inilah yang menjadi kelemahan metode sterilisasi ini. Namun, metode ini dapat memastikan bahwa bahan infeksius dapat dibuang dengan benar, hal yang tidak dapat dilakukan dengan metode lain. Insinerator juga bisa dilakukan terhadap bangkai binatang percobaan yang mati.

6) Metode sterilisasi dengan pemanasan tyndalisy

Mengambil dari hasil penelitian John Tyndall (1877) bahwa pada suhu perebusan (100°C) selama 1 jam, tidak dapat membunuh sebanyak lima kali dan setiap kali air mendidih dibiarkan selama 1 menit akan menghasilkan sangat efektif untuk membunuh kuman.

b. Radiasi

Radiasi ionisasi dipakai untuk mensterilkan instrumen plastik seperti kateter, jarum suntik plastik, atau sarung tangan sebelum dipakai. Contoh radiasi pengion adalah metode gelombang mikro, yang menggunakan panjang gelombang pendek dan sinar gamma berenergi tinggi.



Gambar 3. 5 Biology Safety Cabinet

2. Sterilisasi dengan Cara Kimia

Metode sterilisasi ini biasanya menggunakan larutan kimia yang terdiri dari alkohol 96% atau sulfur dioksida dan klorin. Metode ini melibatkan pembersihan terlebih dahulu perangkat yang akan didesinfeksi dan kemudian merendamnya dalam larutan kimia selama 24 hingga jam. Bahan kimia yang baik adalah bahan kimia yang mampu membunuh bakteri dengan cepat dalam dosis rendah tanpa merusak bahan atau peralatan yang disterilkan.

Uap formaldehida atau hidrogen peroksida digunakan untuk mensterilkan filter HEPA pada BSC. Glutaraldehida bersifat sporisida, artinya membunuh spora bakteri dalam waktu 3 hingga 10 jam pada peralatan medis karena tidak merusak lensa, karet, dan logam, seperti instrumen endoskopi.

3. Sterilisasi dengan Cara Mekanik

Sterilisasi mekanis penyaringan berbeda dengan metode pemanasan. Sterilisasi metode pemanasan dapat membunuh mikroorganisme, namun Sedangkan mikroorganisme yang mati masih tertinggal di dalam bahan Sterilisasi dengan metode filtrasi hanya menghidupkan

mikroorganisme dipisahkan dari bahannya. Sterilisasi mekanis (filtrasi) menggunakan filter yang pori-porinya sangat kecil (0,22 mikron atau 0,45 mikron) sehingga bakteri tertahan pada filter. Proses ini dimaksudkan untuk mensterilkan bahan yang peka terhadap panas, misalnya larutan enzim dan antibiotik.

Metode ini juga dapat digunakan untuk mensterilkan bahan yang peka terhadap panas seperti isotop radioaktif dan bahan kimia beracun. Proses filtrasi cairan menggunakan prinsip melewatkan larutan melalui membran selulosa asetat atau selulosa nitrat. Filtrasi udara menggunakan udara partikulat efisiensi tinggi (HEPA) untuk menyaring organisme yang berukuran lebih dari 0,3 μm pada biosafety cabinet (BSC).

C. Macam-macam Desinfeksi

Desinfeksi adalah proses membunuh organisme-organisme patogen (kecuali spora kuman) dengan cara fisik atau kimia; dilakukan terhadap benda mati. Desinfeksi juga diartikan sebagai proses pengaplikasian bahan kimia (desinfektan) terhadap peralatan, lantai, dinding dan lainnya untuk membunuh sel vegetatif mikrobial. Desinfeksi diaplikasikan pada benda dan hanya berguna untuk membunuh sel vegetatif saja, tidak mampu membunuh spora.

1. Desinfeksi Dengan Cara Fisika

a. Merebus/boiling

Merebus bahan yang akan disterilkan pada suhu 100°C selama 10-15 menit. Boiling dapat membunuh sel vegetatif bakteri yang patogen maupun yang non patogen. Akan tetapi spora dan beberapa virus masih dapat hidup. Biasanya dilakukan pada instrumen kedokteran gigi, spuit, pipet dll.

b. Pasteurisasi

Proses pembunuhan mikroba patogen dengan suhu 65°C selama 30 menit atau 72°C selama 15 detik untuk membunuh bakteri patogen dan bakteri penyebab

pembusukan saja. Teknik ini biasa dilakukan untuk susu, rum, anggur, dan makanan asam lainnya.

c. Radiasi

Mikroba bentuk vegetatif dapat terbunuh dengan penyinaran ultraviolet dan sinar-sinar ionisasi (sinar X, sinar alfa, sinar beta, sinar gamma). Penggunaan radiasi non-ionisasi seperti ultraviolet (UV) memiliki panjang gelombang yang panjang dengan low energy. Misalnya pada sterilisasi bakteri di permukaan BSCs, 30 menit sebelum menggunakan BSCs, sinar UV dinyalakan terlebih dahulu.

2. Desinfeksi Metode Kimiawi

Desinfeksi adalah membunuh mikroorganisme penyebab penyakit dengan desinfektan dapat berupa bahan kimia. Disinfektan dapat membunuh mikroorganisme patogen pada benda mati. Disinfektan dibedakan menurut kemampuannya membunuh beberapa kelompok mikroorganisme, disinfektan “tingkat tinggi” dapat membunuh virus seperti virus influenza dan herpes, tetapi tidak dapat membunuh virus polio, hepatitis B atau M. tuberculosis. Macam-macam disinfektan:

a. Alkohol

Merupakan zat paling efektif dan dapat diandalkan untuk sterilisasi dan desinfeksi. Alkohol mendenaturasi protein dengan jalan dehidrasi dan juga melarutkan lemak. Oleh karena itu membran sel akan rusak dan enzim akan diinaktifkan oleh alkohol. Konsentrasi alkohol yang paling sering digunakan adalah alkohol 70-80% dalam air. Konsentrasi di atas 90% atau dibawah 50% biasanya kurang efektif. Kecuali isopropil alkohol yang masih tetap efektif sampai konsentrasi 99%.

b. Logam berat

Logam berat yang umum dipakai adalah Hg, Ag, As, Zn, dan Cu. Raksa (Hg) dulunya menjadi disinfektan populer yang sering dipakai, namun karena menimbulkan bahaya bagi lingkungan dan dapat

diinaktifkan oleh bahan organik olehnya penggunaan raksa sudah jarang. Senyawa Hg organik efektif untuk mengobati luka-luka kecil (ringan) dan sebagai preservative di dalam serum dan vaksin.

c. Aldehida

Glutaraldehida adalah disinfektan yang populer dalam pengobatan gigi baik secara tunggal atau kombinasi. Aldehida adalah disinfektan yang kuat. Alat yang tidak dapat disterilkan dapat didisinfeksi dengan glutaraldehid ditutup dengan kain kasa steril dan dibersihkan. Karena dapat mengiritasi kulit/selaput lendir, pengguna harus melakukannya menggunakan masker, kacamata dan sarung tangan tebal. Solusi glutaraldehid efektif melawan bakteri vegetatif seperti *M. tuberculosis*, jamur, dan virus mati dalam 10-20 menit sedangkan spora baru mati dalam 10 jam.

d. Formaldehid

Formaldehida adalah disinfektan yang baik bila digunakan sebagai gas. Zat ini sangat efektif pada area tertutup sebagai agen melawan penyakit bakteri dan jamur. Formaldehida dalam larutan cair sekitar 37% disebut formalin.

e. Hidrogen Peroksida

Zat ini memiliki sifat antiseptik yang moderat karena kekuatan oksidasinya. Zat ini sangat tidak stabil tetapi umum terjadi digunakan untuk membersihkan luka, terutama luka dalam yang organisme aerobik mungkin bisa masuk.

Disinfektan yang dipakai pada kulit dikenal dengan antiseptik. Antiseptik adalah bahan yang dipakai dalam membunuh mikroba yang menempel pada jaringan hidup, contohnya pada kulit. Mekanisme kerja dari antiseptik sebagian besar adalah menghambat pertumbuhan dari mikroba (bakteriostatik) namun dapat juga membunuh bakteri (bakterisidal).

DAFTAR PUSTAKA

- Brown, A.E., dan Smith, H. (2017). *Microbiological Applications*. Mc-Graw-Hill Education. New York
- Dwidjoseputro. (2010). *Dasar Mikrobiologi*. Penerbit Djembatan. Jakarta.
- Indrie, Wahyuni. (2020). *Dasar-dasar Praktikum Mikrobiologi*. Penerbit Pena Persada. Jawa Tengah
- Lestari, Lily Arsant. (2019). *Dasar-Dasar Mikrobiologi Makanan di Bidang Gizi dan Makanan*. Yogyakarta:UGM Press.
- Pujiati. (2019). *Buku Ajar Mikrobiologi Umum*. IKIP PGRI Madiun. Madiun
- Sumarsih. (2011). *Mikrobiologi Umum*. UI Press. Jakarta
- Tille, P. M. (2017). *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. In *Basic Medical Microbiology (fourteenth, p. 45)*. St. Louis Missouri: Elsevier.
- Welsh, C. (2019). *Microbiology a Laboratory Manual*. Pearson. New York
- Yusmaniar., Wardiyah., dan Nida. K. (2017). *Mikrobiologi dan Parasitologi*. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia

BAB 4

CARA PEMBUATAN MEDIA

Emma Ismawatie, S.ST., M.Kes

A. Pendahuluan

Media merupakan bahan pertumbuhan dan suatu bahan yang mempunyai komposisi campuran dari berbagai nutrisi dan zat-zat hara (Nutrien) yang dapat digunakan untuk membiakkan mikroorganisme baik untuk mengukur jamur, bakteri dan juga mikroorganisme lainnya. Secara umum sel bakteri terdiri atas bermacam bentuk, umumnya bakteri bereproduksi dengan cara membelah diri, yaitu menjadi dua sel mempunyai ukuran yang sama, dalam pelaksanaan suatu praktikum untuk membiakkan bakteri dibutuhkan media agar supaya untuk tempat pertumbuhannya (Waluyo, 2010).

Selain untuk membiakkan mikroorganisme, media tersebut dapat digunakan untuk mengisolasi, menguji sifat fisiologis dan menghitung jumlah mikroorganisme. Persyaratan yang harus diperhatikan untuk menyiapkan media atau media agar mikroorganismenya bisa tumbuh dan berkembang dengan baik yaitu:

1. Harus berisi semua nutrisi atau gizi yang mudah digunakan untuk tumbuh mikroba
2. Harus memiliki suatu tekanan osmosis, tegangan bagian depan atau permukaan dan pH yang sesuai.
3. Tidak memuat zat-zat yang menghambat
4. Harus steril.

Komposisi media butuh ketepatan terkait pada keperluan spesies yang akan ditumbuhkan dikarenakan kebutuhan nutrisinya sangat berbeda-beda (bervariasi). Media yang digunakan pada praktikum mikrobiologi bermacam-macam, bisa dibuat secara alami atau manual, bisa juga dengan membeli yang sudah kemasan jadi (Dwijoseputro, 2010).

Sesuai komposisi kimiawi komponen yang digunakan penyusun media bisa dibedakan menjadi dua kategori, yaitu:

1. Media kompleks (Complex)

Media ini tersusun oleh bahan-bahan yang macam dan susunan yang segalanya tidak diketahui pasti. Contohnya media kompleks: media Nutrien Agar (NA) yang mengandung beef ekstrak dan pepton.

2. Media Sintetik.

Media sintetik ini tersusun dengan bahan-bahan kimia murni, tetapi diketahui macam dan komposisinya. Contohnya: media yang digunakan untuk menumbuhkan Escherichia Coli yang mengandung komponen-komponen seperti ini, dalam gram/liter yaitu: Glukosa (1,0); NH_2PO_4 (16,4); KH_2PO_4 (1,5); $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ (2,0); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2); CaCl_2 (0,01); dan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,0005).



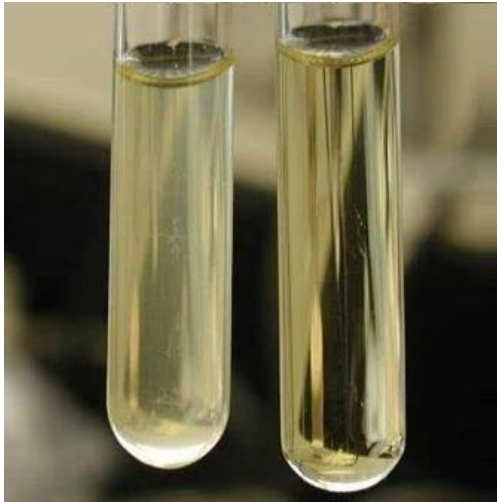
Gambar 4. 1 Media dalam Botol Kemasan

B. Media Dibedakan Menjadi 3 Berdasarkan Konsistensinya

Media yang digunakan untuk perkembangan mikroorganisme dan media adalah suatu bahan yang berisi berbagai nutrisi/gizi yang bisa membantu menumbuhkan suatu bakteri.

1. Media Cair

Media cair (liquid, broth) hanya mengandung nutrisi-nutrien yang langsung dilarutkan menggunakan aquades, ada contoh media cair yaitu: Nutrient Broth (NB), Laktose Broth (LB), Glukosa Broth (GB) dan lain-lainnya. Media ini bisa digunakan untuk memperbanyak (propagasi) suatu mikroorganisme yang dalam jumlah banyak atau besar, juga uji fermentasi, dan beberapa uji lainnya.



Gambar 4. 2 Media Nutrien Broth dalam tabung reaksi

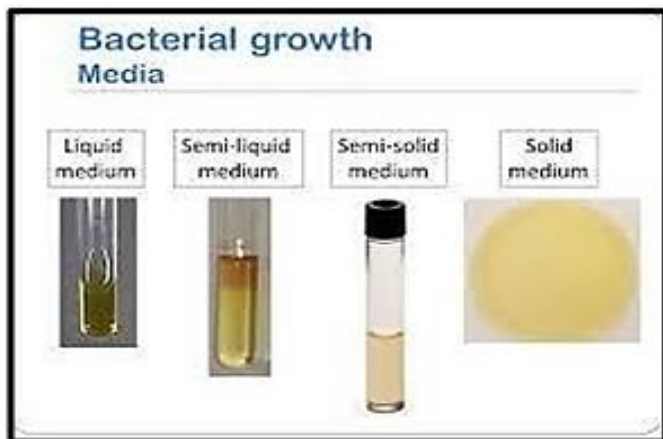
2. Media Padat

Media padat disebut juga media solid, yaitu media yang 15% mengandung agar sehingga pada waktu dingin akan menjadi padat, misalnya media NA (Nutrien Agar), media padat dapat digunakan untuk bakteri, ragi, jamur dan bahkan juga untuk mikroba, media padat ada tiga jenis yaitu: media tegak, media miring dan media lempeng.

3. Media Semi Padat

Media agar semi padat hampir sama dengan media yang padat hanya konsentrasi dari bahan pematatnya (agar atau gelatin) dalam jumlah lebih dikurangi atau sedikit sehingga konsistensinya semi padat seperti jeli, media ini mengandung agarnya 0,3-0,4% tidak padat dan tidak cair, media semi padat dibuat mempunyai tujuan supaya pertumbuhan bakteri bisa menyebar ke seluruh media, dan tidak mengalami pencampuran sempurna jika digoyang.

Media ini juga bertujuan untuk mencegah atau menekan difusi oksigen, misalnya: pada media Nitrat Broth (Varghese, 2014)



Gambar 4. 3 Media Cair, Semi Solid, dan Media Solid

C. Karakteristik dan Persyaratan Media

Karakteristik dari media kultur yang cocok untuk mengembangkan suatu mikroorganisme untuk inokulasi yang kecil dan untuk sel yang Tunggal, karakteristik lainnya bisa menumbuhkan mikroorganisme dengan cepat, media kulturnya mudah dipersiapkan dan murah, mudah didapat juga dapat untuk memperagakan karakteristik yang diinginkan (Varghese, 2014)

D. Cara Pembuatan Media

Segala bentuk kehidupan suatu mikroba atau mikroorganisme di dalam siklus hidupnya memerlukan media atau lingkungan yang sesuai untuk tumbuh dan berkembang secara optimal. Komposisi nutrisi yang dibutuhkan oleh organisme untuk berkembang disebut media kultur, tahapan pembuatan media sebagai berikut:

1. Pencampuran Bahan-Bahan Media

Membuat media dengan cara melarutkan semua bahan menggunakan aquades di urutan dari pembuatannya dan dipanaskan sampai semua bahan larut. Jika dalam proses pelarutan bahan-bahan yang digunakan aquadesnya menguap berkurang, sebelum disterilkan bisa ditambahkan aquades sesuai resep, dalam pencampuran dan pelarutan dilakukan dengan mengaduk terus dan dijaga jangan sampai meluap.



Gambar 4. 4 Penimbangan, Pemanasan dan Pelarutan Media

2. Penyaringan Medium

Ada beberapa jenis media yang membutuhkan penyaringan menggunakan kertas saring atau kain yang tipis seperti kasa.

3. Pengukuran dan Pengaturan pH

Media ada yang membutuhkan nilai pH tertentu dan diperlukan pengaturan pH dengan ditambahkan larutan NaOH atau HCL, lalu ditambahkan dengan HCL jika didapatkan pHnya terlalu tinggi, penambahan pH besar digunakan HCL 1 N, sedangkan perbedaan pH kecil digunakan HCL 0,1 N dan jika didapatkan pHnya terlalu rendah penambahannya menggunakan NAOH. Diaturnya pH bisa dilakukan sebelum dilakukan sterilisasi.

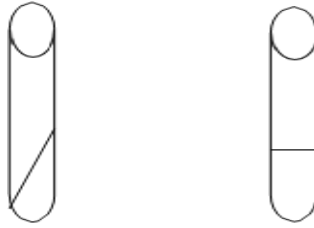
4. Pemakaian Antibiotik

Perlu ditambahkan antibiotik agar mencegah tumbuhnya mikroorganisme lain yang belum diketahui, contohnya penambahan asam kloramfenik untuk mencegah pertumbuhan bakteri pada saat budidaya jamur. Pencampuran antibiotik bisa dilakukan sebelum atau sesudah dilakukan sterilisasi tergantung apakah antibiotik tersebut bisa tahan panas atau tidak.

5. Memasukan Media ke dalam Suatu Wadah Atau Tempat Tertentu

Pada tahap ini sterilisasi harus dilakukan dengan tabung atau Erlenmeyer yang bersih, bebas dari debu dan kotoran. Untuk pembuatan agar-agar miring dan vertikal, Anda dapat menggunakan tabung reaksi berukuran kurang lebih 5-6 ml (miring) dan 7-8 ml (vertikal); untuk labu erlenmeyer dibuat media yang dituangkan ke dalam cawan petri. Jumlah volume media yang akan disterilkan ke dalam labu Erlenmeyer jangan melebihi besar dari 2 per 3 volume labu Erlenmeyer agar media tidak tumpah di dalam labu Erlenmeyer.

Dikarenakan prinsip sterilisasi yaitu dengan menggunakan uap panas yang bertekanan, sumbat tabung dan Erlenmeyer menggunakan kapas dan tahan panas, maka sumbat musti menutup wadah dengan rapat dan kuat, namun bisa mudah dibuka. Sumbat harus menutup wadah hingga kuat dan rapat tetapi masih bisa dibuka.



Gambar 4. 5 Tampilan Media Padat Miring dan Tegak

6. Sterilisasi Media

Untuk sterilisasi media dapat dilakukan dengan beberapa macam cara tergantung macam dan jenisnya media, cara yang paling sering dengan menggunakan autoclave yang prinsipnya autoclave uap panas yang bertekanan (tekanannya 1 atm; suhu 121 °C dalam waktu 15 menit). Langkah lain menggunakan pasteurisasi yaitu media yang mengandung bahan-bahan tidak panas tinggi, untuk mengecek media yang disterilisasi tidak ada kontaminasi, media didiamkan dalam semalam sebelum dipakai, media yang mungkin terkontaminasi tidak bisa di sterilkan dua kali karena akan merusak mediana.

7. Penyimpanan Media

Media yang sudah dibuat dan sudah disterilkan mungkin tidak digunakan langsung, alangkah baiknya disimpan pada refrigerator (lemari es), jika media disimpan pada suhu kamar dalam jangka lama cenderung hilang kelembabannya (dehidrasi), mudah terkontaminasi (Aini, 2015).



Gambar 4. 6 Proses Penuangan Media

Media umumnya untuk digunakan menumbuhkan mikroorganisme di laboratorium seperti misalnya bakteri menggunakan media Nutrien Agar (NA) yang merupakan suatu media padat, dibuat dari campuran ekstrak daging dan pepton dan agar sebagai pematat. (Jayanti, 2014) Berikut cara pembuatan media alami:

1. Media Potato Dekstrosa Agar (PDA)

a. Bahan:

Kentang 200 g
Dekstrosa 10 g
Agar-agar 15 g
Aquades 1000 ml

b. Cara membuatnya:

Kentang dicuci dan dikupas bersih dan dipotong-potong kecil-kecil (2x2cm) kemudian direbus dengan aquades 500 ml, selama satu setengah sampai dua jam, lakukan penyaringan menggunakan kain tipis sehingga didapatkan larutan bening ekstrak kentang, ditambahkan dekstrose, agar, panaskan sambil diaduk homogen dan tambah aquades didapatkan volume 1000 ml, sterilkan dengan autoclave 121°C selama 15 menit atau dengan panci presto mendidih selama 20 menit (Shilmy, 2017).

2. Media menggunakan bahan penyedap rasa

a. Bahan:

Glukosa 3 g
Monosodium Glutamat 1 g
Agar - agar 1,5 g
Aquades 100 ml

b. Cara membuatnya:

Masukkan bahan- bahan pada wadah erlenmeyer besar panaskan sampai semua bahan terlarutkan dan sterilkan dengan autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit atau menggunakan panci presto mendidih selama 20 menit (Satrah, 2014).

3. Media wortel agar

a. Bahan:

Wortel 100 gr
CaSO₄ 2 gr
Agar-agar 4 gr
Aquadess 200 ml

b. Cara pembuatannya:

Wortel digiling atau bisa juga dengan diparut dihancurkan, ditambahkan aquades 200 ml dan dipanaskan sampai mendidih selama 10 menit, tambahkan aquades yang menguap selama pemanasan, kemudian disaring dengan kain dan ditambahkan Kalsium sulfat (CaSO₄), panaskan sampai mendidih dan larut, kemudian masukkan pada erlenmeyer atau tabung dan sterilisasi menggunakan autoclave 121° selama 15 menit, atau menggunakan panci presto mendidih selama 20 menit (Rahayu, 2014)

4. Media taoge cair

a. Bahan

Tauge 100 gr
Sukrosa 60 gr
Aquadess 1000 ml

b. Cara pembuatannya:

Tauge direbus dengan aquades sampai mendidih kurang lebih 1-2 jam, kemudian dilakukan penyaringan dan ditambahkan sukrosa, dipanaskan sampai mendidih lagi sampai semua sukrosanya larut dan tambahkan aquades yang hilang saat terjadi penguapan sampai volume menjadi 1000 ml, masukkan pada tabung, kemudian sterilkan dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit atau panci presto mendidih selama 20 menit.

5. Media taoge agar

Bahan dan cara pembuatan taoge hampir sama dengan taoge cair, yaitu menambahkan agar-agar 1,5-2%. Agar-agar

yang digunakan bisa berupa agar-agar bubuk (bola terendam). Supplementasi dilakukan dengan sukrosa.

