

Perbedaan Warna Koloni *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada Media Ekstrak Daging Sapi dan Sari Kacang Hijau yang Ditambah Sitrat dan Bromthymol Blue

The Colour Differences Between *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* Colonies in Artificial Medium That was Made From Beef Extract, Mung Beans Juice, Citrate and Bromthymol Blue

¹Ahmad Anas Muhaimin, ²Hario Puntodewo Siswanto, ²Wiwiek Tyasningsih, ²Suryanie

¹PPDH Fakultas Kedokteran Hewan Unair

²Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya – 60115

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993014

Email : vetunair@telkom.net

Abstract

This research was aimed to investigate the colour differences between *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* colonies in artificial medium that was made from beef extract, mung beans juice, citrate and bromthymol blue. The medium was made by mixing 1.6% agar base, 0.8% beef extract, 20% mung beans juice, 0.2% sodium citrate, 2% lactose, and 8% of bromthymol blue solution 0.1% into 1000 ml aquadest. The isolate of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* were inoculated onto the media with five repetitions. As control, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* were inoculated onto the media that were made from beef extract and mung beans juice, without citrate and bromthymol blue. The whole media were incubated at 37 °C for 24 hours. The result showed that the colour of *Escherichia coli* colonies can be distinguished with *Pseudomonas aeruginosa*'s. *Escherichia coli* colonies appeared colorless, wet, shiny and the surrounding medium remained yellow. *Pseudomonas aeruginosa* colonies appeared bluish-white, with thick and mucoid form and the surrounding medium changed its colour to green. Based on the result, the artificial medium that was made from beef extract, mung beans juice, citrate and bromthymol blue can be used in Microbiology Laboratories as a differential medium to distinguish bacteria whether they utilize citrate as energy and carbon source or not.

Keywords : *artificial medium, beef extract, citrate*

Pendahuluan

Isolasi dan identifikasi bakteri adalah kegiatan yang sangat penting dalam dunia kesehatan dan ilmu pengetahuan. Selain untuk membantu diagnosa penyakit isolasi dan identifikasi bakteri juga berperan penting dalam pembuatan vaksin dan bidang bioteknologi. Kegiatan ini membutuhkan media perbenihan buatan atau *artificial medium*. Selama ini bahan-bahan *artificial medium* didapat dari impor, sehingga harganya bergantung pada nilai tukar Rupiah terhadap Dollar yang menyebabkan jika suatu saat terjadi krisis ekonomi maka harga bahan-bahan tersebut akan naik. Selain itu, tidak

semua laboratorium mikrobiologi di daerah bisa memperoleh bahan-bahan tersebut dengan mudah karena tidak semua daerah memiliki importer bahan-bahan tersebut. Berdasarkan hal tersebut, muncul ide untuk membuat sendiri *artificial medium* dari bahan-bahan yang mudah didapat di dalam negeri sehingga tidak tergantung pada produk impor. Bahan-bahan yang dipilih adalah ekstrak daging sapi dan sari kacang hijau.

Suatu media perbenihan buatan (*artificial medium*) memerlukan berbagai persyaratan agar dapat ditumbuhkan bakteri, yaitu adanya zat makanan, kondisi pH media, suhu dan kondisi udara lingkungan

pertumbuhan bakteri (Tyasningsih dkk, 2002). Organisme berbeda memerlukan nutrisi yang berbeda, dan tidak semua nutrisi dibutuhkan dalam jumlah yang sama (Madigan *et al.*, 2009). Nutrisi yang dibutuhkan bakteri antara lain sumber energi, sumber karbon, sumber nitrogen, berbagai mineral terutama belerang (sulfur), fosfor, dan aktivator enzim seperti Mg, K, Ca, Fe, Mn, Mo, Co, Cu, serta Zn, dan semua persyaratan tersebut tersedia dalam daging sapi (Tyasningsih dkk, 2002).