DAFTAR PUSTAKA

- Aini, N. 2015. Media Alternatif untuk Pertumbuhan Jamur Menggunakan Sumber Karbohidrat yang Berbeda. Naskah Publikasi. Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta
- Dwijoseputro D (2010). Dasar-dasar Mikrobiologi. Jakarta: Djambatan
- Jayanti, U. (2014). " Pembuatan Media dan Inokulasi Bakteri." Journal UIN ISTEK, 12 (2), 39-48.
- Khaeruni, A dan V. N. Satrah. 2014. Penuntun Praktikum Mikrobiologi Dasar.Fakultas Pertanian UHO. Kendari
- Rahayu, T., Ardhi, M. W., Dan Tyastuti, E. M. 2014. Modul Praktikum Mikrobiologi. Surakarta : Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Shilmy, S.P. 2017. Air Cucian Beras (*Oryza sativa* L.) Sebagai Media Agar Alternatif Pengganti PDA (Potato Dextrose Agar) Terhadap Pertumbuhan Jamur *Candida albicans*. Skripsi. Jurusan Analis Kesehatan Politeknik Kesehatan Kemenkes Surabaya, Surabaya.
- Varghese, Navena and P.P Joy. Microbhiology Laboratory Manual.Kerala: Kerala Agricultural University; 2014
- Varghese, Navena and P.P Joy. Microbiology Laboratory Manual. Kerala: Kerala Agricultural University; 2014.
- Waluya,L. (2010). *Teknik dan Metode Dasar Dalam Mikrobiologi*.UMM PRESS.MALANG

BAB 5

FAKTOR YANG MEMPENGARUHI KUALITAS DAN CARA MENGUJI KUALITAS MEDIA

Eva Runi Khristiani, S.Si., MT

A. Pendahuluan

Media adalah suatu substansi yang sudah diatur komposisinya yang digunakan untuk menumbuhkan dan mempelajari sifat-sifat suatu bakteri, media pertumbuhan kuman atau mikroorganisme adalah suatu bahan yang terdiri atas campuran nutrisi yang digunakan oleh suatu mikroorganisme untuk tumbuh dan berkembangbiak. Komposisi nutrisi yang akan digunakan oleh organisme untuk pertumbuhannya disebut medium kultur, sementara upaya untuk menumbuhkan organisme disebut sebagai kultur. Media kultur digunakan sebagai *gold standard* untuk penegakan diagnosa pada suatu penyakit infeksi. Media kultur digunakan sebagai *gold standard* penegakan diagnosa pasti suatu penyakit infeksi. Keterlambatan dalam penegakan diagnosa penyakit infeksi dapat mengakibatkan peningkatan insiden kesakitan, bahkan insiden kematian. Media kultur selain dapat dipergunakan sebagai gold standar penegakan diagnosa, juga dapat dipergunakan untuk isolasi, pengujian sifat fisiologis, dan perhitungan jumlah mikroorganisme (Atmanto, Asri and Kadir, 2022).

Mikroorganisme memanfaatkan nutrisi yang disediakan dari media berupa molekul-molekul yang selanjutnya dirakit untuk menyusun komponen sel dan memperbanyak diri sehingga sel-sel tersebut dapat dimanfaatkan. Dengan adanya

media pertumbuhan dapat dilakukan isolasi mikroorganisme menjadi kultur tunggal dan juga memanipulasi mikroorganisme yang didapatkan untuk kepentingan tertentu. kultur media merupakan substansi dengan kadar tertentu dalam bentuk cair, setengah padat atau padat yang mengandung bahan alami dan atau buatan untuk mendukung perkembangbiakan mikroorganisme(Hamzah, 2023)

Media kultur bervariasi dalam bentuk dan komposisi tergantung pada jenis pada jenis spesies yang dikembangkan. Dari media kultur tersebut, maka dapat diidentifikasi mikroorganisme. Identifikasi mikroorganisme dari media kultur dapat diperiksa dengan mikroskop cahaya dengan terlebih dahulu dilakukan pembuatan pulasan bakteri tanpa pewarnaan atau dengan pewarnaan. Media kultur yang baik, yaitu media kultur yang mudah disiapkan, murah, mudah dibuat, dan mudah diaplikasikan (Anisah and Rahayu, 2015)

Dalam bidang mikrobiologi untuk menumbuhkan dan mempelajari sifat-sifat mikroorganisme diperlukan suatu media sebagai tempat pertumbuhan mikroorganisme. Media pertumbuhan harus memenuhi persyaratan nutrisi yang dibutuhkan oleh suatu mikroorganisme. Nutrisi yang dibutuhkan mikroorganisme untuk pertumbuhannya meliputi karbon, nitrogen, unsur non logam seperti sulfur dan fosfor, unsur logam seperti Ca, Zn, Na, K, Cu, Mn, Mg, dan Fe, vitamin, air, dan energy, Pembiakan mikroorganisme dalam laboratorium memerlukan medium yang berisi zat hara serta lingkungan pertumbuhan yang sesuai dengan mikroorganisme. Zat hara digunakan oleh mikroorganisme untuk pertumbuhan, sintesis sel, keperluan energy dalam metabolisme dan pergerakan. Lazimnya, medium biakan berisi air, sumber energi zat hara sebagai sumber karbon, nitrogen, sulfur, fosfat, oksigen, hidrogen serta unsur-unsur sekelumit (trace element). Dalam bahan dasar medium dapat pula ditambahkan faktor pertumbuhan berupa asam amino, vitamin atau nukleotida (Hafsan and Hafsan, 2011)

Faktor-faktor yang mempengaruhi kualitas media yang baik untuk pertumbuhan adalah sebagai berikut:

1. Mempunyai semua nutrisi yang mudah digunakan oleh organisme.
2. Mengandung sumber energi yang diperoleh dari oksidasi bahan organik yang terkandung dalam media tersebut seperti karbohidrat dan protein.
3. Bahan-bahan tambahan yaitu bahan yang ditambahkan ke media dengan tujuan tertentu, bahan tambahan tersebut misalnya phenol red (indikator asam basa) ditambahkan untuk indikator perubahan pH akibat produksi asam organik hasil metabolisme. Antibiotik ditambahkan untuk menghambat pertumbuhan mikroba non-target/kontaminan
4. Mempunyai tekanan osmosis, tegangan permukaan dan derajat keasaman (pH) yang sesuai.
5. Tidak mengandung zat-zat yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang dikehendaki
6. Steril dan terlindung dari kontaminasi

B. Bahan-Bahan Media Pertumbuhan

Media biakan disusun untuk tujuan utamanya adalah memberikan suatu campuran dengan syarat zat gizi yang berimbang dan pada konsentrasi yang dapat memungkinkan pertumbuhan yang baik. Medium yang seluruhnya terdiri dari zat gizi yang ditentukan secara kimiawi disebut medium sintesis. Medium yang berisi bahan-bahan kimia yang komposisinya tidak diketahui disebut medium kompleks. Mikroorganisme sama dengan organisme pada umumnya yaitu untuk kelangsungan hidupnya membutuhkan nutrisi untuk pertumbuhan, sintesis sel, keperluan energi dalam metabolisme, dan pergerakan. Nutrisi tersebut dapat diperoleh dari media. Umumnya media mengandung air, sumber energi, nitrogen, sulfur, fosfat, oksigen, hidrogen serta unsur kelumit (trace mineral). Media ini dapat pula ditambahkan faktor pertumbuhan berupa asam amino, vitamin atau nukleosida (Hafsan, 2014)

1. Sumber Nutrisi

Analisa dari komposisi kandungan unsur sel mikroorganisme menunjukkan lebih dari 95% dari berat kering terdiri dari unsur utama (*major elements*) yaitu unsur C, O, H, N, S, P, K, Na, Ca, Mg, dan Fe. Jika suatu jenis mikroorganisme ingin ditumbuhkan dalam cawan petri atau tabung maka harus dipenuhi kebutuhan unsur tersebut dari molekul organik yang terdapat pada media.

Komposisi setiap bahan pada media tertentu terhadap mikroorganisme target menggambarkan kondisi nutrisi pada habitat aslinya karena pada keadaan itulah mikroorganisme tersebut optimal tumbuh. Berikut adalah sumber nutrisi media:

Sumber karbon; molekul organik umumnya mengandung karbon sebagai tulang punggungnya seperti karbohidrat, lemak, protein yang terdapat pada pepton, glukosa, dll. Bahan organik inilah yang menjadi sumber karbon utama untuk mikroorganisme heterotrof yang umum dikultivasi.

Sumber nitrogen; sumber nitrogen mencakup asam amino, protein atau senyawa bernitrogen lain yang terkandung pada peptone, meat extract, atau tryptose. Sejumlah mikroorganisme juga dapat menggunakan sumber N anorganik seperti urea.

Sumber oksigen; untuk mikroorganisme heterotrof yang dikulturkan pada cawan, sebagian besar oksigen didapatkan langsung dari udara sedangkan mikroorganisme yang dikultur pada media cair sumber oksigen berasal dari oksigen yang terlarut air. Oleh karena itu aerasi pada kultur cair dapat meningkatkan pasokan oksigen kepada mikroorganisme.

Sumber fosfat; sumber fosfat organik seperti beberapa protein, kofaktor atau ATP yang dapat dijumpai pada bahan *yeast extract* atau pepton. Namun hampir semua mikroorganisme dapat memanfaatkan fosfat anorganik yang

ditambahkan langsung pada media seperti *potassium phosphate*, *sodium phosphate* dll.

Sumber unsur sekelumit (mikronutrient/trace element); pada lingkup media pada cawan petri, unsur mikronutrien (Zn, Mn, Mo, Ni, Co, Cu dll.) dapat diperoleh dari akuades atau peralatan gelas. Fungsi mikronutrien ini umumnya menjadi bagian dari enzim atau kofaktor untuk menjadi katalis reaksi atau menjaga struktur protein.

Sumber karbon; molekul organik umumnya mengandung karbon sebagai tulang punggungnya seperti karbohidrat, lemak, protein yang terdapat pada pepton, glukosa, dll. Bahan organik inilah yang menjadi sumber karbon utama untuk mikroorganisme heterotrof yang umum dikultivasi

Sumber nitrogen; sumber nitrogen mencakup asam amino, protein atau senyawa bernitrogen lain yang terkandung pada peptone, meatextract, atau tryptose. Sejumlah mikroorganisme juga dapat menggunakan sumber N anorganik seperti urea.

Sumber oksigen; untuk mikroorganisme heterotrof yang dikulturkan pada cawan, sebagian besar oksigen didapatkan langsung dari udara sedangkan mikroorganisme yang dikultur pada media cair sumber oksigen berasal dari oksigen yang terlarut air. Oleh karena itu aerasi pada kultur cair dapat meningkatkan pasokan oksigen kepada mikroorganisme.

Sumber fosfat; sumber fosfat organik seperti beberapa protein, kofaktor atau ATP yang dapat dijumpai pada bahan *yeast extract* atau pepton. Namun hampir semua mikroorganisme dapat memanfaatkan fosfat anorganik yang ditambahkan langsung pada media seperti *potassium phosphate*, *sodium phosphate* dll.

Sumber unsur sekelumit (mikronutrient/trace element); pada lingkup media pada cawan petri, unsur mikronutrien (Zn, Mn, Mo, Ni, Co, Cu dll.) dapat diperoleh dari akuades atau peralatan gelas. Fungsi mikronutrien ini

umumnya menjadi bagian dari enzim atau kofaktor untuk menjadi katalis reaksi atau menjaga struktur protein. Oleh karena itu pembuktian kebutuhan unsur mikronutrien sangat sulit dilakukan dalam skala laboratorium karena setiap jenis mikroorganisme membutuhkannya dalam jumlah yang sangat sedikit.

2. Komposisi Media Pertumbuhan

Komposisi media pertumbuhan pada setiap bahan bakunya diatur dengan takaran tertentu. Berikut adalah beberapa bahan-bahan yang umum dipakai dalam pembuatan media pertumbuhan (Nurhidayanti, 2016)

- a. **Agar** adalah bahan yang paling umum digunakan sebagai *gelling agent* pada media yang terbuat dari ekstrak alga. Agar bukan sebagai sumber nutrisi bagi mikroorganisme namun fungsinya lebih bersifat mekanis yaitu memadatkan media cair sehingga sel tidak larut dalam cairan. Struktur agar terdiri dari *D-galactose*, *3,6-anhydro-L-galactose*, dan *D- glucuronic acid*. Umumnya agar terbuat dari ganggang merah. Agar cocok menjadi agen pematat karena setelah dilarutkan pada suhu mendidih dapat didinginkan sampai 40-42°C sebelum memadat dan tidak akan mencair lagi sebelum suhu mencapai 80-90°C. Pencairan dan pemadatan berkali-kali atau sterilisasi yang terlalu lama dapat menurunkan kekuatan agar, terutama pada pH yang asam
- b. **Pepton** adalah hasil hidrolisis protein yang dibentuk dari proses enzimatik atau digesti asam. Casein banyak digunakan sebagai substrat pembentuk peptone, tetapi beberapa bahan lain seperti soy bean meal juga sering digunakan
- c. **Meat/ plant extract** adalah ekstrak daging dan tumbuhan mengandung asam amino, peptida dengan berat molekul rendah, karbohidrat, vitamin, mineral dan trace metals. Ekstrak jaringan hewan mengandung lebih banyak bahan protein larut air dan glikogen sedangkan ekstrak

tumbuhan lebih banyak terdapat karbohidrat di dalamnya

- d. **Faktor tumbuh;** banyak mikroorganisme yang membutuhkan faktor tumbuh spesifik yang harus ada dalam media pertumbuhannya. Beberapa diantaranya adalah vitamin, asam amino, asam lemak dan nutrisi dari darah,
- e. **Komponen selektif;** suatu bahan yang berfungsi untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme non target disebut komponen selektif. Komponen selektif dipakai pada media selektif yang berguna untuk mengisolasi bakteri spesifik dari populasi campuran. *Bile salts* (garam empedu), selenite, tetra-hionate, tellurite, azide, phenylethanol, sodium lauryl sulfate, sodium chloride (konsentrasi tinggi), dan beberapa pewarna (eosin, Crystal Violet, dan Methylene Blue) umumnya dipakai sebagai bahan selektif. Bahan antimikroba juga dapat digunakan untuk menekan pertumbuhan bakteri tertentu, diantaranya adalah ampicillin, chloramphenicol, colistin, cycloheximide, gentamicin, kanamycin, nalidixic acid, sulfadiazine, dan vancomycin
- f. **Komponen diferensial;** berbeda dengan komponen selektif, komponen diferensial ini tidak menekan pertumbuhan mikroorganisme tertentu namun sebagai bahan untuk memudahkan pembedaan mikroorganisme target dari populasi campurannya (deteksi visual). Bahan diferensial seperti pH indikator akan membuat koloni target berbeda warna karena memproduksi asam. Bahan lainnya berupa pewarna kromogenik yang mampu berubah warna jika suatu reaksi enzim spesifik terjadi.
- g. **pH buffer/ buffer salts;** pH buffer digunakan untuk menjaga pH media selama digunakan untuk tumbuh karena beberapa mikroorganisme akan tumbuh optimal pada kisaran pH yang spesifik.

C. Quality Control Media

Quality control adalah seluruh kegiatan yang melibatkan laboratorium dan untuk menjamin hasil uji yang dilakukan, bermutu baik. Pemantapan mutu menyeluruh, mencakup semua tahap kegiatan, mulai dari pra analitik, analitik, sampai pasca analitik (Atmanto, Asri and Kadir, 2022)

Media harus memiliki kualitas atau mutu yang baik, Parameter yang perlu diperhatikan agar kualitas media baik antara lain :

1. Parameter sterilisasi

Parameter sterilisasi sangat penting umumnya menggunakan autoklaf. Harus diperhatikan waktu atau lamanya proses sterilisasi dengan autoklaf karena dapat menyebabkan kerusakan *nutrient* oleh karena destruksi atau reaksi antara komponen.

2. Parameter fisik

Parameter fisik dilihat dari penampilan media tidak boleh kotor, karakter fisik dari media tidak terdapat gelembung atau lubang yang berlebihan, pengisian *plate* media yang tidak sama, *plate* media dan pembekuan atau kristalisasi yang retak.

3. Parameter mikrobiologi

Parameter yang paling penting saat melakukan pengendalian kualitas media. Prosedur baku inokulasi harus digunakan. Hasilnya harus diperiksa secara kualitatif dan kuantitatif dan saat pengujian yang baru, baik *batch* sebelumnya dan *batch* baru harus tumbuh secara bersamaan.

4. Parameter kontaminasi

Parameter yang sangat penting bagi penentuan kualitas media. *Batch* tersebut harus benar-benar diperiksa untuk kontaminasi sebelum digunakan. *Batch* seluruh media diperiksa adanya kontaminasi dengan menjaga *plate* media minimal selama tiga hari pada suhu kamar. *Plate* media dapat diambil dan ditempatkan ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi *plate*

media diperiksa untuk pertumbuhan kuman jika ada pertumbuhan kuman, proses ini diulang, dengan *batch* yang sama. Jika pencemaran terjadi lagi, maka disimpulkan bahwa kontaminasi telah terjadi di *batch* yang disiapkan.

Faktor yang paling penting untuk menjaga kualitas media adalah pemanasan, hal penting untuk mengoptimalkan proses pemanasan supaya media pertumbuhan bakteri menjadi steril dengan kerusakan seminimal mungkin. Oleh sebab itu diperlukan petunjuk umum saat melakukan proses pemanasan walaupun dengan resiko bahwa pemanasan dapat merusak media secara langsung karena reaksi diantara komponen-komponen media ataupun karena produk *toxin* yang terbentuk akibat pemanasan. Pemanasan media pertumbuhan bakteri yang mengandung nutrisi kompleks seperti peptida, gula, mineral, dan logam akan menyebabkan destruksi/kerusakan nutrisi. Produk beracun yang disebabkan oleh proses kemoooksidasi dapat terbentuk selama pemanasan. Pemanasan dapat berdampak pada perubahan komposisi media berupa penguraian kandungan yang mendukung pertumbuhan bakteri seperti vitamin, asam amino, dan asam lemak, serta merubah pH. Pencegahan agar pemanasan tidak berdampak negatif adalah dengan proses sterilisasi media yang cukup dilakukan satu kali. Media pertumbuhan bakteri disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 116-118°C untuk mencegah dekomposisi/penguraian karbohidrat berupa gula dan pembentukan formasi senyawa toksik yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Angraeni, 2021).

Media sebelum digunakan harus diperhatikan pH dan sterilitas media pertumbuhan, pada pH 6.5-7.5, umumnya bakteri tidak tumbuh pada pH terlalu asam (Kebanyakan kuman patogen tumbuh optimal atau basa, Menurut), bahwa sebaiknya tidak melakukan sterilisasi media dengan pH > 7.5 (untuk mengatasinya, sterilisasi pada pH netral kemudian diatur pH menjadi basa dengan larutan basa steril). Tidak melakukan sterilisasi larutan agar dengan pH < 6. Media yang telah dibuat disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 2-8°C. Media

pertumbuhan bakteri yang akan digunakan, lalu dikeluarkan terlebih dahulu pada suhu ruang sebelum digunakan sebelum dipanaskan pada suhu $46\pm 1^{\circ}\text{C}$ menggunakan *water bath*. Ketinggian air di dalam *water bath* harus sama dengan media untuk menghindari air masuk ke dalam media. Wadah air harus diganti secara teratur untuk menghindari kontaminasi. Media lebih baik digunakan sesegera mungkin setelah dipanaskan. Penggunaan media dianjurkan tidak lebih dari 4 jam setelah pemanasan, Media pertumbuhan bakteri yang disimpan dalam kulkas akan dipanaskan kembali saat akan digunakan untuk praktikum. Penelitian yang dilakukan didasari observasi yang dilakukan penulis pada September 2020 karena pemanasan berulang masih dilakukan di Laboratorium Bakteriologi (Putra, Fitri and Fadilah, 2021)

DAFTAR PUSTAKA

- Angraeni, P.D. (2021) 'Pengaruh Pemanasan Berulang Terhadap Kualitas Media Plate Count Agar (pca) di laboratorium bakteriologi jurusan analis kesehatan', *The Journal medika malahayati*, 23(6), pp. 370-383. Available at: <https://www.emerald.com/insight/content/doi/10.1108/JAP-04-2021-0014/full/html>.
- Anisah and Rahayu, T. (2015) 'Media Alternatif untuk Pertumbuhan Bakteri Menggunakan Sumber Karbohidrat yang Berbeda Alternative Media For Bacterial Growth Using Different Source of Carbohidrats', *Seminar Nasional XII Pendidikan Biologi FKIP UNS*, 10(1), pp. 855-860.
- Atmanto, Y., Asri, L. and Kadir, N. (2022) 'Media Pertumbuhan Kuman', *Jurnal Medika Utama*, 4(1), pp. 3072-3073. Available at: <http://jurnalmedikahutama.com>.
- Hafsan (2014) 'Mikrobiologi Analitik'.
- Hafsan and Hafsan, H. (2011) *Mikrobiologi Umum*.
- Hamzah, H. (2023) *Mikrobiologi Dasar, Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951-952. Available at: <https://medium.com/@arifwicaksanaa/pengertian-use-case-a7e576e1b6bf>.
- Nurhidayanti (2016) 'Media yang digunakan untuk Pertumbuhan Bakteri', (1908), pp. 1-235.
- Putra, S.F., Fitri, R. and Fadilah, M. (2021) 'Pembuatan Media Tumbuh Bakteri Berbasis Lokal Material', *Prosiding Seminar Nasional Biologi*, pp. 1043-1050. Available at: <https://semnas.biologi.fmipa.unp.ac.id/index.php/prosiding/article/view/302>.

BAB

6

UJI BIOKIMIA

Bambang Supriyanta, S.Si., M.Sc

A. Pengertian Uji Biokimia

Uji Biokimia dilakukan untuk mengetahui reaksi yang dihasilkan oleh bakteri pada media yang digunakan. Uji biokimia dilakukan karena dapat digunakan untuk mengidentifikasi bakteri (Harti 2015). Bakteri memanfaatkan nutrisi pada media untuk menyusun komponen sel-nya, sehingga dapat berkembangbiak, sedangkan bagi Ahli Teknologi Laboratorium Medis digunakan untuk mengisolasi mikroorganisme, identifikasi dan membuat kultur murni (Haryati, 2020).

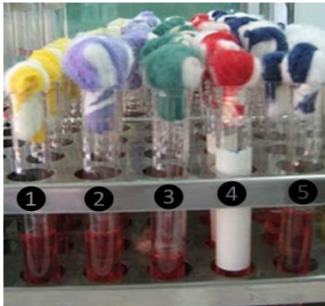
B. Berbagai Macam Uji Biokimia

Penggunaan zat hara tergantung aktivitas metabolisme mikroba. Metabolisme seringkali menghasilkan hasil sampingan yang dapat digunakan untuk identifikasi mikroorganisme. Untuk mengidentifikasi suatu mikroorganisme dilakukan uji biokimia untuk mengetahui aktivitas metabolisme mikroorganisme. Uji biokimia meliputi:

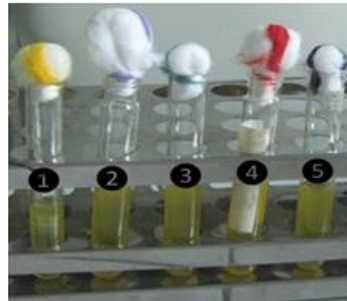
1. Uji Fermentasi Karbohidrat.

Kemampuan memfermentasikan berbagai karbohidrat dan produk fermentasi yang dihasilkan merupakan ciri yang sangat berguna dalam identifikasi mikroorganisme. Hasil akhir fermentasi karbohidrat ditentukan oleh sifat mikroba, media biakan yang digunakan serta faktor lingkungan,

antara lain suhu dan pH. Media fermentasi harus mengandung senyawa yang dapat dioksidasikan dan difermentasikan oleh mikroorganisme. Untuk menentukan adanya fermentasi karbohidrat, di laboratorium digunakan media kaldu karbohidrat dan media MR-VP (Methyl Red-Voges Proskauer). Kaldu karbohidrat yang digunakan mengandung 0,5-1% karbohidrat. Karbohidrat yang sering dipakai adalah glukosa, sukrosa, laktosa, manitol dan maltosa. Selain karbohidrat ke dalam media ditambahkan juga ekstrak daging dan pepton sebagai sumber nitrogen, vitamin dan mineral (Kumar, 2008).



(a)
Gambar 6. 1 (a) Media Uji Fermentasi Karbohidrat yang belum mengalami fermentasi oleh bakteri



(b)
Gambar 6. 2 (b) Media Uji Fermentasi Karbohidrat yang sudah mengalami fermentasi oleh bakteri sehingga berubah warna

Keterangan :	Keterangan :
a. Tutup kapas warna putih kuning: glukosa	a. Fermentasi positif glukosa:
b. Tutup kapas warna putih ungu: laktosa	b. Fermentasi positif laktosa:
c. Tutup kapas warna putih hijau : manitol	c. Fermentasi positif manitol:
d. Tutup kapas warna putih merah : maltosa	d. Fermentasi positif maltosa:
b. Tutup kapas warna putih biru : sakarosa.	e. Fermentasi positif sukrosa:

Bakteri yang ditumbuhkan dalam media biakan cair karbohidrat, memfermentasi dan menghasilkan asam. Asam yang dihasilkan akan menurunkan pH media biakan. Untuk mendeteksi ada tidaknya penurunan pH maka digunakan indikator merah fenol. Bila bakteri memfermentasi media karbohidrat menghasilkan asam atau penurunan pH, akibatnya terjadi perubahan warna indikator yang semula merah menjadi kuning.

Media karbohidrat selain digunakan untuk uji pembentukan asam juga digunakan untuk uji pembentukan gas. Pembentukan gas dapat ditentukan dengan menggunakan tabung Smith atau tabung Durham. Tabung Smith digunakan bila jumlah dan macam gas yang dihasilkan harus ditentukan, sedangkan tabung Durham digunakan bila hanya ingin mengetahui ada tidaknya gas yang terbentuk tanpa harus mengetahui jumlah gas yang terbentuk dan jenis gas yang terbentuk. Bila terbentuk gas, maka gas akan masuk ke dalam tabung Durham dan mendesak cairan dalam tabung Durham. Gas yang terbentuk terlihat sebagai gelembung udara yang terperangkap dalam tabung Durham. Setelah diinkubasi diamati perubahan warna dan pembentukan gas dalam tabung Durham. Hal ini

dapat menjadi tanda senyawa apa yang difermentasikan dan dapat menjadi dasar acuan dalam identifikasi bakteri.

Berdasarkan hasil fermentasi karbohidrat bakteri dapat dikelompokkan menjadi 5 kelompok yaitu:

- a. Bakteri asam laktat (BAL) homofermentatif yang hanya mampu menghasilkan asam laktat, dengan hasil uji berupa warna media berubah menjadi warna kuning atau lebih kuning dari warna tabung kontrol dan tidak terbentuk gas pada tabung Durham
- b. Bakteri asam laktat (BAL) heterofermentatif yang mampu menghasilkan asam laktat, etil alkohol, serta gas CO₂, dengan hasil uji berupa warna media berubah menjadi warna kuning atau lebih kuning dari warna tabung kontrol dan terbentuk gas pada tabung Durham.
- c. Bakteri aseton, butil alkohol yang mampu menghasilkan aseton, butil alkohol, asam butirat, isopropil alkohol, asam asetat, asam format serta gas CO₂ dan H₂, dengan hasil uji berupa warna media tidak berubah dan terbentuk gas dalam tabung Durham.
- d. Bakteri coli-aerogeneses tifoid yang mampu menghasilkan 2,3 butana diol, asam format, asam asetat, asam suksinat, etil alkohol serta gas CO₂ dan H₂, dengan hasil uji berupa warna media berubah menjadi warna kuning atau lebih kuning dari warna tabung kontrol dan terbentuk gas pada tabung Durham, namun pada uji VP memberikan hasil uji positif dan uji MR memberikan hasil uji yang bervariasi (tergantung genus dan spesies bakteri).
- e. Bakteri asam propionat yang mampu menghasilkan asam propionat, asam asetat dan CO₂, dengan hasil uji berupa warna media berubah menjadi warna kuning atau lebih kuning dari warna tabung kontrol dan terbentuk gas pada tabung Durham, namun pada uji MR memberikan hasil uji positif dan uji VP memberikan hasil uji yang bervariasi (tergantung genus dan spesies bakteri) (Jawetz, Melnick, 2007)

2. Uji Methyl Red

Uji methyl red (MR) untuk mengetahui apakah bakteri dapat memfermentasikan karbohidrat menjadi asam campuran, gas dan menentukan kisaran pH asam yang dihasilkan dari fermentasi karbohidrat tersebut

Beberapa jenis bakteri dapat membentuk asam tetapi tidak cukup banyak untuk dapat mengubah warna indikator. Bakteri seperti *Escherichia coli* dapat memberikan hasil pengujian positif karena dapat menurunkan pH sampai di bawah 5,0. Sebaliknya *Klebsiella aerogenes* mengadakan dekarboksilasi dan kondensasi asam piruvat untuk membentuk asetil metil karbinol, sehingga pH meningkat dan bila ditambahkan indikator metil merah, warnanya kuning, yang berarti hasil pengujian negatif. Metil merah berwarna merah pada pH 4,4 dan berwarna kuning pada pH 6.2.

Uji ini sangat berguna dalam membedakan beberapa kelompok bakteri yang menempati saluran pencernaan. Media yang digunakan adalah pepton glukosa phosphat. Hasil negatif apabila tidak terjadi perubahan warna media setelah ditambah methyl red 1%. Positif apabila terjadi perubahan warna media menjadi merah setelah ditambahkan methyl red 1%. Artinya bakteri menghasilkan asam campuran (metilen glikon) dari proses fermentasi glukosa yang terkandung dalam media MR (Kumar, 2008).



Gambar 6. 3 Uji Methyl Red Setelah Media Ditambah dengan Methyl Red 1% Menunjukkan Hasil Negatif (Kiri) Karena Media Tidak Berubah Warna atau Tetap Kuning dan Hasil Positif (Kanan) Karena Media Berubah Warna Menjadi Merah

3. Uji Voges-Proskauer

Uji Voges-Proskauer digunakan untuk membedakan antara organisme yang menghasilkan asam dalam jumlah yang besar dan yang menghasilkan nonasidik atau produk netral seperti asetilmetil karbinol (aseton) dari hasil metabolisme glukosa.

Produk netral ini membuat bakteri dapat memfermentasi karbohidrat dalam jumlah yang besar. Adanya kandungan aseton yang diproduksi dalam larutan ditandai dengan perubahan warna larutan dari kuning

menjadi merah muda hingga merah tua. *Staphylococcus aureus* dapat memproduksi aseton sebagai hasil fermentasi glukosa yang membedakannya dengan *Staphylococcus* lainnya.

Uji ini juga digunakan untuk mengidentifikasi mikroorganismenya yang dapat memfermentasikan karbohidrat menjadi 2,3-butanadiol sebagai produk utama, dan akan terjadi penumpukan bahan tersebut dalam media pertumbuhan. Penambahan KOH 40% dan larutan α -naftol 5% dalam etanol dapat menentukan adanya aseton (asetilmetilkarbinol) yakni suatu senyawa awal dalam sintesis 2,3-butanadiol. Pada penambahan KOH, adanya aseton ditunjukkan oleh perubahan warna kaldu menjadi merah muda. Perubahan warna ini diperjelas dengan penambahan larutan α -naphtol. Perubahan warna kaldu biakan lebih jelas pada bagian yang berhubungan dengan udara, karena sebagian 2,3-butanadiol dioksidasikan kembali menjadi aseton sehingga memperjelas hasil reaksi. Berdasarkan hal tersebut maka tabung yang berisi kaldu dikocok sehingga berbuih, kemudian dibuka tutup tabungnya dan dimiringkan di atas meja.

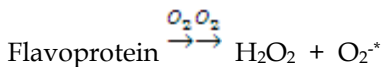
Uji Voges-Proskauer merupakan uji tidak langsung untuk mengetahui adanya 2,3-butanadiol karena dalam uji ini yang terdeteksi adalah pembentukan aseton. Namun karena aseton merupakan senyawa awal dalam pembentukan 2,3-butanadiol dan selalu diperoleh secara serentak, sehingga uji Voges-Proskauer dapat digunakan untuk menentukan adanya 2,3-butanadiol (Madigan *et al.*, 2010).



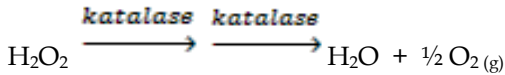
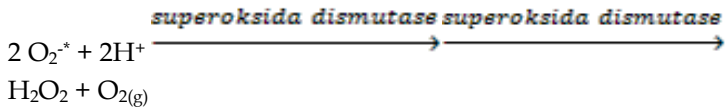
Gambar 6. 4 Uji Voges-Proskauer Setelah Media Ditambah dengan KOH 40% dan Larutan α -Naftol 5% Dalam Etanol Menunjukkan Hasil Negatif (Kiri) karena Media Tidak Berubah Warna (Tetap Kuning) dan Hasil Positif (Kanan) Karena Media Berubah Warna Menjadi Merah

4. Uji Katalase

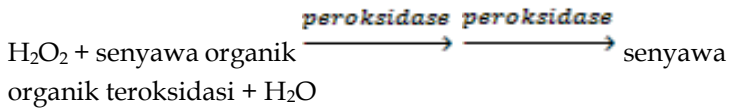
Setiap bakteri mempunyai suatu enzim yang tergolong flavoprotein yang dapat bereaksi dengan oksigen membentuk senyawa-senyawa beracun yaitu hidrogen peroksida (H_2O_2) dan suatu radikal bebas yaitu superoksida ($O_2^{\cdot-}$) sebagai berikut :



Bakteri yang bersifat aerobik dan bersifat anaerob aerotoleran mempunyai enzim katalase yang dapat memecah H_2O_2 dan enzim superoksida dismutase yang memecah radikal bebas tersebut.



Bakteri yang bersifat anaerobik fakultatif juga mempunyai enzim superoksida dismutase, tetapi tidak mempunyai enzim katalase, melainkan mempunyai enzim peroksidase yang mengkatalisis reaksi antara H_2O_2 dengan senyawa organik, menghasilkan senyawa yang tidak beracun. Reaksinya adalah sebagai berikut :



Katalase merupakan salah satu enzim yang digunakan mikroorganisme untuk menguraikan hidrogen peroksida, enzim lainnya yang dapat menguraikan hidrogen peroksida adalah peroksidase. Penentuan adanya katalase diuji dengan larutan 3% H_2O_2 pada koloni terpisah. Pada bakteri yang bersifat katalase-positif terlihat pembentukan gelembung udara sekitar koloni. Uji katalase berguna dalam identifikasi kelompok bakteri aerob dan anaerob aerotoleran dengan bakteri anaerob fakultatif. Pada bakteri bentuk kokus, uji katalase digunakan untuk membedakan *Staphylococcus* dan *Streptococcus*. Kelompok *Streptococcus* bersifat katalase-negatif, sedangkan *Staphylococcus* bersifat katalase-positif (Madigan *et al.*, 2010).



Gambar 6. 5 Uji Katalase dengan hasil positif pada koloni *Staphylococcus aureus* Ditambah H₂O₂ 3%

Bakteri yang bersifat anaerob obligat tidak mempunyai enzim superoksida dismutase maupun katalase. Oleh karena itu, oksigen merupakan racun bagi bakteri tersebut karena senyawa yang terbentuk dari reaksi flavoprotein dengan oksigen yaitu H₂O₂ dan suatu radikal bebas yaitu O₂^{*}. Jenis bakteri ini akan memberikan hasil uji katalase negatif (Fardiaz, 1992). Katalase adalah enzim yang mengkatalisis penguraian hidrogen peroksida (H₂O₂) menjadi H₂O dan O₂. Hidrogen peroksida bersifat toksik terhadap sel karena bahan ini dapat menginaktivasikan beberapa jenis enzim dalam sel. Hidrogen peroksida terbentuk sewaktu metabolisme aerob, sehingga mikroorganisme yang tumbuh dalam lingkungan aerob harus menguraikan bahan toksik tersebut (Sopiah *et al.*, 2016) (Rahma, Djamaan dan Gustina, 2010) (Juniawan *et al.*, 2023).

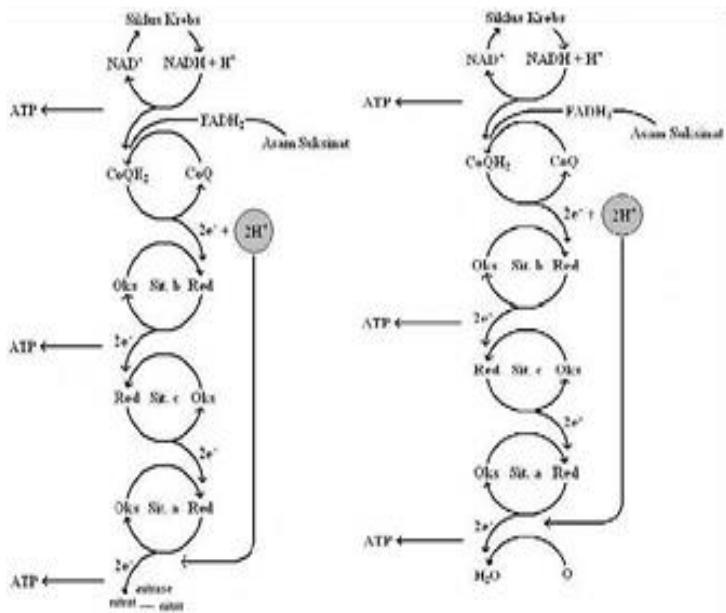
5. Uji Oksidase

Transport elektron sering disebut juga sistem rantai respirasi atau sistem oksidasi terminal. Transport elektron berlangsung pada krista (membran dalam) dalam mitokondria. Molekul yang berperan penting dalam reaksi ini adalah NADH dan FADH_2 , yang dihasilkan dari siklus Krebs. Selain itu, molekul lain yang juga berperan adalah molekul oksigen (O_2), koenzim Q (*Ubiquinone*), sitokrom b, sitokrom c, dan sitokrom a atau sitokrom oksidase.

Pertama-tama, NADH dan FADH_2 mengalami oksidasi, dan elektron berenergi tinggi yang berasal dari reaksi oksidasi ini ditransfer ke koenzim Q. Energi yang dihasilkan ketika NADH dan FADH_2 melepaskan elektronnya cukup besar untuk menyatukan ADP dan fosfat anorganik menjadi ATP. Kemudian koenzim Q dioksidasi oleh sitokrom b. Selain melepaskan elektron, koenzim Q juga melepaskan 2 ion H^+ . Setelah itu sitokrom b dioksidasi oleh sitokrom c. Energi yang dihasilkan dari proses oksidasi sitokrom b oleh sitokrom c juga menghasilkan cukup energi untuk menyatukan ADP dan fosfat anorganik menjadi ATP, kemudian sitokrom c mereduksi sitokrom a.

Pada keadaan aerobik atau pada mikroorganisme yang bersifat aerobik, jenis sitokrom a yang dimiliki adalah sitokrom aa_3 atau sitokrom oksidase. Pada tahap selanjutnya sitokrom oksidase ini kemudian akan dioksidasi oleh sebuah atom oksigen yang merupakan zat yang paling elektronegatif dalam rantai tersebut, dan merupakan akseptor elektron terakhir.

Setelah menerima elektron dari sitokrom oksidase, oksigen tersebut kemudian bergabung dengan ion H^+ yang dihasilkan dari oksidasi koenzim Q oleh sitokrom b membentuk air (H_2O). Oksidasi yang terakhir ini menghasilkan energi yang cukup besar untuk dapat menyatukan ADP dan gugus fosfat anorganik menjadi ATP. Jadi, secara keseluruhan ada tiga tempat pada Transport elektron yang menghasilkan ATP (Madigan *et al*, 2000).



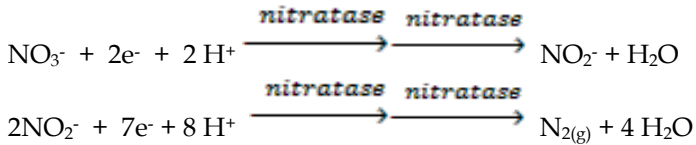
Gambar 6. 6 Transport Elektron pada Respirasi Anaerob (Kiri) dan Transport Elektron pada Respirasi Aerob (Kanan)

Uji oksidase berfungsi untuk menentukan adanya sitokrom oksidase yang dapat ditemukan pada mikroorganisme tertentu. Mikroorganisme aerobik dan anaerobik fakultatif memiliki enzim sitokrom oksidase dan oksigen sebagai akseptor elektronnya sehingga dalam uji ini akan memberikan hasil uji positif yang ditunjukkan dengan perubahan warna koloni bakteri menjadi hitam dalam waktu 30 menit setelah penambahan reagen uji. Perubahan warna ini disebabkan sitokrom oksidase mengoksidasikan larutan reagen. Pada mikroorganisme anaerob obligat akan memberikan hasil uji negatif yang ditandai dengan tidak terjadi perubahan warna (Ahern, 2018) (Wilson, Purwestri and Sembiring, 2017).

6. Uji Reduksi Nitrat

Dalam keadaan kekurangan oksigen atau pada mikroorganisme yang bersifat anaerob dan tidak memiliki enzim sitokrom oksidase (sitokrom aa₃), maka

mikroorganisme akan menggunakan molekul bukan oksigen sebagai akseptor elektron terakhir. Nitrat (NO_3^-) digunakan oleh mikroorganisme tertentu sebagai akseptor elektron terakhir dengan cara mereduksi nitrat menjadi nitrit (NO_2^-). Beberapa mikroorganisme mereduksikan nitrit menjadi gas nitrogen (N_2).



Kemampuan mereduksi nitrat dapat digunakan sebagai ciri dalam identifikasi bakteri *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* mampu menggunakan nitrat sebagai akseptor elektron terakhir. *E. coli* mereduksikan nitrat menjadi nitrit sedangkan *P. aeruginosa* mampu mereduksikannya lebih lanjut menjadi N_2 . Sebaliknya *Staphylococcus epidermis* tidak dapat menggunakan nitrat sebagai akseptor elektron terakhir.

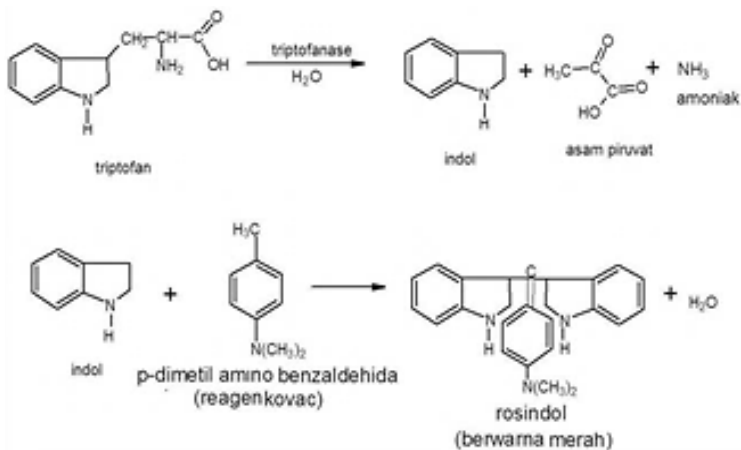
Uji nitrat dilakukan dengan menumbuhkan mikroorganisme dalam kaldu nutrisi yang mengandung 0,5 % KNO_3 dan dilengkapi tabung Durham. Setelah masa inkubasi, diamati pembentukan gas dalam tabung Durham dan keberadaan nitrit dalam media biakan. Gas yang terperangkap dalam tabung Durham merupakan campuran gas N_2 dan CO_2 . Gas N_2 berasal dari penguraian sempurna nitrat sedangkan CO_2 merupakan produk respirasi anaerob. Keberadaan nitrit dalam media dapat diuji dengan penambahan asam sulfanilat dan α -naftilamin yang akan bereaksi dengan nitrit yang ditunjukkan dengan perubahan warna media menjadi merah atau merah muda (Kumar, 2008).



Gambar 6. 7 Media Uji Nitrat Sebelum Direduksi Bakteri (Kiri) dan Setelah Direduksi oleh Bakteri (Kanan)

7. Uji Indol

Untuk menentukan kemampuan bakteri dalam memecah asam amino triptofan. Asam amino triptofan merupakan komponen asam amino yang lazim terdapat pada protein, sehingga asam amino ini dengan mudah dapat digunakan oleh mikroorganisme akibat penguraian protein. Bakteri menguraikan triptofan membentuk asam piruvat yang kemudian dapat digunakan sebagai sumber energinya. Bakteri tertentu seperti *Escherichia coli* mampu menggunakan triptofan sebagai sumber karbon.



Gambar 6. 8 Hidrolisis Triptofan dan Uji Indol

Pembentukan indol dari triptofan oleh mikroorganisme dapat diketahui dengan menumbuhkannya dalam media biakan yang kaya dengan triptofan. Untuk uji ini biasanya dipakai kaldu tripton (1%) karena medium ini mengandung banyak triptofan. Triptofan biasanya diberikan dalam bentuk tripton yang merupakan suatu polipeptida yang kaya dengan residu triptofan.

Uji Indol, dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri memecah triptofan asam amino membentuk senyawa Indol. Triptofan dihidrolisis oleh triptofanase dan menghasilkan tiga produk yang salah satu diantaranya adalah indol. Produksi indol ini terdeteksi oleh reagen Kovac dan bereaksi menghasilkan senyawa berwarna merah. Prosedur uji indol adalah dengan menginokulasikan biakan bakteri pada media SIM, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 - 48 jam. Kultur ditetesi dengan 0,5 mL reagen Kovac. Reaksi positif ditandai dengan timbulnya warna merah pada permukaan media yang menunjukkan bahwa bakteri mampu memecah asam amino triptofan (Rifai, 2021) (Atlas, 2010).

Medium untuk uji pembentukan indol dapat digunakan medium tripton cair atau hidrolisat kasein. Penumpukan indol dalam media biakan dapat diketahui dengan penambahan reagen Kovacs atau Ehrlich yang mengandung Para Amino Benzoic Acid (PABA) melalui dinding tabung, dan akan terjadi ikatan antara indol dengan PABA yang membentuk cincin merah pada lapisan larutan reagen.