Daging sapi merupakan sumber protein yang tinggi (18,8 %) dengan asam amino essensialnya yang lengkap dan mempunyai kadar air yang tinggi (66%), kaya akan non protein nitrogen (NPN), mineral, serta sejumlah karbohidrat yang dapat difermentasi, selain itu memiliki pH 5,3-6,5 yang sesuai untuk perkembangan bakteri (Soeparno, 2005). Tyasningsih dan Suryanie (1999) telah mencoba membuat media sederhana pengganti media *Nutrient Agar* (NA) dari ekstrak daging sapi. Media tersebut dapat ditumbuhi bakteri Gram positif maupun Gram negatif seperti *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*, selain itu juga memberi tingkat kesuburan yang sama dengan *nutrient agar* (Tyasningsih dan Suryanie, 1999).

Suryanie (2001) menambahkan sari kacang hijau ke dalam media ekstrak daging sapi. Kacang hijau yang memiliki kandungan nutrisi per 100 gramnya terdiri dari kalori 345 kal, protein 22 g, lemak 1,2 g, karbohidrat 62,9 g, Ca 125 mg, Fe 7,7 mg, fosfor 340 mg, Na 6 mg, K 141 mg, vitamin A 157 IU, vitamin B1 0,64 mg, vitamin C 6 mg dan air 10 g (Purwono dan Hartono, 2005) ternyata mampu mempersubur pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

Telah diketahui bahwa setiap jenis bakteri mempunyai kemampuan yang spesifik untuk dapat tumbuh dan berkembang. Kemampuan tersebut dapat berupa kemampuan membentuk spora, memfermentasi karbohidrat, menghemolisa darah, menghasilkan H₂S, menghasilkan asam, menghasilkan enzim urease, memanfaatkan sitrat sebagai sumber utama karbon dan energi, dan lain-lain. Berdasarkan hal tersebut muncul ide untuk membuat sebuah media yang mampu membedakan bakteri-bakteri yang mengolah sitrat dan yang tidak mengolah

sitrat sebagai sumber karbon dan energi. Media tersebut tersusun dari ekstrak daging sapi, sari kacang hijau, sitrat dan *bromthymol blue*. Sitrat yang ada dalam media akan dimetabolisme oleh bakteri yang memiliki sifat sitrat positif dan terbentuklah *alkaline carbonate* dan *bicarbonate*. Adanya pertumbuhan bakteri yang tampak pada media dan perubahan warna media oleh indikator pH yaitu *bromthymol blue* akibat peningkatan pH adalah pertanda bahwa organisme yang ada dalam media tersebut dapat memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon dan energi (Mac Williams, 2010).

Bakteri yang digunakan dalam penelitian adalah *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*. *Escherichia coli* adalah bakteri Gram negatif berbentuk batang pendek yang hidup sebagai flora normal usus vertebrata. Bakteri ini sering dijadikan organisme indikator untuk menguji sampel dari lingkungan tentang pencemaran feses, karena sifatnya yang mampu bertahan hidup berminggu-minggu di luar tubuh induk semangnya dan sering menjadi penyebab penyakit bagi hewan dan manusia (Merchant and Packer, 1971; Brock and Madigan, 1991). *Pseudomonas aeruginosa* adalah bakteri Gram negatif berbentuk batang ramping yang umum tersebar luas di alam, bakteri ini bersifat patogen oportunistik yang dapat menyebabkan banyak masalah kesehatan bagi manusia (Merchant and Packer, 1971; Madigan *et al.*, 2009). *Pseudomonas aeruginosa* bersifat sitrat positif sedangkan *Escherichia coli* adalah sitrat negatif.

Penelitian ini bertujuan untuk membedakan warna koloni bakteri *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada media ekstrak daging sapi dan sari kacang hijau yang ditambah sitrat dan *bromthymol blue*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat membuat media diferensial untuk membedakan koloni bakteri yang mampu memanfaatkan sitrat dan yang tidak mampu memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon dan energi yang terbuat dari ekstrak daging sapi dan sari kacang hijau yang ditambah sitrat dan *bromthymol blue*.

Materi dan Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Departemen Mikrobiologi Veteriner Fakultas

Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya pada 22 Mei hingga 10 Juni 2011.

Bahan penelitian antara lain Isolat bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Pseudomonas aeruginosa* strain lapangan dari Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Departemen Mikrobiologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Bahan untuk penelitian utama berupa daging sapi, *agar bacteriological* ("Oxoid"), kacang hijau, tri-natriumsitrat-2-hidrat ("Merck"), Laktosa monohydrate ("Merck") dan larutan *bromthymol blue* 0,1 % ("Cahaya Kimia").