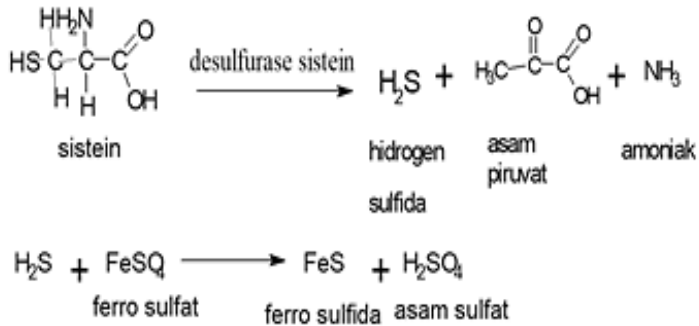
Gambar 6. 9 Media Uji Indol Sebelum Diberi Reagens Kovacks (kiri) dan Setelah Diberi Reagens Kovacks (kanan)

Triptofan merupakan suatu asam amino dengan gugus indol. Bakteri tertentu mampu menghasilkan enzim triptofanase yang mengkatalisis penguraian gugus indol dari triptofan. Dalam media biakan, indol menumpuk sebagai bahan buangan, sedangkan bagian lainnya dari molekul triptofan seperti asam piruvat dapat digunakan sebagai sumber energi melalui siklus asam sitrat, sedangkan amonium (NH_4^+) dapat digunakan untuk memenuhi kebutuhan zat hara mikroorganisme (Talaro and Talaro, 2004).

8. Uji Hidrogen Sulfida (H_2S)

Beberapa protein kaya akan asam amino sistein dan metionin. Asam amino ini dihasilkan saat protein dihidrolisis untuk memenuhi kebutuhan zat hara mikroorganisme. Pembentukan asam sulfida (H_2S) oleh mikroorganisme menunjukkan adanya penguraian asam amino yang mengandung sulfur. Bakteri yang tumbuh menghasilkan enzim desulfurase saat dibiakkan dalam media yang kaya dengan asam amino yang mengandung H_2S . Fe^{2+} yang terdapat dalam media biakan bereaksi dengan

H₂S dan menghasilkan senyawa FeS yang berwarna hitam dan tidak larut air.



Produksi H₂S dapat terlihat dengan menggunakan media yang mengandung polipeptida dan kaya asam amino yang mengandung sulfur dan ion Fe²⁺. Dalam hal ini dapat digunakan media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*). Pada media ini H₂S akan bereaksi dengan Fe menjadi FeS yang berwarna hitam. Jika medium yang digunakan adalah *lead asetat agar* maka H₂S bereaksi dengan Pb menjadi PbS yang berwarna hitam.

Media TSIA mengandung 3 macam karbohidrat yaitu laktosa dan sukrosa pada lereng media, dan glukosa pada dasar media, hal ini disebabkan oleh berat molekul glukosa lebih rendah dari laktosa dan sukrosa. Konsentrasi glukosa adalah 1/10 dari konsentrasi laktosa atau sukrosa agar fermentasi glukosa saja yang terlihat. Media tersebut digunakan untuk menguji kemampuan bakteri dalam memfermentasi karbohidrat (gula) menjadi asam organik, dengan disertai pembentukan gas maupun tidak. Selain itu media TSIA juga mengandung indikator merah fenol dan FeSO₄ yang dapat digunakan untuk uji kemampuan bakteri dalam memproduksi H₂S.

Medium TSIA diinokulasikan dengan menusukkan ose sedalam ¾ medium lalu menggoreskannya pada bagian *slant* media. Jika bakteri tidak mampu memfermentasi laktosa dan sukrosa tetapi memfermentasikan glukosa maka

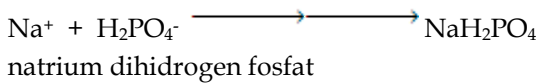
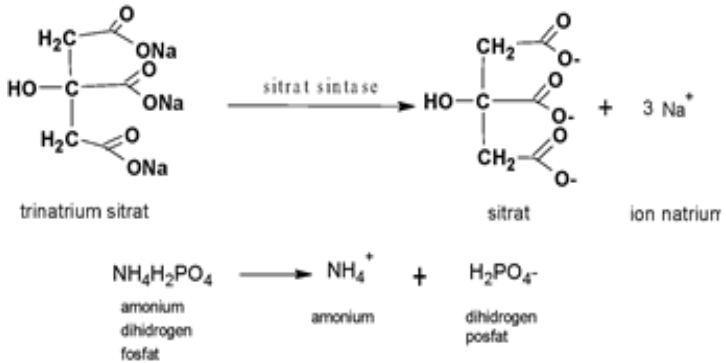
pada lereng media akan berwarna kuning (bersifat asam) dan pada dasar media berwarna merah (bersifat basa). Jika bakteri memfermentasi glukosa maupun laktosa dan sukrosa maka pada lereng dan dasar media akan berwarna kuning (terbentuk asam) dan kadangkala terpecah akibat pembentukan gas seperti H_2 dan CO_2 . Jika bakteri tidak mampu memfermentasikan glukosa maupun laktosa dan sukrosa maka lereng maupun dasar media akan berwarna merah (tidak terbentuk asam)(Prescott, 2017).



Gambar 6. 10 Uji Hidrogen Sulfida (H_2S) pada Media TSIA

9. Uji Penggunaan Sitrat sebagai Sumber Karbon

Uji sitrat digunakan untuk melihat kemampuan mikroorganisme menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Untuk uji ini digunakan medium *Simmon's citrate agar* yang merupakan medium sintetik dengan trinitratium sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon, amonium (NH_4^+) sebagai sumber nitrogen dan brom timol biru sebagai indikator pH. Bila trinitratium sitrat ini dapat diuraikan maka amonium dihidrogenfosfat turut teruraikan dan akan melepaskan NH_4^+ sehingga menyebabkan medium menjadi alkalis, dan indikator brom timol biru berubah dari hijau menjadi biru(Atlas, 2010).



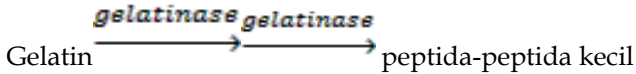
Gambar 6. 11 Media Simmon's Citrat dengan Hasil Negatif (Kiri) dan Hasil Positif (Kanan)

Uji Simmon sitrat dilakukan dengan menggunakan ose steril, diambil biakan dari NA miring, lalu ditanam pada media Simmon's citrat dengan cara digores secara zig zag pada permukaannya, setelah itu diinkubasi selama 24 jam (Gergonius dan Sine, 2016)

10. Uji Pencairan Gelatin

Gelatin adalah protein yang diperoleh ketika proses merebus tulang rawan atau jaringan ikat hewan lainnya. Protein ini bila didinginkan membentuk gel. Beberapa mikroorganisme tertentu mampu menghasilkan enzim gelatinase yang dapat menguraikan molekul gelatin menjadi peptida-peptida kecil penyusun gelatin tersebut, sehingga peptida-peptida yang dihasilkan dari proses penguraian

tersebut dapat digunakan sebagai zat hara. Hidrolisis gelatin oleh mikroorganisme dikatalisasikan oleh enzim gelatinase. Gelatin yang telah dicerna oleh mikroba tidak dapat membentuk gel dan akan berwujud cair.



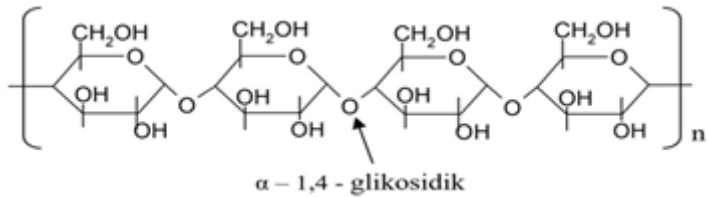
Kemampuan untuk mencernakan gelatin dapat digunakan dalam pencirian mikroorganisme, contohnya *Serratia marcescens* yang dapat mencairkan gelatin dapat dibedakan dari *Klebsiella pneumonia* atau *Escherichia coli* yang tidak dapat mencairkan gelatin. Hidrolisis gelatin dapat pula digunakan untuk mengetahui sifat patogen galur mikroorganisme karena seringkali dikaitkan dengan produksi enzim untuk menguraikan bahan pengikat jaringan untuk memudahkan penyebaran organisme.

Uji gelatin dilakukan dengan cara menusukkan bakteri yang diuji ke dalam media semi padat yang mengandung kaldu nutrien dan gelatin. Media ini diinkubasi dan diamati kemampuan mikroorganisme mencairkan gelatin. Pada suhu 35°C gelatin dapat mencair bila diinokulasi dengan mikroorganisme yang mampu mencairkan gelatin. Gelatin yang mencair setelah masa inkubasi, dimasukkan dalam lemari es selama 30 menit untuk mengetahui kemampuan mikroorganisme mencairkan gelatin. Bila mikroorganisme mampu mencerna gelatin, maka media semi padat gelatin tetap berwujud cair setelah dikeluarkan dari lemari es, namun jika media semi padat gelatin membeku kembali setelah dikeluarkan dari lemari es maka di inkubasi selama 1 minggu pada suhu yang sama (Ahern, 2018).

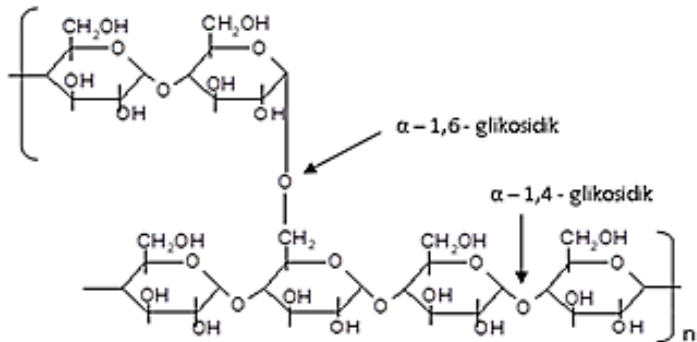
11. Uji Hidrolisis Pati

Pati tersusun dari unit-unit glukosa yang dihubungkan oleh ikatan 1,4- α -glikosida, walaupun rantai ini mempunyai banyak percabangan karena adanya ikatan 1,6- α -glikosida. Polimer pati terdiri atas 2 jenis yaitu amilosa dan amilopektin.

Amilosa terdapat dalam pati sekitar 20% dan terdiri atas unit glukosa yang berkisar 50-300 unit yang membentuk rantai lurus yang berikatan pada atom karbon nomor 1 dan nomor 4 atau disebut ikatan 1,4. Dalam larutan, rantai ini membentuk heliks (spiral) karena adanya ikatan dengan konfigurasi α pada setiap unit glukosa. Bentuk ini terdiri dari enam unit glukosa perputaran heliks, yang menyebabkan amilosa membentuk kompleks dengan bermacam-macam molekul kecil yang dapat masuk ke dalam kumparannya. Warna biru tua atau biru kehitaman yang diberikan pada penambahan iod pada pati adalah contoh pembentukan kompleks tersebut. Sedangkan amilopektin memiliki struktur yang bercabang. Sekalipun setiap molekul dapat mempunyai 300-500 unit glukosa, rantai dengan ikatan 1,4 hanya terdapat rata-rata sepanjang 25-30 unit glukosa. Rantai demikian mempunyai percabangan melalui ikatan 1,6. Karena strukturnya yang banyak bercabang sehingga pati dapat mengembang dan membentuk koloid dalam air.



Gambar 6. 12 Rumus Bangun Amilosa

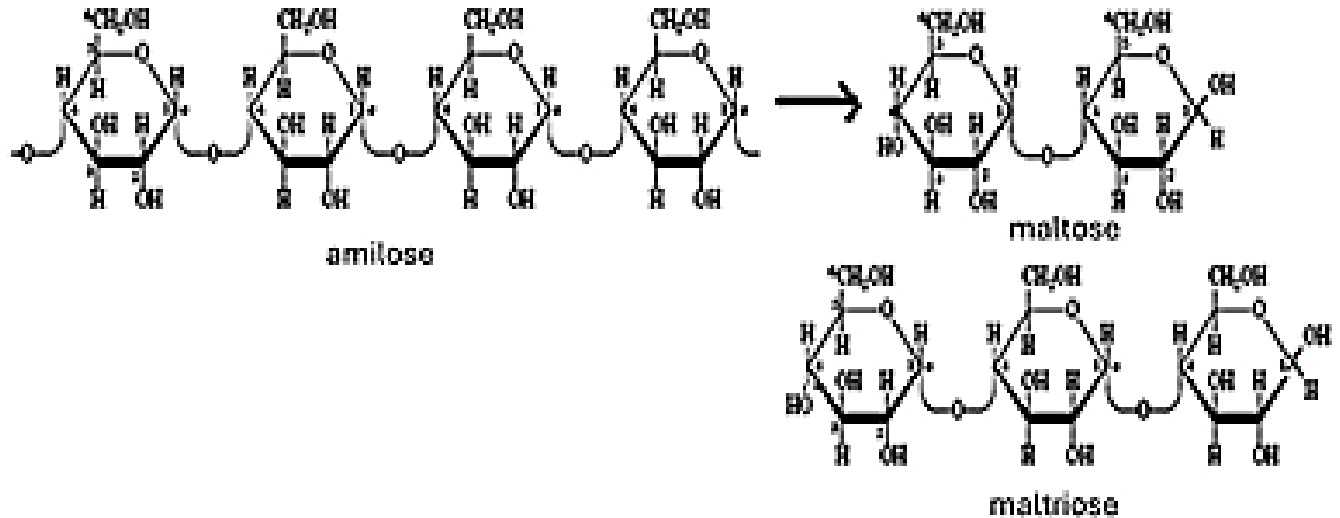


Gambar 6. 13 Rumus Bangun Amilopektin

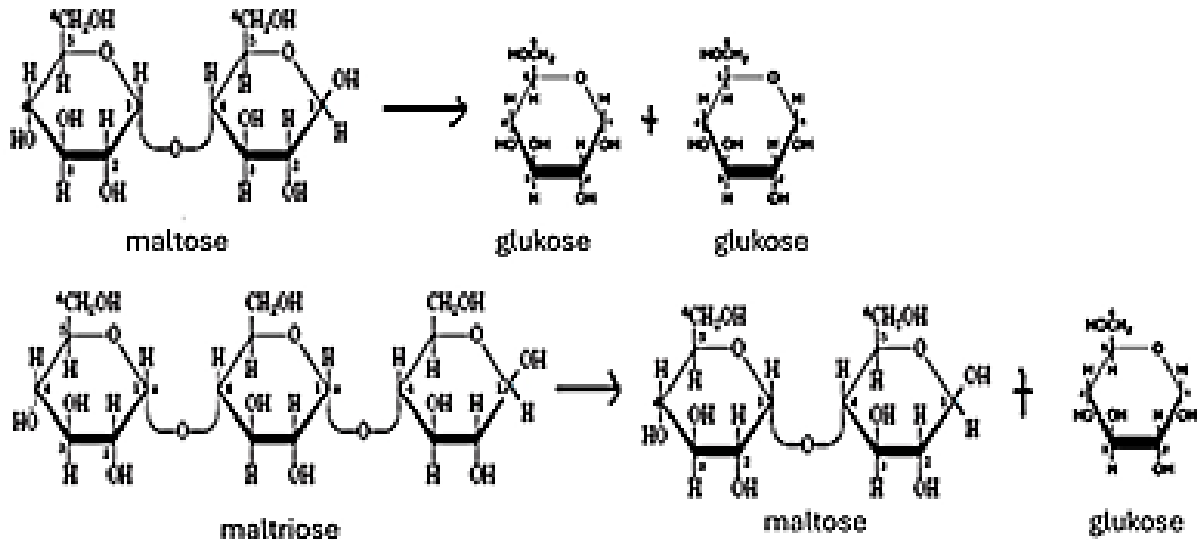
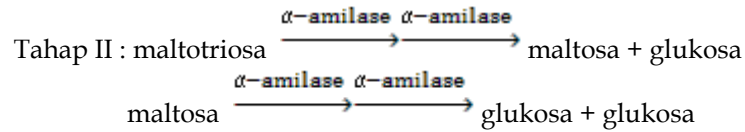
Enzim α -amilase (EC.3.2.1.1, α -1,4-D-glukan glukanohidrolase, endoamilase) merupakan enzim yang menghidrolisis ikatan α -1,4-glikosidik dari pati dan maltodekstrin secara acak pada bagian dalam molekul polisakarida (Ballschmiter *et al.*, 2006). Terdapat tiga jenis enzim amilolitik yaitu α -amilase, β -amilase, dan glukamilase. Pada hidrolisis pati, enzim yang berperan adalah α -amilase yang bekerja memutuskan ikatan dengan konfigurasi α pada pati. Hidrolisis pati oleh enzim α -amilase terbagi dalam dua jalur, yaitu hidrolisis amilosa dan hidrolisis amilopektin.

Hidrolisis amilosa oleh α -amilase terjadi melalui dua tahap. Tahap pertama adalah penguraian amilosa menjadi maltosa dan maltotriosa yang terjadi secara acak. Penguraian ini terjadi secara cepat yang diikuti dengan menurunnya viskositas dengan cepat. Tahapan kedua berlangsung relatif lambat, dengan pembentukan glukosa dan maltosa sebagai hasil akhir.

Tahap I : amilosa $\xrightarrow{\alpha\text{-amilase}}$ $\xrightarrow{\alpha\text{-amilase}}$ maltosa + maltotriosa

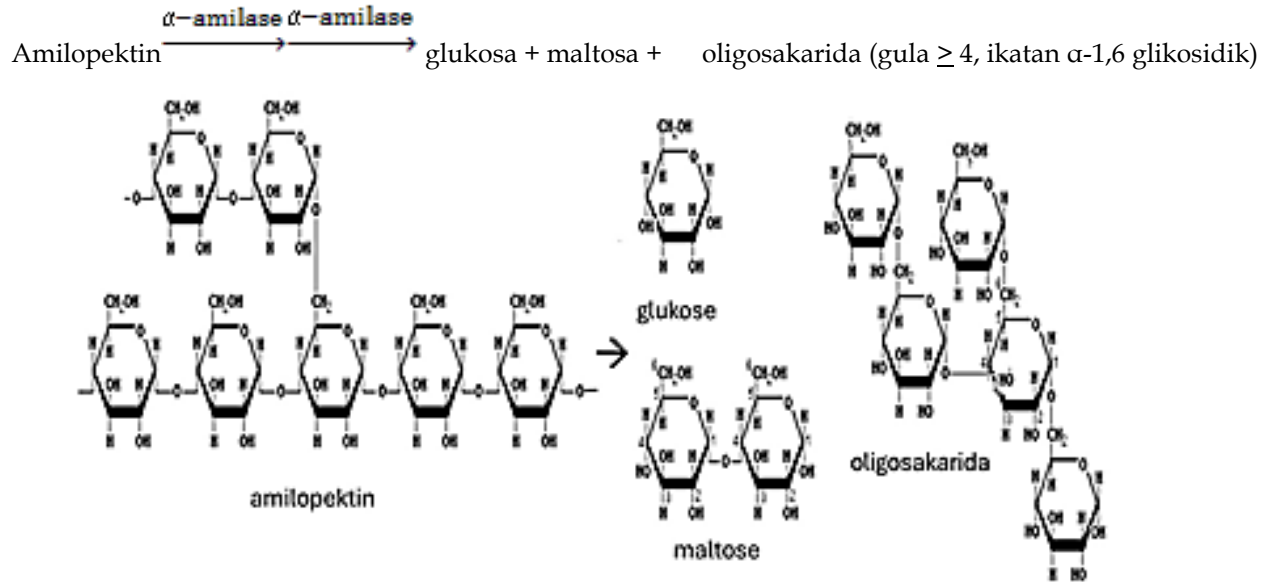


Gambar 6. 14 Peruraian Amilose Menjadi Maltosa dan Maltotriose (Prescott, 2017)



Gambar 6. 15 Peruraian maltose menjadi glukosa dan glukosa dan Peruraian Maltotriose menjadi maltose dan glukosa (Prescott, 2017)

Hidrolisis amilopektin oleh α -amilase menghasilkan glukosa, maltosa dan berbagai jenis α -limit dekstrin yang merupakan oligosakarida yang terdiri dari empat atau lebih residu gula yang mengandung ikatan α -1,6 glikosidik.



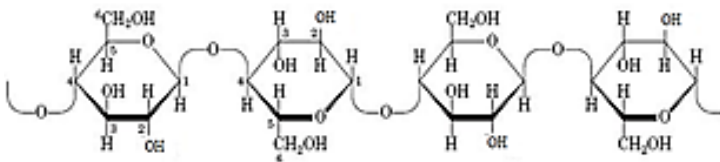
Gambar 6. 16 Peruraian amilopektin menjadi glukose, maltose dan oligosakarida (Prescott, 2017)

Hasil hidrolisis pati oleh enzim α -amilase yang berasal dari bakteri yang berbeda akan menghasilkan produk akhir yang berbeda pula. Bakteri jenis *Bacillus amyloliquefaciens* dan *Bacillus subtilis* menghasilkan produk akhir berupa maltosa, glukosa dan maltooligosakarida. *Bacillus licheniformis* menghasilkan maltosa, maltotriosa dan maltopentosa. *Streptomyces hygroscopicus* dan *Thermoactinomyces vulgaris* menghasilkan maltosa. *Acinetobacter sp* menghasilkan maltosa dan maltotriosa.

Pada uji hidrolisis pati, mikroorganismenya ditumbuhkan pada media yang mengandung nutrisi dan pati. Mikroorganismenya yang mampu membentuk amilase dalam media yang mengandung zat pati, akan menghidrolisis pati yang ada pada medium uji sehingga terbentuk zona bening di sekitar daerah pertumbuhan mikroorganismenya dan diberi beberapa tetes iodine, bila medium masih mengandung pati maka akan tampak warna biru kehitaman di sekitar pertumbuhan bakteri, namun bila pati terhidrolisis, maka daerah-daerah yang tidak mengandung pati lagi akan tampak jernih (Prescott, 2017).

12. Uji Selulosa

Selulosa adalah polimer tidak bercabang dari glukosa yang dihubungkan melalui ikatan 1,4- β glikosida. Molekul lurus dengan unit glukosa rata-rata sebanyak 5000 ini beragregasi membentuk fibril yang terikat melalui ikatan hidrogen di antara gugus hidroksil pada rantai di sebelahnya. Serat selulosa yang mempunyai kekuatan fisik yang tinggi terbentuk dari fibril-fibril ini tergulung seperti spiral dengan arah-arah yang berlawanan menurut satu sumbu.



Gambar 6. 17 Rumus Bangun selulosa (Prescott, 2017)

Enzim selulase merupakan enzim *inducible*, yaitu enzim yang dihasilkan sebagai respon terhadap jenis makanan yang terdapat di dalam lingkungan pertumbuhan organisme penghasilnya. Enzim ini merupakan suatu kompleks enzim yang bekerja bersama-sama atau bertahap dalam menguraikan selulosa menjadi unit glukosa.

Kompleks enzim selulase mempunyai tiga komponen utama yang bekerja bersama-sama atau bertahap dalam menguraikan selulosa menjadi unit glukosa, yaitu:

- a. Endo-selulase yang memotong ikatan bagian dalam struktur kristal dari selulosa dan mengeluarkan unit selulosa dari rantai polisakarida.
- b. Ekso-selulase yang memotong 2-4 unit selulosa dari rantai akhir hasil produksi endo-selulase dan menghasilkan tetrasakarida atau disakarida seperti selobiosa.
- c. Selobiose atau β -glukosidase yang menghidrolisis produk dari ekso-selulosa menjadi monosakarida.

Tiga jenis reaksi yang dikatalisis oleh selulase :

- a. Memotong interaksi nonkovalen dalam bentuk ikatan hidrogen yang ada dalam struktur kristal selulosa oleh enzim endo-selulase,
- b. Hidrolisis serat selulosa menjadi sakarida yang lebih sederhana oleh ekso-selulase,
- c. Hidrolisis disakarida dan tetrasakarida menjadi glukosa oleh enzim β -glukosidase.

Uji selulase bertujuan untuk mengidentifikasi mikroba yang dapat mencerna selulosa menjadi sakarida yang lebih sederhana. Uji positif ditandai dengan tumbuhnya mikroba pada media luria agar (LA) yang mengandung karboksimetilselulosa dan membentuk zona bening di sekitar daerah inokulasi mikroba pada media .

13. Uji Protease

Bakteri proteolitik adalah bakteri yang mampu menghasilkan enzim proteinase ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel. Semua bakteri mempunyai enzim protease di dalam sel, tetapi tidak semua bakteri mempunyai enzim protease ekstraseluler. Bakteri proteolitik dapat digolongkan menjadi beberapa kelompok yaitu:

- a. Bakteri aerobik atau anaerobik, tidak membentuk spora, misalnya *Pseudomonas* dan *Proteus*.
- b. Bakteri aerobik atau anaerobik, membentuk spora, misalnya *Bacillus*.
- c. Bakteri anaerob pembentuk spora, misalnya sebagian spesies *Clostridium*

Protease ekstraseluler lebih dikenal dengan nama enzim proteolitik atau protease yang merupakan enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida-peptida kecil dan asam amino. Oleh karena yang dipecah adalah rantai peptida, maka enzim tersebut dinamakan juga peptidase. Berdasarkan cara pemotongan ikatan peptida, enzim peptidase dapat dibagi menjadi eksopeptidase dan endopeptidase.

Eksopeptidase bekerja pada kedua ujung molekul protein, yang terdiri dari dua jenis enzim yaitu karboksipeptidase dan amino peptidase. Karboksipeptidase dapat melepaskan asam amino yang memiliki gugus- COOH bebas pada ujung molekul protein sedangkan amino peptidase dapat melepaskan asam amino pada ujung lainnya yang memiliki gugus -NH₂ bebas.

Sedangkan enzim endopeptidase memecah protein pada tempat-tempat tertentu dalam molekul protein dan biasanya tidak mempengaruhi gugus yang terletak di ujung molekul protein. Endopeptidase bekerja spesifik memutuskan ikatan peptida pada asam amino tertentu dalam molekul protein, seperti :

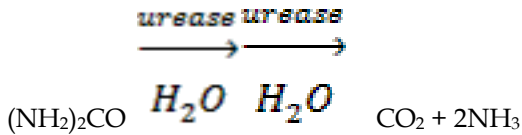
- a. Tripsin memutuskan ikatan peptida setelah asam amino arginin dan lisin dan bekerja optimum pada pH 8.
- b. Kimotripsin memutuskan ikatan peptida setelah asam amino fenilalanin, triptofan, tirosin dan bekerja lambat pemutusan ikatan peptida setelah asam amino asparagin, histidin, metionin dan lisin. Bekerja optimum pada pH 8.
- c. Elastase memotong setelah asam amino alanin, glisin, serin dan valin.
- d. Thermolisin memotong sebelum asam amino isoleusin, metionin, fenilalanin, triptofan, tirosin dan valin, selain itu juga dapat memotong setelah asam amino alanin, aspartan, histidin dan treonin.
- e. Pepsin memotong sebelum asam amino leusin, fenilalanin, triptofan, dan tirosin. Bekerja optimum pada pH 2.
- f. Endopeptidase V8 memotong setelah asam glutamat dan bekerja optimum pada pH 8

Uji protease bertujuan untuk mengidentifikasi mikroba yang dapat menghasilkan enzim protease atau mikroba yang dapat menghidrolisis protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida-peptida kecil dan dari peptida-peptida kecil menjadi asam amino, seperti bakteri golongan *Actinomycetes*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium* dan *Proteus* serta jamur jenis *Phanerochaete chrysosporium*. Uji positif ditandai dengan tumbuhnya mikroba pada media luria agar (LA) yang mengandung susu skim dan membentuk zona bening di sekitar daerah inokulasi mikroba pada media (Baehaki dan Rinto, 2012).

14. Uji Urease

Enzim urease memiliki substrat spesifik yaitu urea. Enzim ini dapat mengkatalis reaksi pemecahan urea yang bersifat patogen dalam sel tumbuhan menjadi amonia dan CO₂. Urease ditemukan pada berbagai macam organisme seperti bakteri, jamur dan tumbuhan tingkat tinggi. Urease

pada lingkungan berperan dalam jalur sistem transportasi nitrogen (Kumar, 2008).



Reaksi enzimatik yang melibatkan enzim urease tergolong ke dalam reaksi hidrolisis dimana aktivitasnya dipengaruhi oleh adanya air. Uji urease atau uji hidrolisis urea digunakan untuk mengidentifikasi kelompok *Proteus* dari patogen-patogen gram negatif lainnya. Salah satu ciri khas *Proteus* ialah kemampuannya menghasilkan enzim urease yang dapat melepaskan amoniak dari molekul urea. Ciri ini tidak dimiliki oleh bakteri lain yang mungkin dikelirukan dengan *Proteus* (Dewi, 2013).

Medium yang digunakan dalam uji ini adalah kaldu urea yang merupakan larutan ekstrak khamir dan urea yang diberi larutan penyangga. Medium tersebut juga mengandung merah fenol sebagai indikator pH. Bila mikroba yang diidentifikasi menghasilkan urease, maka amonia yang dilepaskan ke dalam medium akan menaikkan pH. Bila pH menjadi makin tinggi maka merah fenol akan berubah warna dari kuning menjadi merah keunguan (Atlas, 2010).



Gambar 6. 18 Media Uji Urease dengan Hasil Reaksi Negatif (kiri) dan Hasil Reaksi Positif

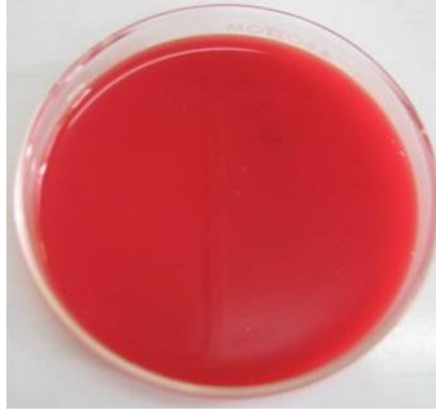
15. Uji Hemolisis

Uji hemolisis pada agar darah untuk mengetahui hemolisin yang dihasilkan bakteri. Hemolisis adalah kerusakan sel darah merah. Hemolisin adalah protein ekstraseluler yang menyebabkan hemolisis. Hemolisin dihasilkan beberapa bakteri Gram - seperti *Escherichia coli*, *Serratia* spp, *Proteus* spp, *Vibrio* spp, *Pasteurella* spp, *Pseudomonas aeruginosa* dan bakteri Gram + seperti *Streptococcus* spp, *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp, *Bacillus cereus*, *Clostridium tetani*. Kelompok bakteri yang dapat menghasilkan hemolisin. Kemampuan koloni bakteri untuk menginduksi hemolisis ketika tumbuh pada agar darah digunakan untuk mengklasifikasikan mikroorganisme tertentu. Hal ini terutama bermanfaat dalam mengklasifikasikan spesies streptokokus.

Visualisasi hemolisis sel darah merah pada agar darah menunjukkan sifat dari beberapa bakteri patogen seperti *Streptococcus* dan *Staphylococcus*. Aktivitas litik dari beberapa hemolisin yang dihasilkan oleh bakteri pada sel-sel darah merah bertujuan untuk pengambilan nutrisi, terutama zat besi, yang menjadi unsur utama bagi kelangsungan bakteri tersebut. Hemoglobin banyak terdapat pada sel darah merah, dengan melisis sel darah merah, maka hemoglobin akan terlepas dari sel darah merah dan pecah menjadi heme dan globin. Di dalam heme ada zat besi yang dibutuhkan bakteri tersebut. Efek hemolisis bagi hospes (manusia) dapat menyebabkan kondisi tertentu seperti anemia.

Hemolisin yang diproduksi oleh bakteri patogen ada yang tidak menyebabkan lisis secara signifikan pada sel darah merah selama infeksi, yang dikelompokkan dalam pola γ hemolisis. Hemolisin sebagian besar termasuk golongan protein, sebagian kecil ada yang termasuk rhamnolipids yang merupakan biosurfactants lemak.

Sebagian besar hemolisin menyebabkan lisis dari eritrosit dengan membentuk pori-pori dari berbagai diameter dalam membran. Adanya hemolisis ditunjukkan dengan zona jernih pada media agar darah.



Gambar 6. 19 Media Agar Darah (Blood Agar Plate =BAP)

Agar Darah adalah media diferensial digunakan untuk membedakan bakteri berdasarkan kemampuannya untuk melisiskan sel darah merah. BAP berisi darah domba 5%. Bakteri tertentu menghasilkan enzim hemolisin yang dapat melisiskan sel darah merah dalam BAP. Tiga jenis pola hemolisis adalah:

a. Beta hemolisis

Beta hemolisis berarti bahwa enzim hemolisin bakteri dapat melisiskan sel-sel darah secara total. Hasil pola β -hemolisis di media agar darah menampilkan zona jernih yang jelas di sekitar koloni bakteri.

β -hemolisis kadang-kadang disebut hemolisis lengkap, adalah lisis sel darah merah lengkap di media sekitar dan di bawah koloni dengan ditandai zona jernih yang jelas di sekitar koloni bakteri.. Streptolysin, sebuah eksotoksin, adalah enzim yang diproduksi oleh bakteri yang menyebabkan lisis lengkap sel darah merah. Ada dua jenis streptolysin: Streptolysin O (SLO) dan streptolysin S (SLS). Streptolysin O adalah cytotoxin oksigen-sensitif, disekresikan oleh Grup A streptokokus

yang paling (GAS), dan berinteraksi dengan kolesterol dalam membran sel eukariotik (sel darah merah dan putih terutama, makrofag, dan platelet), dan biasanya menghasilkan β -hemolisis di bawah permukaan agar darah. *Streptococcus pyogenes*, bakteri radang tenggorokan, adalah bakteri yang dapat menyebabkan β -hemolitik pada media agar darah.



Gambar 6. 20 Pola β -hemolisis pada Media Agar Darah

b. Alfa hemolisis

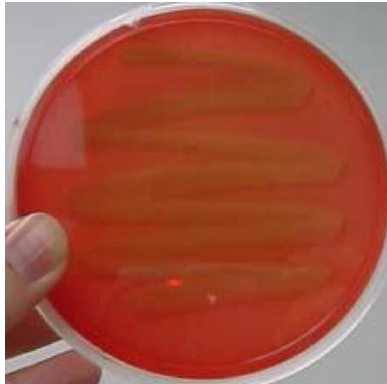
Alfa hemolisis berarti bahwa enzim hemolisin bakteri hanya memecah sebagian sel-sel darah (hemolisis tidak lengkap). Hasil α -hemolisis di media agar darah menampilkan zona kuning kehijauan di sekitar koloni bakteri menunjukkan hemolisis tidak lengkap. Alpha hemolisis disebabkan oleh hidrogen peroksida yang dihasilkan oleh bakteri, akan mengoksidasi hemoglobin sehingga menghasilkan methemoglobin yang berwarna hijau.



Gambar 6. 21 Pola α -hemolisis pada Media Agar Darah

c. Gamma hemolisis

Gamma hemolisis (γ -hemolisis) berarti tidak terjadi hemolisis, bahwa bakteri tidak berpengaruh pada sel-sel darah merah dan tidak ada perubahan warna medium (Walker, 2021).



Gambar 6. 22 Pola γ -hemolisis pada Media Agar Darah

DAFTAR PUSTAKA

- Ahern (2018) *Microbiology : a Laboratory Experience*.
- Atlas, R. M. (2010) *Handbook of Microbiological Media, Handbook of Microbiological Media*. CRC Press. doi: 10.1201/EBK1439804063.
- Baehaki, A. and Rinto (2012) 'Karakterisasi Protease dari Isolat Bakteri Asal Tumbuhan Rawa dari Indralaya', *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 15(1), pp. 59-65.
- Dewi, A. K. (2013) 'Isolasi, Identifikasi dan Uji Sensitivitas Staphylococcus aureus terhadap Amoxicillin dari Sampel Susu Kambing Peranakan Ettawa (PE) Penderita Mastitis Di Wilayah Girimulyo, Kulonprogo, Yogyakarta', *Jurnal Sain Veteriner*. doi: 10.2105/AJPH.45.9.1138.
- Gergonius, F. and Sine, Y. (2016) 'Isolasi Dan Uji Biokimia Bakteri Selulolitik Asal Saluran Pencernaan Rayap Pekerja (Macrotermes Spp.)', *Jurnal Pendidikan Biologi*, 1(2), pp. 27-29.
- Haryati, K. (2020) 'Microbiological Quality Testing of Smoked Yellow Tail Fish from Papua Youtefa Market', *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 23(3), pp. 486-494.
- Jawetz, Melnick, & A. (2007) *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology Twenty-Seventh Edition., Medical Microbiology*. Available at: <http://www.thieme-connect.de/products/ebooks/abstract/10.1055/b-0034-71555>.
- Juniawan, M. F. *et al.* (2023) 'Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Termofilik Dari Oil Sludge Asal Kalimantan Timur', *THE JOURNAL OF MUHAMMADIYAH MEDICAL LABORATORY TECHNOLOGIST*, 6(1), p. 18. doi: 10.30651/jmlt.v6i1.15898.
- Kathleen Park Talaro and Talaro, A. (2004) *Perspectives on Microbiology Emphasis of Foundations in Microbiology*. Available at: www.mcgraw-hill.com.

- Kumar, S. (2008) *Textbook of Microbiology*. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) LTD.
- Madigan, M. T. B. B. of M. *et al.* (2010) *Brock Biology of Microorganism*. 13th edn. Wageningen, Netherlands: Pearson Education, Inc. doi: 10.1088/1751-8113/44/8/085201.
- Prescott, H. (2017) 'Laboratory Exercise in Microbiology fifth edition', *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), pp. 1689-1699.
- Rahma, M., Djamaan, A. and Gustina (2010) 'Isolasi dan Identifikasi Mikroba Penghasil Antibiotika dari Sampel Lumpur Sungai Kampar, Riau', *Jurnal Ilmu Perairan (Aquatic Science)*, 8(2), pp. 1-11.
- Rifai, K. R. (2021) 'Uji Indole sebagai Kegiatan Penjaminan Mutu Tambahan pada Hasil Pengujian Coliform dalam Sampel Air Mineral', *Jurnal Teknologi Proses dan Inovasi Industri*, 6(1), pp. 1-6.
- Sopiah, N. *et al.* (2016) 'Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon Yang Berasal Dari Tanah Tercemar Minyak Bumi', *Jurnal Teknologi Lingkungan*, 12(3), p. 291. doi: 10.29122/jtl.v12i3.1238.
- Walker, J. M. (2021) *Staphylococcus aureus Methods and Protocols*. Edited by Kelly C. Rice IFAS. Humana Press.
- Wilson, W., Purwestri, Y. A. and Sembiring, L. (2017) 'Isolasi , Karakterisasi dan Skrining Antimikrobia Bakteri Endofit Tanaman Purwoceng (Pimpinella pruatjan Molk .)', 1(1), pp. 1-6.

BAB 7

PEMBUATAN, KOMPOSISI, DAN KEGUNAAN MEDIA BLOOD AGAR PLATE

Angriani Fusvita, S.Si., M.Si

A. Pendahuluan

Blood Agar Plate (BAP) merupakan salah satu contoh media padat umum, diperkaya dan diferensial karena dalam proses pembuatannya dilakukan penambahan darah yang telah didefibrinasi. Darah merupakan zat yang kaya nutrisi sehingga sebagian besar bakteri dapat tumbuh pada media yang mengandung darah. Media BAP digunakan untuk membedakan bakteri patogen berdasarkan kekuatan hemolitiknya pada sel darah merah. Media yang diperkaya ini mendukung pertumbuhan banyak organisme patogen tetapi pada saat yang sama memungkinkan karakterisasi bakteri yang berbeda berdasarkan pola hemolitiknya (Yeh *et al.*, 2009).

Pada umumnya media BAP dibuat dengan menambahkan darah domba yang telah didefibrinasi. Darah harus didefibrasi atau ditempatkan dalam wadah yang berisi antikoagulan untuk mencegah pembekuan (Russell *et al.*, 2006). Media agar darah dibuat dari media basal dengan penambahan darah 5-10% (defibrinasi) pada suhu 50-60°C (Djannatun *et al.*, 2008). Darah manusia tidak dianjurkan karena peningkatan kemungkinan paparan patogen yang ditularkan melalui darah manusia seperti HIV atau hepatitis (Buxton, 2016).

B. Komposisi Media BAP

Komposisi media tergantung Merek yang memproduksi media tersebut. Adapun komposisi media Blood agar Plate dalam 1 liter sebagai berikut:

1. Produksi Oxoid Unipath Media ini tersedia dalam bentuk bubuk

Agar	: 15 gr
Ekstrak Daging Sapi	: 10 gr
Pepton	:10 gr
NaCl	: 5 gr
Darah domba didefibrinasi	: 50 mL
Akuades	: 1000 mL (Atlas, 2010).

2. Produksi HiMedia yang tersedia dalam bentuk bubuk

Agar	: 15 gr
Ekstrak Daging Sapi	: 10 gr
Tritoptosa	:10 gr
NaCl	: 5 gr
Darah domba didefibrinasi	: 50 mL
Akuades	: 1000 mL (Atlas, 2010).

3. Produksi BD Diagnostic Systems dalam bentuk bubuk

Agar	: 15 gr
Pancreatic digest of casein	: 13 gr
Ekstrak Khamir	: 5 gr
NaCl	: 5 gr
Otot Jantung	: 2 gr
Darah domba defibrinasi	: 50 mL
Akuades	: 1000 mL (Atlas, 2010)

Agar Darah mengandung kasein dan pepton kedelai yang menyediakan nitrogen, asam amino, dan peptida yang diperlukan untuk pertumbuhan bakteri. Natrium klorida (NaCl) berfungsi memasok elektrolit penting dan menjaga keseimbangan osmotik. Darah domba memperkaya medium dengan menyediakan faktor pertumbuhan penting dan memungkinkan terjadinya reaksi hemolitik (Buxton, 2016).



Gambar 7. 1 Media Blood Agar sebelum dilakukan penggoresan pada media (Buxton, 2016)

C. Pembuatan Media BAP

1. Persiapan Media

a. Pembuatan Media dengan cara meracik bahan-bahan sesuai komposisi

Tambahkan komponen kecuali darah domba ke akuades hingga volumenya menjadi 950 mL dan Aduk rata. Panaskan dan sering diaduk serta didihkan selama 1 menit hingga larut sempurna. Autoklaf media selama 15 menit pada tekanan 1 atm dengan suhu 121°C. Dinginkan hingga 45°-50°C. Tambahkan 50,0 mL darah domba steril yang telah didifibrinasi secara aseptik. Mencampur menyeluruh dan tuangkan ke dalam cawan Petri steril (Atlas, 2010).

b. Membuat sesuai Produksi Mereknya dalam KIT Media Oxoid

Pada Kit medium BAP adalah 40 gr / liter akuades. Jadi untuk membuat 1 liter/1000 mL larutan dibutuhkan sebanyak 40 gr medium bubuk BAP yang dilarutkan kedalam 1 liter akuades. Timbang medium memakai timbangan analitik agar lebih presisi. Larutkan 40 gr medium kedalam 1 liter akuades dengan cara dipanaskan pada suhu 80°C memakai alat hot plate and sambil diaduk

dengan magnetik stirrer. Perhatikan medium harus larut dengan sempurna dan tidak meninggalkan gumpalan. Atur pH medium hingga mencapai 7.3 ± 0.2 . Tutup tabung erlenmeyer dengan rapat. Sterilisasi medium menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 Atm selama 15 menit. Setelah disterilisasi dan medium masih dalam kondisi cair (sekitar suhu $45\text{-}50^{\circ}\text{C}$) secara aseptik tambahkan 5% darah steril yang telah didefibrinasi. Setelah itu dituang ke masing-masing cawan petri sesuai kebutuhan (Use, 2021);(Oxoid, 2023).

c. Prosedur Kerja

- 1) Inokulasi dan gores spesimen sesegera mungkin setelah diterima di laboratorium.
- 2) Apabila bahan yang akan ditumbuhkan langsung dari swab kapas, maka gores kapas tersebut pada area kecil permukaan agar.
- 3) Inkubasi Cawan Petri secara aerobik, atau dalam 5-10% CO_2 , selama 18-24 jam pada suhu $33\text{-}37^{\circ}\text{C}$.
- 4) Periksa Cawan Petri untuk mengetahui morfologi koloni dan reaksi hemolitik yang khas.

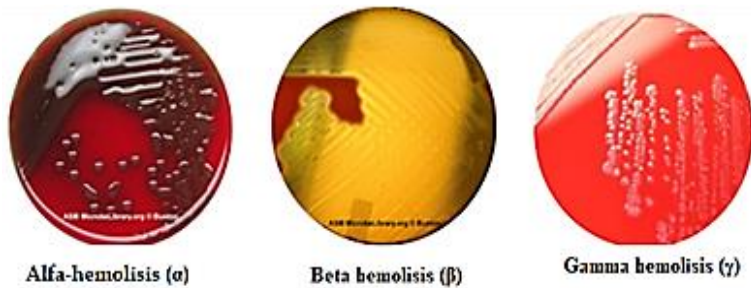
d. Interpretasi Hasil

Untuk membaca reaksi hemolitik pada cawan agar darah, cawan tersebut harus didekatkan pada sumber cahaya dan diamati dengan cahaya yang berasal di belakang (cahaya yang ditransmisikan). Adapun interpretasi sebagai berikut:

- 1) Alfa-hemolisis (α) \rightarrow terjadi karena adanya reduksi hemoglobin sel darah merah menjadi metahemoglobin dan menyebabkan perubahan warna medium disekitar koloni bakteri menjadi berwarna hijau atau cokelat. Contoh bakteri alfa-hemolitik adalah *Streptococcus pneumoniae*.
- 2) Beta hemolisis (β) \rightarrow didefinisikan sebagai lisis sel darah merah yang sempurna oleh aktivitas bakteri sehingga terbentuknya Zona bening disekitar pertumbuhan koloni bakteri. Contoh bakteri Beta

hemolisis (β) adalah *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* dan *Listeria monocytogenes*.

- 3) Gamma hemolisis (γ) →ditandai dengan tidak adanya perubahan warna medium disekitar pertumbuhan koloni bakteri. Zona bening tidak terbentuk karena tidak adanya lisis eritrosit oleh aktivitas bakteri. Contoh bakteri gamma-hemolitik adalah *Enterococcus faecalis* (Buxton, 2016).



Gambar 7. 2 Interpretasi hasil pada Media Blood Agar Plate (Buxton, 2016)

D. Manfaat Media BAP

Blood Agar Plate dibuat dengan penambahan darah steril yang dimanfaatkan untuk isolasi, kultur dan deteksi aktivitas hemolitik bakteri *Streptococcus* dan mikroorganisme berbahaya lainnya (Atlas, 2010).