Ekstrak daging sapi dibuat dengan cara memotong kecil-kecil daging sapi dan dihancurkan dengan blender. Daging sapi yang telah hancur dimasukkan ke dalam freezer selama 24 jam. Selanjutnya daging yang telah beku direbus sampai mendidih selama 20 menit dengan menambahkan aquadest perbandingan 1 kg daging untuk 2 liter aquadest. Setelah itu daging diperas, air dagingnya kemudian dimasukkan ke dalam lemari pendingin ($\pm$ 12 jam) untuk memberi kesempatan terjadi penggumpalan lemak yang muncul ke permukaan. Lemak dibuang, kemudian cairan daging diuapkan dengan api kecil sambil terus diaduk hingga terbentuk pasta (Suryanie, 2000).

Sari kacang hijau dibuat menurut metode Rahayu dkk (1993) yang dimodifikasi (Suryanie, 2001). 1 kg Kacang hijau yang tua dicuci dengan air, sisa kulit buah dan kotoran lainnya dibuang. Selanjutnya kacang dikeringkan pada udara terbuka dan direbus dalam air distilasi dengan perbandingan tiap 1 kg kacang hijau digunakan dua liter air. Setelah kelihatan pecah secara merata, kacang hijau kemudian diblender sampai halus, lalu diperas dengan menggunakan kain dan disaring. Selanjutnya sari kacang hijau direbus kembali sebelum disimpan dan digunakan.

Media dibagi menjadi dua yaitu media kontrol dan media perlakuan. Media kontrol dibuat dengan cara mencampurkan 1,6 % *agar base*, 0,8 % pasta daging, 20 % sari kacang hijau dan ditambah aquadest hingga 1000 ml. Media perlakuan dibuat dengan cara mencampurkan 1,6 % *agar base*, 0,8 % ekstrak daging sapi, 20 % sari kacang hijau, 0,2 % natrium sitrat, 2 % laktosa dan ditambah aquadest hingga 1000 ml. Media dimasak hingga mendidih kemudian media perlakuan ditambahkan larutan *bromthymol*

blue 0,1% sebanyak 8 %. Kedua media disterilkan dalam autoklaf 121 °C selama 15 menit, kemudian cairan media dituangkan ke dalam cawan Petri steril per 20 ml (Suryanie, 2001).

Kedua isolat bakteri (*Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*) diinokulasikan pada media kontrol dan media perlakuan dengan ulangan masing-masing lima kali. Isolat bakteri yang telah tersedia diambil menggunakan ose, kemudian digoreskan dalam media percobaan. Seluruh media yang telah ditanami kemudian diinkubasi dalam suhu 37 °C selama 24 jam. Pengamatan pertumbuhan bakteri dilakukan keesokan harinya dengan melihat perubahan warna media apakah media tersebut berubah warna atau tetap tidak ada perubahan.

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif kualitatif yang datanya berupa gambar atau foto yang menunjukkan perubahan warna koloni *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada media ekstrak daging sapi dan sari kacang hijau yang ditambah sitrat dan *bromthymol blue*, dan diolah secara deskriptif.

Hasil dan Pembahasan

Pertumbuhan koloni bakteri *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada media ekstrak daging sapi yang ditambahkan sari kacang hijau, sitrat dan *bromthymol blue* dapat dibedakan dengan sangat jelas secara visual baik warna koloni maupun warna media di sekitar koloninya. Media ekstrak daging sapi dan sari kacang hijau yang ditambah sitrat dan *bromthymol blue* yang tidak diinokulasi bakteri berwarna kuning. Pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada media tersebut tampak sangat jelas secara kasat mata. Koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* berwarna putih kebiruan, mukoid dengan media di sekitar koloni berwarna hijau. Pertumbuhan *Escherichia coli* pada media perlakuan tidak tampak begitu jelas. Bakteri *Escherichia coli* tumbuh dengan menampakkan koloni yang basah, bening (*colorless*), mengkilat dan media di sekitar koloni yang berwarna kuning.

Pada media kontrol yang terbuat dari campuran ekstrak daging sapi dan sari kacang hijau, kedua koloni bakteri menunjukkan perbedaan tetapi tidak terlalu jelas. Media sebelum diinokulasi bakteri berwarna coklat. Koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

berwarna putih kebiruan dan media di sekitarnya berwarna coklat. Pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada media kontrol tampak berwarna putih kecoklatan, tipis dan mengkilat yang masih tampak berbeda dengan warna media yang coklat.

Media ekstrak daging sapi dan sari kacang hijau yang ditambah sitrat dan *bromthymol blue* yang telah diinokulasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* mengalami perubahan warna dari kuning menjadi hijau. Perubahan ini terjadi akibat peningkatan pH media yang direspon oleh *bromthymol blue* yang menyebabkan warna media di sekitar koloni bakteri tersebut menjadi hijau. pH awal media sebelum diinokulasi bakteri berkisar antara enam hingga tujuh, setelah diinokulasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, pH meningkat menjadi lebih basa antara tujuh hingga delapan. Suasana yang alkalis disebabkan adanya senyawa natrium karbonat (Na_2CO_3) yaitu senyawa yang bersifat basa yang terbentuk dari reaksi karbondioksida (CO_2) dengan ion natrium dan air pada media (Mac Williams, 2010). Karbondioksida (CO_2) adalah produk limbah dari pengolahan sitrat. *Pseudomonas aeruginosa* adalah bakteri sitrat positif, artinya bakteri yang mampu mengolah sitrat eksogen sebagai sumber karbon dan energi. Pengolahan sitrat eksogen memerlukan dua enzim utama yaitu enzim *citrate permease* (*citrate transport protein*) sebagai enzim yang mentransport sitrat eksogen melewati dinding sel ke dalam sitoplasma sel bakteri, serta enzim *citritase* atau *citrate lyase* yang berperan memecah sitrat menjadi asetat dan oksaloasetat (Drider *et al.*, 2004; Mac Williams, 2010). Oksaloasetat selanjutnya dimetabolisme oleh enzim oksaloasetat dehidrogenase menjadi piruvat dan karbondioksida (CO_2) (Drider *et al.*, 2004; Mac Williams, 2010). Piruvat akan dimanfaatkan oleh bakteri menjadi energi sedangkan karbondioksida (CO_2) yang dihasilkan tidak digunakan oleh bakteri dan menjadi limbah. CO_2 tersebut kemudian bereaksi dengan ion natrium dan air dalam media sehingga menghasilkan suatu senyawa basa yaitu natrium karbonat (Na_2CO_3). Natrium karbonat yang terbentuk menyebabkan pH media di sekitar koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* meningkat, sehingga *bromthymol blue* yang ada pada media merespon kondisi ini dengan menampilkan warna hijau. *Bromthymol blue* tampak berwarna kuning

pada pH asam (sekitar enam) dan secara bertahap berubah menjadi biru pada pH yang lebih basa (sekitar 7,6) (Mac Williams, 2010).

Media ekstrak daging sapi dan sari kacang hijau yang ditambah sitrat dan *bromthymol blue* yang telah diinokulasi bakteri *Escherichia coli* tidak mengalami perubahan warna (tetap kuning). Perubahan tidak terjadi akibat pH media di sekitar koloni bakteri tidak meningkat tetapi menurun sehingga oleh *bromthymol blue* warnanya tetap kuning. pH awal media sebelum diinokulasi bakteri berkisar antara enam hingga tujuh, setelah diinokulasi bakteri *Escherichia coli* pH media menurun menjadi antara lima hingga enam (asam). Penurunan pH terjadi akibat metabolisme laktosa oleh bakteri. Metabolisme laktosa memerlukan dua enzim utama yaitu β -galaktosida permease yang berfungsi mentransport laktosa melalui dinding sel menuju sitoplasma sel bakteri, dan enzim β -galaktosidase yang menghidrolisis laktosa menjadi glukosa dan galaktosa. Glukosa selanjutnya dimetabolisme oleh bakteri melalui jalur *Embden-Meyerhoff Pathway* (EMP) yang menghasilkan produk akhir berupa zat-zat asam seperti asam laktat, asam suksinat, asam asetat, dan asam format (Pelczar and Reid, 1965; Winn *et al.*, 2006). Pada proses glikolisis melalui jalur *Embden-Meyerhoff Pathway*, glukosa akan dikatabolisme hingga terbentuk piruvat. Terdapat beberapa jalur alternatif dalam memanfaatkan piruvat, dan setiap bakteri melakukannya dengan cara berbeda sehingga dihasilkan produk akhir yang berbeda-beda dari organisme-organisme tersebut (Winn *et al.*, 2006). Jalur yang ditempuh oleh *Escherichia coli* dalam memanfaatkan piruvat adalah *Mixed Acid Fermentation Pathway* (Winn *et al.*, 2006). Pada proses tersebut, piruvat yang terbentuk dari proses glikolisis melalui EMP difermentasi oleh *Escherichia coli* dan menghasilkan produk-produk asam berupa asam asetat, asam format, asam suksinat dan asam laktat dalam jumlah besar, sehingga menyebabkan pH media menurun (Pelczar and Reid, 1965; Winn *et al.*, 2006). Pada pH asam *bromthymol blue* akan menampilkan warna kuning.