Agar Darah atau Blood Agar merupakan salah satu jenis media yang diperkaya yang berfungsi untuk menumbuhkan bakteri atau mikroorganisme dengan ciri-ciri pertumbuhan yang lambat dan memerlukan nutrisi yang tinggi. Agar Darah awalnya hanya media basal umum yang kemudian ditambahkan 5% darah merah/serum darah yang diambil dari domba. Misalnya *Haemophilus influenzae*, bakteri penyebab flu, *Streptococcus pneumoniae*, bakteri penyebab pneumonia, dan *Neisseria gonorrhoe*, bakteri penyebab penyakit kelamin (Buxton, 2016).

Daya lisis bakteri *Streptococcus* terhadap darah merupakan salah satu cara untuk pengelompokan bakteri tersebut. Selain itu juga, strain *Streptococcus* yang menyebabkan hemolisis selalu dihubungkan dengan kemampuan kuman menyebabkan infeksi (Djannatun *et al.*, 2008). Untuk darah domba menjadi media standar sebagai pertumbuhan untuk mengidentifikasi jenis bakteri dan sebagai media untuk menguji hemolisis dari berbagai bakteri patogen. Darah domba mengandung protein, lemak, dan karbohidrat. Darah domba dewasa normal mengandung 9,0 - 11,1 eritrosit, 11,6 - 13,0 hemoglobin, dan 32,0 - 37,0 hematokrit. Jumlah eritrosit juga dipengaruhi oleh nutrisi. Adanya eritrosit menyebabkan darah domba dapat digunakan sebagai bahan tambahan media BAP yang berfungsi untuk melihat hemolisis (Turista & Puspitasari, 2019).

E. Penyimpanan dan Pembuangan Media BAP

Simpan media dalam bentuk KIT antara suhu 10-30 ° C dalam wadah tertutup rapat dan gunakan media sebelum tanggal kadaluarsa yang tertera pada label. Simpan media pada cawan petri yang telah disiapkan pada 2 - 8 ° C. Media bersifat higroskopis sehingga jangan dibiarkan dalam udara terbuka dalam waktu yang lama. Apabila disimpan dalam udara terbuka maka akan membentuk gumpalan, hal ini juga akan mempengaruhi kualitas media tersebut. Simpan media di tempat berventilasi kering area terlindung dari suhu ekstrem dan sumber api. Pembuangan media yang telah digunakan untuk menumbuhkan bakteri uji yaitu dengan cara media didekontaminasi terlebih dahulu sesuai standar laboratorium sebelum dicampur dengan limbah lainnya (Oxoid, 2023).

DAFTAR PUSTAKA

- Atlas, R. M. (2010). Handbook of Microbiological Media. In *Handbook of Microbiological Media*. <https://doi.org/10.1201/ebk1439804063>
- Buxton, R. (2016). Blood Agar Plates and Hemolysis Protocols. *American Society for Microbiology, May 2019*, 1–9.
- Djannatun, T., Rochani, J. T., Wikaningrum, R., & Widiyanti, D. (2008). Pemanfaatan darah manusia yang kadaluarsa sebagai pengganti darah domba dalam pembuatan media Agar Darah Plat (ADP) The use of expired human blood as substitution of the sheep blood in preparation of Blood Agar Media (BAM). *Jurnal Kedokteran Yarsi*, 16(2).
- Oxoid. (2023). *Dehydrated Culture Media*. http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0055
- Russell, F. M., Biribo, S. S. N., Selvaraj, G., Oppedisano, F., Warren, S., Seduadua, A., Mulholland, E. K., & Carapetis, J. R. (2006). As a bacterial culture medium, citrated sheep blood agar is a practical alternative to citrated human blood agar in laboratories of developing countries. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(9), 3346–3351. <https://doi.org/10.1128/JCM.02631-05>
- Turista, D. D. R., & Puspitasari, E. (2019). The Growth of *Staphylococcus aureus* in the blood agar plate media of sheep blood and human blood groups A, B, AB, and O. *Jurnal Teknologi Laboratorium*, 8(1), 1–7. <https://doi.org/10.29238/teknolabjournal.v8i1.155>
- Use, I. (2021). Blood Agar Base (Infusion Agar). *Difco™ & BBL™ Manual, 2nd Edition User Quality Control Identity Specifications*, 2.

Yeh, E., Pinsky, B. A., Banaei, N., & Baron, E. J. (2009). Hair sheep blood, citrated or defibrinated, fulfills all requirements of blood agar for diagnostic microbiology laboratory tests. *PLoS ONE*, 4(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006141>

BAB 8

PEMBUATAN, KOMPOSISI, DAN KEGUNAAN MEDIA MAC CONKEY

M. Atik Martsiningsih, S.Si., M.Sc

A. Pendahuluan

Mikroorganisme terutama bakteri membutuhkan nutrisi agar tetap tumbuh. Pemiakan mikroorganisme memerlukan suatu medium yaitu bahan yang terdiri dari campuran makanan atau zat gizi alami atau buatan (sintetis) yang dibutuhkan bakteri untuk kultur *in vitro* di laboratorium. Media tanam benih mengandung banyak komponen berbeda yang disebut nutrisi untuk mendukung pertumbuhan bakteri. Nutrisi tersebut termasuk sumber energi, bahan penyusun seluler, dan akseptor elektron untuk reaksi bioenergi (reaksi yang menghasilkan energi). Namun, inhibitor terkadang digunakan dalam persiapan media kultur, yang dapat mencegah pertumbuhan bakteri (Kurniati & Kalsum, 2018). Lazimnya, medium biakan berisi air, sumber energi zat hara sebagai sumber karbon, nitrogen, sulfur, fosfat, oksigen, hydrogen serta unsur-unsur sekelumit (trace element). Dalam bahan dasar medium dapat pula ditambahkan faktor pertumbuhan berupa asam amino, vitamin atau nukleotida (Waluyo, 2016).

Media kultur bakteri adalah persiapan cair atau padat untuk membudidayakan, menumbuhkan, mentransfer, dan menyimpan bakteri. Berdasarkan jenis kimia dan fisika, medium dapat dikategorikan sebagai medium sintetis (terdefinisi) dan medium kompleks. Media sintetis adalah media di mana semua bahan kimia digambarkan dengan baik. Perlu ditekankan bahwa

media apa pun yang mengandung tripton, pepton, dan ekstrak daging sapi bukanlah media sintesis karena komponen kimianya tidak dikenal di dalamnya. Media yang mengandung bahan apa pun dengan komponen kimia yang tidak diketahui disebut media kompleks (Shen & Zhang, 2022). Kultur bakteri murni juga digunakan untuk mengevaluasi virulensinya, sensitivitasnya terhadap terapi antibiotik, dan untuk mengurutkan genomnya, untuk memfasilitasi pemahaman dan pengobatan penyakit yang menyebabkan bakteri tersebut terinfeksi (Jung & Hoilat, 2022).

Berdasarkan jenis fungsionalnya, medium dapat dikategorikan sebagai medium pendukung, medium selektif, dan medium pembeda. Media pendukung, seperti kaldu nutrisi, kaldu kedelai triptik, dan agar kedelai triptik dapat membudidayakan banyak bakteri kecuali bakteri sukar tumbuh. Media selektif yang mengandung bahan-bahan tertentu (garam empedu, kristal violet) mendukung pertumbuhan bakteri tertentu atau kelompok bakteri tertentu. Media diferensial adalah media yang membedakan berbagai kelompok bakteri berdasarkan karakteristik biologisnya, biasanya reaksi biokimia yang menghasilkan perubahan warna koloni. Di bawah ini merupakan tiga media selektif dan/atau membedakan (Shen & Zhang, 2022).

B. Macam-macam Media

Menurut Suarjana dkk., (2017) media memiliki beberapa jenis yaitu:

1. Berdasarkan Bentuknya

a. Media Padat

Media padat menjadi padat karena mengandung 15% bahan penggumpal. Media tegak, miring, dan lempeng adalah tiga jenis media yang berbeda berdasarkan bentuk dan jenisnya. Pada umumnya media lempeng digunakan untuk mengisolasi mikroorganisme pertumbuhan bakteri dan jamur.

b. Media Setengah Padat atau Semisolid

Media semisolid memiliki konsistensi kenyal atau tidak padat dan tidak cair serta mengandung agar sekitar 0,3-0,4%. Media ini biasanya digunakan untuk mengamati pergerakan bakteri.

c. Media Cair

Media cair biasanya digunakan untuk mengidentifikasi berbagai jenis pertumbuhan bakteri, seperti kekeruhan yang seragam, pembentukan endapan berpasir atau pembentukan benang kapiler. Media cair merupakan media yang belum ditambahkan bahan koagulasi atau agar sehingga konsistensinya cair.

2. Berdasarkan Komposisi

a. Media alami atau non sintesis

Media alami terdiri dari bahan-bahan alami yang komposisinya tidak diketahui. Media ini biasanya terbuat dari ekstrak bahan dasar seperti daging, telur, tomat, kentang, dll.

b. Media Semi sintesis

Kaldu nutrisi yang terdiri dari pepton, natrium klorida, ekstrak daging, dan aquades merupakan contoh media semi sintesis.

c. Media Sintesis

Media sintesis adalah media yang terdiri dari senyawa-senyawa kimia. Misalnya: Salmonella-Shigella agar, MacConkey agar, dll.

3. Berdasarkan Fungsi

a. Media Umum

Media umum adalah media yang digunakan untuk menumbuhkan semua jenis bakteri, baik gram positif maupun gram negatif. Pada media padat berupa agar-agar, mikroorganisme yang diisolasi berkembang menjadi koloni tertentu yang dapat dibedakan berdasarkan bentuk, warna, diameter dan tepi koloni. Misalnya, media yang umum adalah nutrient agar atau nutrient cair.

b. Media Diferensial

Media diferensial merupakan media dasar yang digunakan untuk membiakkan bakteri dan digunakan untuk melihat sifat pertumbuhannya. Misalnya blood agar. Blood agar sering digunakan untuk membiakkan bakteri secara umum, namun ideal untuk membiakkan bakteri seperti koksidirosis, dan haemophilus.

c. Media Diperkaya

Media ini biasa digunakan untuk membiakkan bakteri Salmonella dari sampel tinja pasien. Pertumbuhan bakteri coliform yang ada di saluran pencernaan hewan dan manusia akan dihambat oleh selenite atau tetrathionate, jika tidak maka salmonella dapat berkembang. Waktu inkubasi optimal untuk kultur dalam media pengayaan adalah 18 jam pada suhu 37°C.

d. Media Selektif

Media selektif digunakan untuk pertumbuhan bakteri tertentu karena mengandung zat inhibitor yang mencegah pertumbuhan bakteri lain. Pada media MacConkey agar terdapat zat inhibitor garam empedu (bile salt), yang menghentikan pertumbuhan bakteri gram positif tetapi mempercepat pertumbuhan bakteri gram negatif. Bakteri yang memfermentasi laktosa berwarna pink pada media MacConkey agar dan SSA, tetapi bakteri yang tidak memfermentasi laktosa tidak berwarna. Hal ini disebabkan oleh fakta bahwa neutral red indicator dalam suasana asam berubah menjadi merah muda, sementara dalam suasana basa tidak berwarna.

e. Media Biokimiawi dan Gula-gula

Media biokimiawi dan gula-gula digunakan untuk mengidentifikasi sifat biokimiawi mikroorganisme dengan cara melakukan inokulasi pada media tertentu.

Beberapa contoh media yang sering digunakan dalam mikrobiologi :

1. Triple Sugar Iron Agar (TSIA): Media TSIA biasanya digunakan sebagai langkah pertama untuk mengidentifikasi

bakteri, terutama Enterobacteriaceae. Tujuan penanaman pada media TSIA adalah untuk mengetahui sifat fermentasi, produksi H₂S, dan gas.

2. Sulfide Indol Motility (SIM): Media SIM semisolid digunakan untuk mengukur produksi H₂S, indol, dan motilitas atau pergerakan bakteri. Produksi indol dapat diketahui dengan meneteskan 1-3 tetes reagen kovacs atau Erlich ke dalam biakan bakteri. Permukaan biakan akan berwarna merah jika hasil indol positif.
3. Media Methyl red-Voges Proskauer (MRVP): Media MRVP ditetesi dengan masing-masing biakan bakteri untuk menguji sifat bakteri yang menghasilkan asam. Warna merah pada permukaan media menunjukkan hasil positif.
4. Media Simmon citrat untuk mengetahui pertumbuhan bakteri dengan menggunakan citrate sebagai karbon organik.
5. Media gula-gula: Bakteri biasanya memfermentasi karbohidrat tertentu, dan penting untuk mengetahui karakteristik bakteri. Tabung Durham biasanya dimasukkan ke dalam media saat membuat gula-gula untuk mengetahui apakah gas yang dihasilkan oleh fermentasi muncul. Beberapa contoh media gula-gula termasuk glukosa, laktosa, sukrosa, trehalosa, inositol, dan sebagainya.

C. Sejarah Media Mac Conkey

MacConkey agar adalah medium kultur mikrobiologi yang pertama kali dikembangkan oleh seorang ilmuwan bernama Alfred Theodore MacConkey pada tahun 1900, menjadikannya media diferensial padat pertama yang diformulasikan pada abad ke-20. Medium ini memiliki tujuan utama untuk memisahkan dan mengidentifikasi bakteri gram negatif. Motivasi utama di balik pengembangan medium ini adalah untuk memungkinkan identifikasi yang lebih baik dari bakteri patogen dari famili Enterobacteriaceae. Medium ini dirancang untuk memfasilitasi identifikasi dan isolasi bakteri

patogen, terutama di lingkungan klinis dan laboratorium mikrobiologi.

D. Pengertian Media Mac Conkey

MacConkey agar merupakan salah satu media pertumbuhan yang paling banyak digunakan di laboratorium mikrobiologi. Media ini termasuk dalam media selektif dan diferensial karena digunakan untuk membiakkan bakteri gram negatif secara selektif dan membedakannya berdasarkan sifat fermentasinya. Banyak bakteri gram negatif patogen yang dapat dibedakan dengan MacConkey agar (yaitu sampel tinja), terutama anggota keluarga Enterobacteriaceae dan bakteri gram negatif marga *Pseudomonas*.

Potensi diagnostiknya sangat besar. MacConkey agar benar-benar merupakan basis serbaguna di mana basis tambahan, seperti sorbitol, dapat dimasukkan untuk diferensiasi lebih lanjut. Contoh lainnya adalah penambahan antibiotik untuk memeriksa resistensi obat. Di unit perawatan intensif, pemantauan resistensi multi-obat pada bakteri gram negatif merupakan tindakan pengawasan yang penting. Bakteri enterik gram negatif adalah penyebab umum gastroenteritis bakterial, ditandai dengan diare, muntah, dan kram perut. *Escherichia coli* dan *Campylobacter jejuni* adalah patogen paling umum yang menyebabkan gastroenteritis bakterial. Jika dicurigai gastroenteritis bakterial, spesimen dapat diambil dari pasien dan dikultur dengan berbagai bakteri, termasuk media MacConkey. Media MacConkey membantu mengidentifikasi patogen dengan menyediakan profil fermentasi laktosa dari spesies bakteri gram negative (Jung & Hoilat, 2022).

Media ini mengandung senyawa seperti kristal violet dan garam empedu, yang menghambat pertumbuhan bakteri gram positif. Adanya laktosa dan indikator pH merah netral memungkinkan identifikasi koloni sebagai fermentor laktosa atau non-fermentor yang membantu diferensiasi koloni. Selain itu, MacConkey agar dapat membedakan berbagai jenis basil enterik berdasarkan kemampuannya memfermentasi laktosa.

Sifat MacConkey yang selektif dan berbeda memungkinkan penggunaannya untuk aplikasi klinis dan penelitian. Fermentasi laktosa menghasilkan asam organik, terutama asam laktat, yang menurunkan pH media agar. MacConkey agar mengandung indikator pH yang berubah warna menjadi merah muda dalam kondisi asam. Oleh karena itu, bakteri gram negatif pemfermentasi laktosa (bakteri pemfermentasi laktosa) akan membentuk koloni berwarna merah muda, sedangkan bakteri non-fermentasi laktosa akan membentuk koloni berwarna putih susu atau tidak berwarna. Bahkan dalam fermentor laktosa, spesies akan memiliki tingkat pertumbuhan yang berbeda. Laju pertumbuhan juga merupakan cara untuk membedakan organisme di media MacConkey agar.

Beberapa spesies membentuk kapsul dengan bentuk berbeda. Secara umum, hanya bakteri gram negatif yang akan tumbuh pada agar MacConkey, dan bakteri tersebut akan terlihat berbeda tergantung pada kemampuannya memfermentasi laktosa, serta kecepatan fermentasi dan ada tidaknya kapsul. Hal ini menjadikan MacConkey agar alat yang ampuh untuk membedakan dan mengisolasi spesies bakteri dari sumber sampel (Jung & Hoilat, 2022).

E. Prinsip Mac Conkey

Sifat selektif dan diferensiasinya memungkinkan bakteri gram negatif tumbuh dan berdiferensiasi berdasarkan kemampuan spesies bakteri yang dapat memfermentasi laktosa (laktosa positif) dan spesies bakteri yang tidak dapat memfermentasi laktosa (laktosa negatif). Media ini mengandung gelatin yang dicerna oleh pankreas, serta pepton dan kasein dari daging, yang menyediakan nutrisi penting, vitamin, dan unsur nitrogen yang diperlukan untuk pertumbuhan mikroba. Laktosa monohidrat berfungsi sebagai sumber karbohidrat yang dapat difermentasi. Selektivitas MacConkey agar dipastikan dengan adanya kristal violet dan garam empedu dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan bakteri gram negatif yang tumbuh cepat seperti *Neisseria* dan *Pasteurella*. Kapasitas

menahan empedu dari bakteri gram negatif sebagian disebabkan oleh membran luar yang relatif tahan empedu, yang menyimpan membran sitoplasma yang peka terhadap empedu. Mekanisme resistensi empedu spesifik spesies lainnya juga telah diidentifikasi (Allen, 2005).

Strain bakteri pemfermentasi laktosa menggunakan laktosa sebagai sumber karbon dan menghasilkan asam sebagai produk sampingan. Produksi asam ini mengurangi pH medium. Merah netral, indikator pH, diserap oleh koloni yang memfermentasi laktosa, menghasilkan warna merah atau merah muda. Jika pH medium turun di bawah 6,8, pewarna akan memudar, sehingga lebih mudah untuk membedakan strain yang memfermentasi laktosa. Sebaliknya, bakteri yang tidak memfermentasi laktosa seperti *Salmonella*, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Shigella* sp. tidak dapat menggunakan laktosa. Sebaliknya, mereka menggunakan pepton sebagai sumber karbon, yang menyebabkan produksi amonia, yang meningkatkan pH media agar. Lingkungan basa ini menyebabkan koloni yang tidak memfermentasi laktosa tampak putih atau tidak berwarna pada pelat, sedangkan agar-agar yang mengelilingi bakteri relatif jernih. Koloni-koloni ini mungkin berwarna kuning sampai coklat dengan bagian tengah berwarna gelap (Microbiologynote, 2023).

F. Fungsi Media Mac Conkey

MacConkey agar digunakan untuk mengisolasi bakteri gram negatif dan untuk membedakan antara bakteri gram negatif, pemfermentasi laktosa, dan non-laktosa. Media ini juga biasa digunakan untuk membedakan bakteri berdasarkan kemampuannya memfermentasi gula selain laktosa. Dalam hal ini, laktosa dalam medium diganti dengan gula lain. Media yang dimodifikasi ini digunakan untuk membedakan bakteri gram negatif atau untuk membedakan fenotipe dengan mutasi yang memberikan kemampuan berbeda untuk memfermentasi gula selain laktosa. Memberikan kemampuan yang berbeda untuk memfermentasi gula tertentu (Allen, 2005).

Media ini berfungsi sebagai alat penting dalam mikrobiologi klinis dan diagnostik, karena memungkinkan isolasi dan identifikasi bakteri patogen potensial, terutama yang termasuk dalam keluarga Enterobacteriaceae. Selektivitas MacConkey agar berasal dari kemampuannya untuk menghambat pertumbuhan bakteri gram positif, sementara memungkinkan pertumbuhan bakteri gram negatif. Dengan menghambat pertumbuhan bakteri gram positif melalui keberadaan kristal violet dan garam empedu, MacConkey agar memastikan bahwa hanya bakteri gram negatif yang dapat dibiakkan dan dipelajari (Prajadkk., 2021). Sifat selektif ini sangat penting ketika membiakkan bakteri dari saluran pencernaan, karena basil gram negatif umumnya ditemukan di wilayah ini. MacConkey agar juga digunakan untuk membedakan antara strain *E. coli* yang berbeda, terutama *E. coli* patogen O157: H7 yang tidak dapat memfermentasi sorbitol (Cho & Yoon, 2014). Media Mac Conkey banyak digunakan dalam laboratorium mikrobiologi klinis untuk:

1. Identifikasi Bakteri Gram Negatif Dari Famili Enterobacteriaceae.

 Seperti *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., dll. Media ini mengandung garam empedu dan kristal violet yang berfungsi sebagai agen selektif yang menghambat pertumbuhan bakteri gram positif.

2. Diferensiasi Bakteri Fermentasi Laktosa dan Non-fermentasi.

 Media ini mengandung laktosa sebagai sumber karbon dan energi serta neutral red sebagai indikator pH. Bakteri yang mampu memfermentasi laktosa akan menghasilkan asam yang menurunkan pH media dan membuat koloni dan media berwarna merah atau merah muda. Bakteri yang tidak mampu memfermentasi laktosa tidak akan mengubah warna media.

3. Mengidentifikasi patogenik dari non-patogenik dalam sampel klinis.

Media ini dapat digunakan untuk mendeteksi adanya bakteri patogen usus seperti *Salmonella* sp. dan *Shigella* sp. yang tidak memfermentasi laktosa dan membentuk koloni transparan atau tidak berwarna pada media. Bakteri non-patogen seperti *Escherichia coli* dan *Klebsiella* sp. yang memfermentasi laktosa akan membentuk koloni merah atau merah muda pada media.

G. Komposisi Media MacConkey

Komposisi MacConkey agar terdiri dari (Allen, 2005):

Pepton (Difco) atau Gelysate (BBL)	17 gr
Pepton proteosa (Difco) atau Polipepton (BBL)	3 gr
Laktosa	10 gr
NaCl	5 gr
Kristal Violet	1 gr
Merah Netral	30 mg
Garam Empedu	1,5 gr
Agar	13,5 gr
Air Suling	1 L

Sesuaikan pH hingga 7,1 +/- 0,2. Rebus untuk melarutkan agar. Sterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit.

Komponen utama media MacConkey adalah kristal violet, garam empedu, laktosa, dan merah netral (indikator pH). Kristal violet dan garam empedu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif, tetapi mendukung pertumbuhan organisme gram negatif untuk membentuk koloni pada MacConkey agar. Oleh karena itu, hanya spesies gram negatif yang dapat membentuk koloni pada MacConkey agar. Kehadiran laktosa dan merah netral (indikator pH) memungkinkan diferensiasi bakteri gram negatif apakah mereka menggunakan laktosa selama fermentasi (Shen & Zhang, 2022). Laktosa dalam agar merupakan sumber fermentasi. Mikroorganisme yang memfermentasi laktosa menghasilkan asam organik, khususnya asam laktat, yang menurunkan pH. Merah netral adalah indikator pH yang

berubah dari putih pucat menjadi merah terang atau merah muda ketika pH turun di bawah 6,8.

H. Cara Pembuatan

Pembuatan MacConkey Agar:

1. Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
2. Timbang MacConkey agar sebanyak 18,03 g dengan timbangan analitik, dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan aquades sebanyak 350 mL.
3. Panaskan dan diaduk hingga mendidih dan homogen.
4. Ukur pH larutan tersebut (pH 7).
5. Disterilisasi ke dalam otoklaf 0,5 atm dengan suhu 121°C selama 15 menit.
6. Lalu dituangkan ke dalam cawan petri, lakukan sebelum media menjadi dingin dan mengental.
7. Didiamkan hingga memadat dan siap untuk menginokulasi sampel klinis, produk makanan, sampel air atau sampel lain yang diinginkan untuk mengisolasi dan membedakan bakteri tertentu berdasarkan kemampuannya memfermentasi laktosa (Toruan dkk., 2023).

I. Interpretasi Hasil Mac Conkey

Tergantung pada kemampuannya memfermentasi laktosa, spesies yang berbeda akan menghasilkan koloni dengan tampilan yang berbeda-beda pada media MacConkey. Inilah yang membuat MacConkey agar memiliki sifat diferensiasi. Bakteri gram negatif tumbuh pada media diferensial berdasarkan kemampuannya memfermentasi laktosa.

Berikut adalah interpretasi secara umum:

1. Fermentasi Laktosa (Laktosa Positif): Koloni Merah-Merah Muda.

Spesies yang memfermentasi laktosa menghasilkan koloni berwarna merah muda. Fermentasi laktosa menghasilkan produk sampingan asam yang menurunkan pH, mengubah indikator pH menjadi merah muda. Bakteri pemfermentasi laktosa menurunkan pH medium, dan

perubahan pH terdeteksi dengan warna merah netral, merah pada pH di bawah 6,8. Ketika pH turun, warna merah netral diserap oleh bakteri, muncul sebagai koloni merah muda hingga merah pada agar. Warna lingkungan sekitar bakteri gram negatif juga bisa berubah. Bakteri yang memfermentasi laktosa dengan kuat menghasilkan asam yang cukup untuk mengendapkan garam empedu, menghasilkan lingkaran merah muda pada media yang mengelilingi koloni individu atau area pertumbuhan yang konfluen. Bakteri dengan fermentasi laktosa rendah yang ditumbuhkan pada MacConkey agar akan tetap berwarna merah muda hingga merah tetapi tidak memiliki lingkaran merah muda pada media sekitarnya (Allen, 2005).

Contoh spesies laktosa positif: *Escherichia coli*, *Enterobacteria*, *Klebsiella*.

2. Non-Fermentasi Laktosa (Laktosa Negatif): Koloni Tidak Berwarna Atau Putih Susu.

Spesies bakteri gram negatif masih akan membentuk koloni, tetapi koloni ini akan terlihat putih atau tidak berwarna karena tidak ada perubahan pH tanpa adanya fermentasi laktosa. Bakteri gram negatif yang tumbuh pada MacConkey agar tetapi tidak memfermentasi laktosa akan tampak tidak berwarna pada medium dan agar di sekitar bakteri tersebut relatif jernih. Laktosa dapat digantikan dalam medium oleh gula lain, dan kemampuan bakteri gram negatif untuk memfermentasi gula pengganti ini dapat dideteksi dengan cara yang mirip dengan fermentasi laktosa (Allen, 2005).

Contoh spesies laktosa negatif: *Salmonella*, *Proteus*, *Yersinia*, *Pseudomonas*.

Selain itu, terdapat beberapa karakteristik khusus dalam menginterpretasikan hasil:

1. Tidak ada koloni
Bakteri gram positif tidak membentuk koloni pada media MacConkey.
2. Lambat

Fermentor laktosa yang lemah akan membentuk koloni lebih lambat daripada yang lain.

Contoh fermentor laktosa yang lemah: *Serratia*, *Citrobacter*.

Contoh fermentor laktosa yang lambat: *Enterobacter*, dapat muncul sebagai koloni tidak berwarna.

3. Muroid (koloni yang lengket dan lembab)

Bakteri yang dienkapsulasi menghasilkan kapsul menggunakan laktosa. Ini menghasilkan koloni yang lengket dan lembab.

Contoh spesies yang membentuk koloni berlendir: *Klebsiella*, *Enterobacter* (Jung & Hoilat, 2022).

J. Kontrol Kualitas Media MacConkey

Pengendalian mutu MacConkey agar mencakup pengujian sterilitas dan pengujian kinerja untuk memastikan keandalan dan keakuratan media. Di bawah ini adalah langkah-langkah dan organisasi yang digunakan untuk pengendalian kualitas:

1. Uji sterilitas:

Pelat MacConkey agar yang tidak diinokulasi diinkubasi selama 48 jam pada suhu 35-37°C. Setelah masa inkubasi, kotak harus selalu bersih, menunjukkan tidak ada kontaminasi atau pertumbuhan. Jika terdapat koloni, hal ini menunjukkan kegagalan sterilitas dan seluruh betas harus ditolak.

2. Uji kinerja:

Strain bakteri standar yang diketahui diinokulasi ke dalam cawan MacConkey Agar. Pelat kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 35-37°C dan diamati pertumbuhan dan karakteristik koloninya.

K. Kelemahan Media MacConkey

Menurut *Microbiology Note* (2023), MacConkey agar memiliki beberapa keterbatasan yaitu:

1. Karakteristik kolonial yang diamati oleh MacConkey hanya memungkinkan identifikasi hipotesis tertentu. Untuk

mengidentifikasi definitif, sub-kultur tambahan dan tes konfirmasi seperti tes biokimia diperlukan. MacConkey berfungsi sebagai alat skrining dan menghindari identifikasi definitif.

2. Beberapa strain bakteri tumbuh dengan buruk atau tidak tumbuh sama sekali pada MacConkey agar, sehingga dapat menyebabkan hasil yang tidak akurat. Tidak adanya pertumbuhan pada media tidak selalu berarti bakteri target tidak ada. Dalam situasi seperti ini, mungkin diperlukan media atau teknik lain untuk mengisolasi dan mengidentifikasi dengan benar.
3. Pertumbuhan dan pemulihan beberapa strain bakteri gram negatif dapat terganggu oleh inkubasi MacConkey agar dengan konsentrasi karbon dioksida (CO₂) yang tinggi. Hal ini dapat menyebabkan sensitivitas bakteri menjadi lebih rendah atau spesies bakteri tertentu tidak dapat ditemukan, sehingga mengurangi keakuratan hasil.
4. Jenis bakteri *Proteus* tertentu dapat berkerumun pada MacConkey agar. Pergeseran bakteri yang cepat dan terkoordinasi melintasi permukaan agar memungkinkan pertumbuhan bakteri menyebar di luar batas koloni. Fenomena ini dapat mengurangi keakuratan hasil dan membuat evaluasi dan penghitungan koloni individu lebih sulit.

L. Kesimpulan

Media MacConkey adalah media selektif dan diferensial yang digunakan untuk mengisolasi dan membedakan bakteri gram negatif berdasarkan kemampuan mereka memfermentasi laktosa. Media ini bersifat selektif karena garam empedu dan kristal violet menghambat pertumbuhan bakteri gram positif. Selain itu media MacConkey bersifat diferensial karena merah netral sebagai indikator pH akan berubah warna menjadi merah jika bakteri memfermentasi laktosa menjadi asam. Sehingga bakteri yang dapat memfermentasi laktosa akan membentuk koloni berwarna merah atau merah muda, sedangkan bakteri yang tidak dapat memfermentasi laktosa akan membentuk

koloni transparan yang tidak berwarna atau berwarna putih susu.

DAFTAR PUSTAKA

- Allen, M. E. (2005). MacConkey agar plates protocols. American Society for Microbiology, 1-4.
- Cho, Y., & Yoon, K.-J. (2014). An overview of calf diarrhea-infectious etiology, diagnosis, and intervention. *Journal of veterinary science*, 15(1), 1-17.
- Jung, B., & Hoilat, G. J. (2022). MacConkey medium. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557394/>
- Kurniati, I., & Kalsum, U. (2018). Analisis Pertumbuhan Escherichia Coli Dan Salmonella Typhi Pada Media MacConcey Agar (MCA) Dengan Penambahan Ekstrak Daun Jati (*Tectona grandis* L.f.). *Jurnal Analisis Biologi*, 2(01).
- Microbiologynote. (2023). MacConkey Agar - Komposisi, Penggunaan, Karakteristik Koloni. Microbiologynote. <https://microbiologynote.com/id/agar-macconkey/>
- Praja, R. N., Yudhana, A., Haditanojo, W., & Oktaviana, V. (2021). Antimicrobial properties in cloacal fluid of olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(9). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220909>
- Shen, C., & Zhang, Y. (2022). CHAPTER 9 - Introduction of bacteria medium, nutritional requirements (synthetic and complex media), selective & differential media (MacConkey, mannitol salt, blood agar) (C. Shen & Y. B. T.-I. M. L. S. and T. in F. S. Zhang (ed.); hlm. 41-44). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821678-1.00010-1>

- Suarjana, I., Ketut, G., Besung, I. N. K., & Hapsari Mahatmi, K. T. P. G. (2017). Modul isolasi dan identifikasi bakteri. Universitas Udayana.
- Toruan, S. A. L., Manu, T. T., & Evriarti, P. R. (2023). Pemanfaatan Air Kelapa Muda Sebagai Media Alternatif Mac Concey Untuk Pertumbuhan Escherichia Coli Dan Salmonella Typhi. *Journal of Indonesian Medical Laboratory and Science (JoIMedLabS)*, 4(1), 25-36.
- Waluyo, L. (2016). Mikrobiologi Umum. Universitas Muhammadiyah Malang Press.

BAB 9

PEMBUATAN, KOMPOSISI, DAN KEGUNAAN MEDIA LB DAN BGLB

Muhammad Yashir, S.E., M.KM

A. Pendahuluan

Bakteri Coliform merupakan mikroorganisme yang bersifat patogen terhadap manusia dan tumbuh pada saluran pencernaan. Bakteri Coliform ditransmisi melalui air sebagai hasil dari polusi feces manusia ataupun hewan. Total Coliform, fekal Coliform, dan fekal streptococcus merupakan bakteri indikator polusi (Pepper, 2004).

Air merupakan sumber daya alam yang diperlukan oleh semua makhluk hidup. Penyediaan air minum yang aman harus diupayakan karena kemungkinan adanya pencemaran mikroorganisme pada air minum, seperti pencemaran bakteri Coliform. Bahaya bakteri Coliform dapat menimbulkan berbagai penyakit seperti diare, tifus dan disentri basiler. Menurut persyaratan Standar Nasional Indonesia (SNI) 01-3553-2006 tentang persyaratan mutu air minum isi ulang yang diperbolehkan dalam per 100 ml sampel adalah <math><2/100</math> ml. Parameter penentuan air minum secara mikrobiologi adalah total bakteri Coliform dan *Escherichia coli* (Depkes, 2010)

Pengujian bakteri Coliform menggunakan metode Most Probable Number (MPN). Uji MPN merupakan sebuah uji yang mengukur konsentrasi mikroorganisme pada sampel dengan jumlah estimasi yang diperoleh dengan metode statistik. Uji ini berguna pada sampel dengan konsentrasi mikroorganisme yang rendah (<math><100</math>/gram), terutama pada air, susu, dan makanan

dengan partikulat yang dapat menyulitkan perhitungan pada metode angka lempeng total.

Media pertumbuhan yang biasa digunakan dalam uji MPN adalah media Lactose Broth (LB) dan Brilliant Green Lactose Bile Broth 2% (BGLB), dengan dosis double strength atau single strength dan media EMBA.

B. Pembuatan dan Komposisi

Media Lactose Broth (LB) dibuat dengan komposisi 0.3% beef extract; 5 g pepton; 5 g lactose dan Lab-Lemoo Powder 3 g untuk bakteri melakukan fermentasi (Lay, 1992).

Sebanyak 13 gram agar dilarutkan dalam 1 liter akuades, jangan lupa diatur pH nya jika media yang dibuat terlalu asam maka ditambahkan NaOH 1 N dan sebaliknya. Jika media terlalu basa maka ditambahkan HCL 1 N. Penambahan NaOH 1 N dan HCL 1 N dilakukan untuk mencapai pH yang sesuai. Setelah pH sesuai kemudian dipanaskan dengan menggunakan hot plate dan dihomogenkan dengan magnetic stirrer. Sebanyak 5 ml media dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi tabung Durham dan ditutup dengan sumbat. Lalu media disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Terbentuknya asam dilihat dari kekeruhan pada media laktosa dan gas yang dihasilkan dapat dilihat di dalam tabung Durham berupa gelembung gas. Gelembung gas yang dihasilkan pada tabung Durham disebabkan oleh adanya aktivitas respirasi mikroorganisme. Dimana tabung Durham yang diletakkan terbalik untuk menampung dan menjebak gas yang terbentuk akibat metabolisme pada bakteri yang diujikan. Sehingga pada saat memasukkan tabung Durham dilakukan tanpa menimbulkan gelembung udara. Apabila masih ada udara maka tabung reaksinya dikocok-kocok sampai tidak ada udara pada tabung Durham sehingga nanti tidak mempengaruhi hasilnya pada proses metabolisme bakteri. Tabung dinyatakan positif jika terbentuk gas, pada uji dugaan ini dilakukan dengan menggunakan 5 tabung pada tiap seri pengencerannya. Seri

pengenceran pertama menggunakan media Lactose Broth Double Strength (LBDS) dengan sampel air sebanyak 10 ml, seri pengenceran kedua menggunakan media Lactose Broth Single Strength (LBSS) dengan sampel air sebanyak 1 ml, dan seri pengenceran ketiga menggunakan LBSS dengan sampel air sebanyak 0.1 ml. Perbedaan antara LBDS dan LBSS terletak pada konsentrasi LBDS 2 kali dari konsentrasi LBSS. Proses selanjutnya yaitu inkubasi selama 24 jam, jika hasil yang didapat negatif maka dilanjutkan dengan inkubasi 48 jam pada suhu 37°C. Jika dalam waktu 48 jam tidak terbentuk gas dalam tabung Durham maka hasilnya negatif. Pada uji dugaan/presumptive test dilakukan inkubasi pada suhu 37°C karena berdasarkan pertumbuhannya bakteri mesofil seperti bakteri golongan Coliform fecal dapat tumbuh secara optimal pada suhu optimum yaitu 25-40°C. Sampel yang positif akan menunjukkan perubahan menjadi keruh dan terdapat gelembung gas di dasar tabung Durham.

Pada tahap kedua yaitu uji kepastian/konfirmasi untuk memastikan adanya bakteri Coliform dengan menggunakan Media Brilliant Green Lactose Bile Broth 2% (BGLB). BGLB dibuat dengan komposisi pepton 10 g; garam empedu (oxbile / oxgall) 20 g; Laktosa 10 g; dan Brilliant Green sebanyak 0, 0133 g. Kegunaan dari masing-masing komponen pada BGLB yaitu pepton berguna sebagai nutrisi esensial untuk metabolisme bakteri dan laktosa berguna sebagai sumber karbohidrat untuk bakteri melakukan fermentasi, sedangkan Brilliant Green dan oxgall berguna untuk menghambat pertumbuhan gram positif dan menggiatkan pertumbuhan bakteri golongan Coliform (Eka, 2018). Sebanyak 40 gram agar dilarutkan dalam 1 liter akuadest, jangan lupa diatur pH nya jika media yang dibuat terlalu asam maka ditambahkan NaOH 1 N dan sebaliknya. Jika media terlalu basa maka ditambahkan HCL 1 N. Penambahan NaOH 1 N dan HCL 1 N dilakukan untuk mencapai pH yang sesuai. Setelah pH sesuai kemudian dipanaskan dengan menggunakan hot plate dan dihomogenkan dengan magnetic stirrer. Sebanyak 10 ml media dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi

tabung durham dan ditutup dengan sumbat. Lalu media disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Pada uji kepastian ini dilakukan dengan cara memasukkan media BGLB sebanyak 10 ml dan diinokulasi 2 ml media LB pada tabung reaksi yang positif ke dalam BGLB. Prosesnya antara lain dilakukan secara aseptik di dalam alat Laminar Air Flow (LAF) ke dalam tabung reaksi yang terdapat tabung Durham terbalik. Setelah itu diinkubasi pada suhu 44°C selama 48 jam dan amati ada atau tidaknya pembentukan gelembung gas di dasar tabung Durham, lalu hitung jumlah tabung positif yang terdapat gas dan kemudian membandingkan dengan tabel MPN. Pada uji kepastian dilakukan inkubasi pada suhu 44°C karena golongan gram positif tidak dapat tumbuh baik pada suhu tersebut sedangkan golongan Coliform fekal (gram negatif) dapat tumbuh baik pada suhu tersebut (Eka, 2018).

Untuk tahap pelengkap (Completed test) penanaman bakteri dari tahap konfirmasi pada media Eosin Methylen Blue Agar (EMBA) secara aseptik dengan menggunakan jarum inokulasi. Koloni bakteri *Escherichia coli* yang tumbuh pada media EMBA berwarna merah kehijauan dengan kilap metalik (Lay, 1992).

Media EMBA digunakan untuk diferensiasi dari *Enterobacteriaceae*. Komposisi media EMBA yaitu bacto peptone 10 g; dipotassium fosfat 2 g; bacto eosin 0,4 g; methylen blue 0,065 g; bacto agar 15 g. Media EMBA mempunyai keistimewaan mengandung laktosa dan berfungsi untuk membedakan mikroba yang memfermentasi laktosa seperti *Staphylococcus aureus*, *P.aeruginosa*, dan *Salmonella*. Mikroba yang memfermentasi laktosa menghasilkan koloni dengan inti berwarna gelap dengan kilap logam. Sedangkan mikroba lain yang dapat tumbuh koloninya tidak berwarna. Adanya eosin dan methylen blue membantu mempertajam perbedaan tersebut sehingga ada perbedaan yang nyata antara koloni yang meragikan laktosa dan yang tidak. Namun demikian, jika media

ini digunakan pada tahap awal dapat menimbulkan keraguan karena bakteri lain juga tumbuh terutama *P.aeruginosa*, dan *Salmonella*. Media ini sangat baik untuk mengkonfirmasi bahwa kontaminan tersebut adalah *Escherichia coli* (Lay, 1992).

Untuk mengetahui lebih jauh mengetahui jenis bakteri dari golongan yang didapat, harus dilakukan uji lanjutan dengan IMViC (Indol, Merah metil, Voges Proskauer, Sitrat) dan uji Triple Sugar Iron. Uji ini penting untuk membedakan bakteri dalam kelompok Coliform.

LB (Lactose broth). Media ini merupakan media untuk memperkaya bakteri Coliform bukan bakteri *Escherichia coli*. Sehingga bakteri yang tumbuh pada media LB dapat bermacam-macam pada golongan coli. Selain itu media LB memiliki manfaat dan fungsi untuk masing-masing komponennya yaitu peptone dan beef extract. Kedua komponen tersebut merupakan sumber nutrisi esensial untuk metabolisme bakteri. Sedangkan fungsi dari Laktosa yaitu sumber Karbohidrat untuk bakteri melakukan fermentasi (Surati., 2017)

Menurut (Ferdiaz, 1989) pada uji penegasan media yang digunakan yaitu BGLB digunakan untuk mendeteksi adanya bakteri Coliform. BGLB dengan komposisi berupa garam empedu dan laktosa sehingga mampu membuat bakteri Coliform tumbuh dengan optimal (maksimal), selain itu BGLB mengandung garam ox bile berfungsi sebagai inhibitor untuk menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif, sehingga bakteri yang tumbuh berupa bakteri Gram negatif. Laktosa pada media BGLB hanya dapat difermentasikan oleh bakteri Coliform menjadi asam suksinat dan fumarat diikuti pembentukan O₂ oleh bakteri Coliform fakultatif anaerob dan CO₂ oleh bakteri Coliform aerob. Pembentukan gas O₂ dan CO₂ tersebut dijadikan parameter (tolok ukur) ada tidaknya bakteri Coliform dalam sampel.

Media Eosin Methylene Blue Agar (EMBA) merupakan media selektif yang digunakan untuk mengisolasi bakteri Gram negatif yang berbentuk batang pada beragam jenis spesimen. Komposisi media Eosin Methylene Blue Agar yaitu pepton,

laktosa, kalium hidrogen fosfat, eosin Y, methylene blue, dan agar dengan pH akhir $6,8 \pm 0,2$ pada suhu 25°C (Oxoid, 2015). Eosin Y dan methylene blue menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan dalam suasana asam juga memproduksi kompleks ungu tua yang biasanya disertai dengan kilap logam berwarna hijau. Kilap logam berwarna hijau merupakan indikator telah terjadinya fermentasi laktosa dan/ atau sukrosa oleh Coliform fekal.



Gambar 9. 1 Media Lactose Broth dan Brilliant Green Lactose Bile 2% (Broth) by Oxoid.com (Sumber : Inventory Laboratorium)

DAFTAR PUSTAKA

- Bitton, 1994 ; Waste Water Microbiology, Willey -Liss, A John Willey and Sons, Inc., New York cit. Naufal, O., 2012 Metode Penelitian Mikroba Air.
- Depkes RI., 2010 ; Peraturan Menteri Kesehatan No.492 tahun 2010 tentang Persyaratan Kualitas Air Minum , Jakarta
- Kumalasari Eka., Rhodiana, Erna Prihandiwati., 2018 ; Analisis Kuantitatif Bakteri Coliform pada Depot Air Minum Isi Ulang di wilayah Kayutangi Kota Banjarmasin; Jurnal Ilmiah Ibnu Sina pp 134-144.
- Ferdiaz., 1989 ; Analisis Mikrobiologi Pangan, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan IPB.
- Lay. B dan S. Hastowo, 1992 ; Mikrobiologi ; Rajawali Press , Jakarta
- Pepper, L., Gerba C.P, 2004 ; Environmental Microbiology : A. Laboratory Manual. 2nd ed USA Elsevier Academic Press
- Surati., Nurul Qomariah, 2017 ; Tingkat Keamanan Minuman Infused Water dengan Diversifikasi Penyimpanan Yang Berbeda; Jurnal Riset Kesehatan Vol`6 pp 13-19.

BAB

10

PEMBUATAN, KOMPOSISI, DAN KEGUNAAN MEDIA NUTRIENT AGAR (NA)

Arif Mulyanto, S.Si., M.Si

A. Nutrisi Pertumbuhan Bakteri

Menumbuhkan bakteri di laboratorium mikrobiologi membutuhkan media yang mengandung nutrisi atau zat hara serta faktor lingkungan yang diperlukan untuk pertumbuhan mikroorganisme (Lay, 1994). Media pertumbuhan bakteri menyediakan nutrisi yang diperlukan untuk menumbuhkan bakteri. Beberapa bakteri mampu tumbuh menggunakan media umum atau universal dan beberapa jenis bakteri membutuhkan media spesifik atau khusus. Media seharusnya dapat memberikan zat hara yang diperlukan untuk pertumbuhan bakteri (Radji, 2010). Pertumbuhan bakteri di sebuah media dapat dipergunakan untuk isolasi bakteri (menumbuhkan bakteri di media sintesis), perbanyakan bakteri, menguji sifat-sifat fisiologi bakteri dan menghitung jumlah bakteri (Cahyani, 2014).

Media untuk menumbuhkan bakteri merupakan suatu bahan terdiri atas campuran zat hara (nutrisi) yang diperlukan bakteri untuk pertumbuhan. Bakteri menggunakan nutrisi atau media yang mengandung mikromolekul yang digunakan untuk menyusun bagian-bagian sel. Kegunaan media pertumbuhan bakteri untuk isolasi bakteri untuk mendapatkan kultur murni dan dapat dilakukan perubahan komposisi media pertumbuhannya. Media seharusnya mengandung nutrisi yang diperlukan bagi proses metabolisme sel, nutrisi mengandung unsur makro seperti O, N, C, H, P dan unsur mikro seperti Mg

dan Fe, serta unsur pelengkap (trace element). Sumber energi dan sumber karbon diperoleh dari senyawa organik maupun senyawa anorganik menyesuaikan dengan kebutuhan pertumbuhan bakteri. Bakteri bersifat heterotrof membutuhkan sumber karbon organik diantaranya berasal dari karbohidrat, protein, lemak dan asam organik. Selain itu, bahan tambahan atau bahan yang ditambahkan pada medium menggunakan tujuan tertentu, diantaranya phenol red (digunakan sebagai indikator asam basa bahan ini ditambahkan untuk indikator perubahan pH, sehingga proses produksi asam organik yang berasal dari proses metabolisme bakteri. Antibiotik dapat sering digunakan atau ditambahkan guna menghambat pertumbuhan bakteri non target atau bakteri pengkontaminan.

Nutrisi dasar diperlukan bakteri untuk menjaga kelangsungan kehidupannya. Bakteri membutuhkan berbagai macam nutrisi untuk pertumbuhannya dan keberhasilan kultivasi pada laboratorium tergantung dari majemuk nutrisi yang diperlukan (Cappucino and Sherma, 2013). Berikut sumber nutrisi untuk pertumbuhan bakteri:

1. Karbon

Karbon merupakan kebutuhan nutrisi yang paling krusial serta penting bagi struktur dan fungsi seluler. Bakteri dibagi sebagai dua jenis berdasarkan kebutuhan karbon, yaitu:

a. Autotrof

Bakteri yang dikultivasi pada media yang mengandung senyawa anorganik, bakteri ini memakai karbon anorganik pada karbon dioksida.

b. Heterotrof

Bakteri yang tidak dapat di kultivasi pada sebuah media yang terdapat senyawa anorganik. Media pertumbuhan bakteri sebaiknya terdapat nutrisi organik, contohnya laktosa.

2. Nitrogen

Nitrogen adalah bahan krusial penyusun makromolekul seluler, khususnya asam nukleat dan protein. Protein penyusun molekul fungsional dan molekul struktural membentuk bahan sel serta menjadi molekul enzim, yang berfungsi dalam proses metabolisme sel. Asam nukleat yaitu DNA, RNA yang berperan aktif untuk pembuatan protein sel.

3. Unsur selain logam

Ion selain logam primer dapat dipergunakan untuk nutrisi seluler yaitu fosfor dan sulfur. Sulfur adalah komponen penyusun protein yang berasal dari senyawa organik serupa dengan asam amino yang mengandung sulfur dan senyawa anorganik serupa sulfat. Unsur fosfor terbentuk dalam garam fosfat yang diperlukan untuk pembentukan asam nukleat DNA serta RNA dan pembuatan senyawa organik adenosine trifosfat (ATP).

4. Unsur Logam

Ion logam berupa Ca^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ , K^+ , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , dan Fe^{2+} diperlukan untuk kelangsungan kinerja sel dan banyak sekali proses aktivitas seluler. Kegiatan aktivitas seluler yang dimaksud antara lain osmoregulasi, pengaturan aktivasi enzim, dan transpor elektron.

5. Vitamin

Vitamin merupakan unsur yang diperlukan dalam jumlah sedikit. Vitamin berperan dalam pengaturan pertumbuhan seluler, aktivitas sel dan menjadi koenzim yang diperlukan untuk pembentukan sistem aktif enzim.

6. Air

Media pertumbuhan bakteri membutuhkan air sehingga nutrisi molekul rendah dapat melintasi membran sel bakteri. Air merupakan kebutuhan pokok bagi pertumbuhan bakteri.

7. Energi

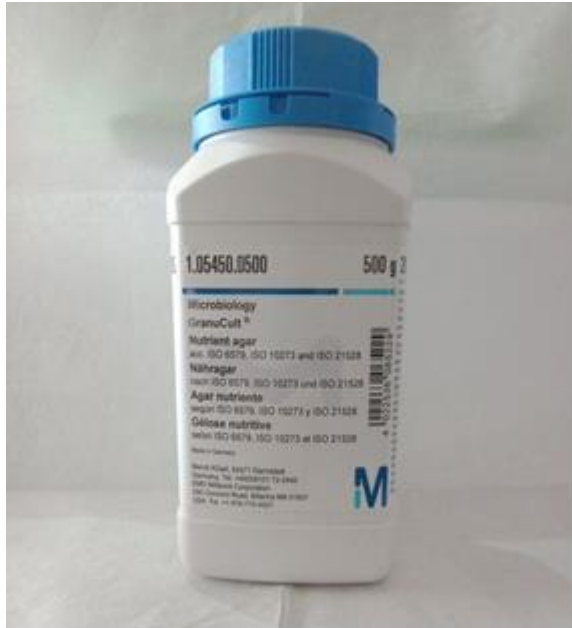
Aktivitas metabolik seluler seperti transpor aktif, biosintesis, dan biodegradasi dapat berlangsung jika ada energi yg konstan dalam sel. Tipe biogenetik mikroorganisme, yaitu fototrof serta kemotrof.

B. Media Nutrient Agar (NA)

Nutrient Agar merupakan suatu media yang berbentuk padat, mengandung bahan alamiah dan senyawa-senyawa kimia. NA ialah suatu media universal yaitu media yang mampu menumbuhkan beberapa jenis bakteri yang menggunakan sumber karbon dan nitrogen yang dapat digunakan untuk pertumbuhan bakteri dan untuk penghitungan jumlah mikroorganisme yang berasal dalam air, limbah, kotoran serta bahan lainnya.

Media Nutrient agar merupakan media kompleks yang memiliki kandungan nutrisi tinggi, terdiri dari ekstrak daging, ekstrak ragi atau tumbuh-tanaman, atau protein sederhana yang berasal dari sumber lain yang sangat dibutuhkan oleh bakteri untuk tumbuh dan berkembang biak. Media ini bisa dipergunakan untuk perbanyakan bakteri dan isolasi biakan murni, dimana media ini merupakan media rutin yang dipergunakan pada laboratorium mikrobiologi.

Nutrient agar adalah media dengan nutrisi minimal serta protein dengan konsentrasi rendah. Pertumbuhan koloni pada media ini mengindikasikan bakteri non fastidious serta tidak memerlukan suplemen khusus. NA banyak dipergunakan sebagai media penyimpan bakteri (Harsono *et al.*, 2015). Beberapa perusahaan yang memproduksi media pertumbuhan bakteri antara lain Difco, Oxoid, dan Merck. Media yang diproduksi oleh perusahaan Merck berbentuk granul atau butir-butir kecil, sedangkan kalau berasal dari perusahaan Difco dan Oxoid berbentuk serbuk. Beberapa gambar Media sintesis NA sebagai berikut :



Gambar 10. 1 Media Nutrient Agar (Merck)



Gambar 10. 2 Media Nutrient Agar (Oxoid)



Gambar 10. 3 Media Nutrient Agar (Difco)

C. Komposisi Nutrient Agar

Komposisi media Nutrient Agar mengandung 5,0 gram Pepton, 3,0 gram Ekstrak daging sapi (Beef Extract) dan 12 gram Agar pada 1000 ml air suling atau akuades (Cappucino and Sherma, 2013), jika media yang dibuat berupa media padat, ditambahkan 15 % Agar sebagai pematat media (Dwidjoseputro, 2010).

Masing-masing bahan yang ada dalam pembuatan media NA berfungsi sebagai berikut:

1. Peptone

Peptone adalah produk hidrolisis protein hewani atau nabati seperti otot, liver, darah, susu, casein, laktal, albumin, gelatin dan kedelai. Komposisinya tergantung pada bahan atau sumbernya dan bagaimana cara memperolehnya. Peptone merupakan bahan primer yang digunakan untuk menyusun nitrogen organik, dan sebagian berfungsi sebagai penyusun asam amino serta peptida rantai panjang.

2. Ekstrak daging sapi

Ekstrak daging sapi (*beef extract*) mengandung senyawa-senyawa yg larut pada dalam air termasuk karbohidrat, vitamin, nitrogen organik serta garam. Ekstrak daging sapi dan peptone dipergunakan sebagai bahan dasar karena berfungsi sebagai sumber protein, nitrogen, vitamin, serta karbohidrat yg sangat diperlukan oleh mikroorganisme untuk tumbuh serta berkembang biak.

3. Agar

Agar bisa diperoleh dalam bentuk batangan, granula atau bubuk dan terbuat berasal beberapa jenis rumput laut. Agar berfungsi sebagai pematid (gelling). Agar pertama kali dipergunakan oleh Fraw & Walther Hesse untuk membentuk media. Jika dicampur menggunakan air dingin, agar tidak akan larut, untuk melarutkannya harus dimasak dan dipanasi. Proses pencairan dan pematid berkali-kali atau sterilisasi yg terlalu lama, dapat menurunkan kekuatan agar, terutama di pH yang asam. Agar sulit didegradasi oleh mikroorganisme, agar biasanya akan mencair pada suhu 450 C. Gelatin berfungsi sama seperti agar. Gelatin sebagai penyusun polimer asam amino yang berasal dari kolagen.

Kekurangan gelatin adalah lebih banyak jenis mikroba dapat menguraikannya dibanding agar. Silica gel yaitu bahan yang mengandung natrium silikat. Kegunaan silica gel menjadi pematid media. Silica gel spesifik dipergunakan untuk memadatkan media bagi mikroorganisme autotrof obligat.

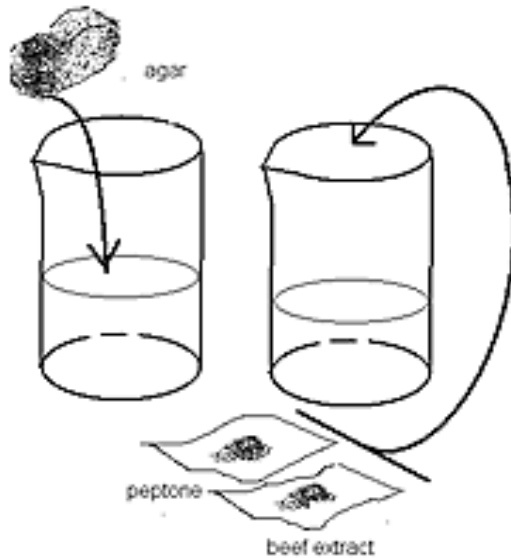
D. Pembuatan Media Nutrient Agar dan Nutrient Broth

1. Pembuatan Nutrient Agar (sintesis)

- a. Timbang komponen medium dengan menggunakan timbangan analitis buat volume yang diinginkan sinkron menggunakan komposisi berikut:

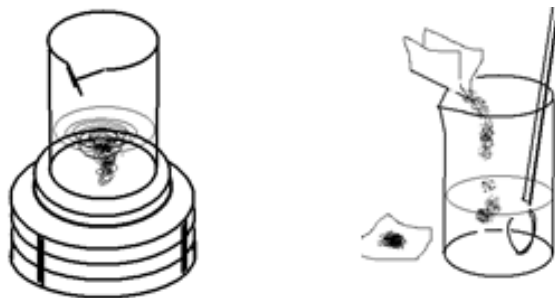
Beef Extract	3 g
Peptone	5 g
Agar	12 g
Akuades	s.d 1000 milliliter

- b. Akuades sebanyak 1000 mililiter dibagi menjadi dua, satu bagian untuk melarutkan Beef Extract dan peptone, satu bagian akuades lagi untuk melarutkan Agar.



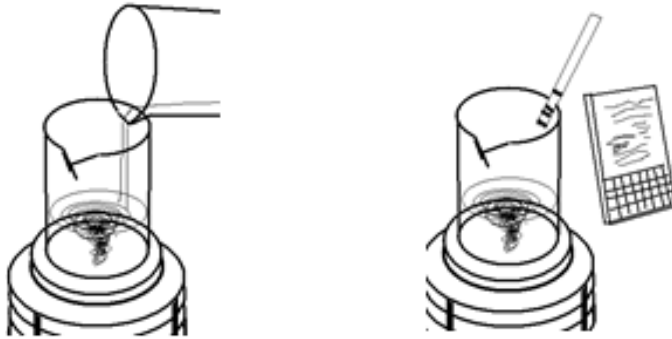
Gambar 10. 4 Melarutkan Agar dan bahan lain di wadah berbeda

- c. Larutkan agar pada sebagian a ir tadi menggunakan pengaduk secara konstan saat dipanaskan. Pemanasan dapat menggunakan kompor gas atau hot plate stirrer (jangan sampai overhear, sebab akan terbentuk busa dan memuai sebagian dapat tumpah).



Gambar 10. 5 Memanaskan agar di atas hot plate stirrer dan hanya melarutkan di akuades saja

- d. Sementara itu sebagian akuades dipergunakan buat melarutkan peptone dan beef extract, cukup menggunakan pengadukan.
- e. Setelah keduanya larut, larutan dituangkan ke larutan agar serta diaduk hingga homogen. kemudian pH media diukur dengan mencelupkan kertas pH indikator. Jika pH tidak netral maka dapat ditambahkan HCl/NaOH.



Gambar 10. 6 Mencampurkan agar dan bahan lainnya dalam satu wadah, mengukur pH media

- f. Selesaiannya itu media dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer serta disterilisasi menggunakan autoklaf.
- g. Masukkan media steril ke cawan petri steril secara aseptis. Bila diinginkan media tegak atau miring pada point ke 5(e), media eksklusif dituang ke tabung kemudian disterilisasi.

2. Pembuatan Nutrient Agar (Instant)

- a. Timbang media NA (28 gram) Oxoid atau (20 gram) Merck dan larutkan pada 1000 ml akuades menggunakan pengaduk secara konstan dan dipanaskan menggunakan kompor gas atau hot plate stirrer (jangan sampai overheat, sebab akan terbentuk busa dan memuai sebagian dapat tumpah).
- b. Pemanasan dihentikan ketika larutan menjadi jernih.
- c. Setelah semua larutan homogen. kemudian pH media diukur dengan mencelupkan kertas pH indikator. Jika pH tidak netral maka dapat ditambahkan HCl/NaOH.

- d. Selesaiya itu media dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer serta disterilisasi menggunakan autoklaf.
- e. Masukkan media steril ke cawan petri steril secara aseptis. Media eksklusif dituang ke tabung kemudian disterilisasi.

3. Pembuatan Nutrient Broth

Komposisi buat media NB sama menggunakan NA tetapi tidak menggunakan agar menjadi pematat. Proses pembuatannya lebih sederhana, tinggal melarutkan peptone dan beef extract kemudian ditampung dalam labu Erlenmeyer atau tabung reaksi serta siap disterilisasi. Proses pembuatan ini tidak memerlukan panas, peptone serta beef extract akan mudah larut sempurna di air suhu kamar Jika diaduk.

Komposisi Nutrient agar (NA) terdiri dari ekstrak daging sapi, peptone serta agar. Formula ini tergolong cukup mudah buat menyediakan nutrisi-nutrisi yg diperlukan oleh sejumlah besar mikroorganisme. pada Nutrient supaya (NA), ekstrak daging sapi dan peptone dipergunakan menjadi bahan dasar sebab adalah sumber protein, nitrogen, vitamin, dan karbohidrat yang sangat diperlukan oleh mikroorganisme buat tumbuh serta berkembang. Beberapa model bakteri yg tumbuh di media NA antara lain *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli* memiliki karakteristik morfologi koloni yg mirip yaitu berwarna krem atau kuning keputihan (Gambar 10.7 dan 10.8).



Gambar 10. 7 *Pseudomonas Aeruginosa* Di Media NA



Gambar 10. 8 *Escherichia coli* di media NA

DAFTAR PUSTAKA

- Barrow, G.I. and Feltham, R.K.A. (1993) *Cowan and Steel's, Manual for the Identification of Medical Bacteria*. New York: Cambridge University Press.
- Cahyani, V.R. (2014) *Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Pangan*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
- Cappucino, J.G. and Sherma (2013) *Manual Laboratorium Mikrobiologi*. 8th edn. Jakarta: ECG.
- Dwidjoseputro (2010) *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Penerbit Djembatan.
- Harsono, S. *et al.* (2015) *Kitab Ajar Investigasi Mikrobiologi di Penyakit Infeksi*. Surabaya: CV. Sagung Seto.
- Lay, B.W. (1994) *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta: Raja Grafindo Persada.
- Radji, M. (2010) *Kitab Ajar Mikrobiologi: Pedoman Mahasiswa Farmasi serta Kedokteran*. Jakarta: EGC

TENTANG PENULIS



Menik Kasiyati, S.ST, M.Imun lahir di Bantul tanggal 19 Oktober 1981. Penulis menyelesaikan pendidikan D4 pada Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Depkes Yogyakarta dan melanjutkan S2 pada Sekolah Pascasarjana Universitas Airlangga. Penulis menekuni bidang menulis dan melakukan penelitian di bidang imunologi.



Siti Raudah, S.Si., M.Si Lahir di Tanah Grogot Kalimantan Timur, pada 21 Desember 1985. Penulis menempuh pendidikan kuliah pada Program Studi Biologi Strata-1 pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Samarinda Tahun 2007 dan Pendidikan Magister Ilmu Lingkungan Program Pascasarjana Universitas Mulawarman Tahun 2017.

Penulis sebagai pengajar di Program Studi Teknologi Laboratorium Medis Institut Teknologi Kesehatan dan Sains Wiyata Husada Samarinda sejak tahun 2010 - sekarang. Penulis aktif dalam melakukan penelitian dengan peminatan biomedik seperti potensi tanaman terhadap penghambatan luka infeksi (in vitro)



Yulita Maulani, S.Tr.Kes., M.Kes lahir di Sukoharjo, pada 1 Juli 1998. Ia tercatat sebagai lulusan angkatan 3 Pascasarjana Ilmu Laboratorium Klinis Universitas Muhammadiyah Semarang. Wanita yang kerap disapa Yulita ini telah belajar di bidang analis kesehatan semenjak duduk dibangku sekolah menengah atas. Yulita Maulani merupakan wanita yang baru berkecimpung di dunia pendidikan

dengan menjadi dosen di salah satu kampus swasta di Surakarta. Dengan usianya yang masih terbilang muda, Yulita berprinsip bahwa mengajar adalah belajar tanpa henti, oleh itu Ia tertarik untuk menjadi seorang pendidik.



Emma Ismawatie, S.ST., M.Kes, lahir di Klaten, pada 11 oktober 1970, emma tercatat lulusan dari Magister Ilmu Laboratorium Klinis perdana dan satu-satunya yang mempunyai Prodi Ilmu Laboratorium Klinis di Universitas Muhammadiyah Semarang. Wanita yang mempunyai panggilan nama Is bersuami dan mempunyai dua anak

laki-laki. Saat ini aktif sebagai dosen dan sebagai Kaprodi Teknologi Laboratorium Medis di Politeknik Indonesia Surakarta. Emma bukan orang baru di dunia Laboratorium kesehatan, sudah berpengalaman sebagai praktisi medis dan manager di suatu laboratorium kesehatan swasta selama 33 tahun.



Eva Runi Khristiani, S.Si., MT lahir di Pematang pada tanggal 24 September 1973. Ia tercatat sebagai dosen Prodi Teknologi Bank Darah (DIII) Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKES) Wira Husada Yogyakarta. Eva, mengampu mata kuliah Mikrobiologi, Ilmu Biologi Dasar dan Biologi Sel dan Genetika.



Bambang Supriyanta, S.Si., M.Sc lahir di Yogyakarta, pada 10 April 1962, dengan pendidikan terakhir S2 Ilmu Kedokteran Tropis (Konsentrasi Imunologi dan Biologi Molekuler), Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan (FK-KMK) Universitas Gadjah Mada, merupakan putra dari pasangan Soemardi (ayah) dan Sri Sumiyatun (Ibu), aktif mengajar di Poltekkes Kemenkes Yogyakarta sejak tahun 1984 sampai sekarang. Beberapa penelitian telah dilakukan dengan mendapatkan skema pendanaan antara lain Penelitian Pemula, Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi



Angriani Fusvita, S.Si., M.Si, lahir di Kendari pada tanggal 28 Juli 1987. Jenjang Pendidikan S1 pada Jurusan Biologi ditempuh di Universitas Haluoleo, Kota Kendari dan lulus tahun 2010. Pendidikan S2 di Program Studi Mikrobiologi Medik ditempuh di Institut Pertanian Bogor dan lulus tahun 2015. Penulis tercatat sebagai staf Dosen Program Studi Teknologi Laboratorium Medis. Beberapa buku yang sudah diterbitkan diantaranya

Mikrobiologi Farmasi dan Parasitologi, Mikrobiologi Dasar, Parasitologi Medik Dasar, dan Mikologi Kesehatan.



M. Atik Martsiningsih, S.Si, M.Sc. Lahir di Klaten ,23 Maret 1968, Pendidikan Sekolah Menengah Analis Kesehatan lulus tahun 1987, kemudian lanjut Tubel Akademi Analis Kesehatan Bandung lulus tahun 1995, lanjut Tubel S1 UNY prodi Biologi lulus tahun 2005, Lanjut tubel S2 UGM Tropmed lulus tahun 2012. Bekerja di Poltekkes kemenkes Yogyakarta dari tahun 1988. Status sudah berkeluarga dengan 2 orang anak



Muhammad Yashir, S.E., M.KM lahir di Jakarta, pada 10 Juli 1983. Ia tercatat sebagai lulusan SMAK LABIOMED DITKESAD TH 2001, UHAMKA 2009 & 2022. Laki-laki yang kerap disapa Yasser ini adalah anak dari pasangan H. Sairih dan Hj. Naspiah. Muhammad Yashir adalah seorang yang gemar berorganisasi , Yasser tercatat sebagai karyawan di Unika Atma Jaya sebagai laboran Pendidikan dan Biosafety officer. Di Organisasi Profesi PATELKI sebagai Asesor Kompetensi BNSP , Auditor Internal dan Fasilitator tamatan TPK Kemenkes RI, sampai sekarang pengurus di Lembaga Pendidikan Pelatihan Profesi Laboratorium Medik Utama (LPPP-LMU).



Arif Mulyanto S.Si., M.Si lahir di Banyumas, pada 2 juni 1984. Ia tercatat sebagai lulusan Universitas Jenderal Soedirman (Unsoed). Lelaki yang kerap disapa Arif ini adalah anak ke 2 dari pasangan Mukhidin (ayah) dan Murwati (ibu). Saat ini mempunyai istri bernama Ika Oksi Susilawati, M.biotech. dengan 4 orang anak yaitu Naila Khanza Hafishah, Alkhalifi Irsyad Hamizan, Amira

Nazafatin Hafishah, Nadhira Faustina Hafizhah. Arif Mulyanto pernah bekerja di Unsoed tahun 2009-2016, Universitas Lambung mangkurat tahun 2016 dan di Universitas Muhammadiyah Purwokerto dari tahun 2017–sekarang.