Media diferensial adalah media yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri berdasarkan pertumbuhan dan penampilannya

pada media, biasanya ditentukan berdasarkan perbedaan warna (Madigan *et al.*, 2009). Media ini selain mengandung nutrisi yang menunjang pertumbuhan bakteri, juga mengandung suatu indikator, biasanya adalah zat warna yang mempermudah dalam menentukan ada tidaknya reaksi kimia yang dilakukan oleh bakteri selama masa pertumbuhannya. Penambahan sitrat, laktosa dan *bromthymol blue* dimaksudkan untuk memberikan lingkungan yang bagus bagi bakteri tertentu sehingga dapat memberi perbedaan dengan koloni bakteri yang lain. Natrium sitrat yang dimasukkan dalam media perlakuan berfungsi sebagai nutrisi bagi bakteri-bakteri tertentu yaitu bakteri yang bersifat sitrat positif. Bakteri ini akan mengolah sitrat dan menghasilkan produk limbah berupa senyawa karbonat basa yang mampu meningkatkan pH. Sementara itu, bakteri yang tidak mampu mengolah sitrat akan menggunakan bahan-bahan lain dalam media seperti karbohidrat (laktosa) dan menghasilkan produk samping berupa zat asam yang akan menurunkan pH. Adanya peningkatan ataupun penurunan pH akan direspon oleh *bromthymol blue* yang menyebabkan perubahan warna media sehingga dapat langsung diamati secara kasat mata.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, warna koloni bakteri *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada media ekstrak daging sapi dan sari kacang hijau yang ditambah sitrat dan *bromthymol blue* dapat dibedakan. Koloni *Escherichia coli* pada media ekstrak daging sapi dan sari kacang hijau yang ditambah sitrat dan *bromthymol blue* tampak bening (*colorless*), basah, mengkilat dan media di sekitar koloni berwarna kuning. Koloni *Pseudomonas aeruginosa* pada media ekstrak daging sapi dan sari kacang hijau yang ditambah sitrat dan *bromthymol blue* tampak putih kebiruan, tebal dan mukoid serta media di sekitar koloni yang berwarna hijau.

Daftar Pustaka

- Brock, T. D., and M. T. Madigan. 1991. *Biology of Microorganisms*. 6th ed. Prentice Hall. New Jersey. USA.
- Drider, D., S. Bekal, and H. Prevost. 2004. Genetic Organization and Expression of Citrate Permease in Lactic Acid Bacteria. *Genet. Mol. Res.* 3(2): 271-281.
- Mac Williams, M. P. 2010. American Society for Microbiology: Citrate Test Protocol. <http://www.microbelibrary.org>. [7 Maret 2011].
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, P. V. Dunlap, and D. P. Clark. 2009. *Brock Biology of Microorganisms*. 12th ed. Pearson Education, Inc. USA.
- Merchant, I. A., and R. A. Packer. 1971. *Veterinary Bacteriology and Virology*. 7th ed. The Iowa State University Press. USA.
- Pelczar, M. J., and R. D. Reid. 1965. *Microbiology*. 2nd ed. Mc Graw Hill Book Company. New York. USA.
- Purwono dan R. Hartono. 2005. *Kacang Hijau: Teknik Budidaya di Berbagai Kondisi Lahan dan Musim*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Rahayu, E. S. R., Indrati T., Utami E., Harmayani M. N., dan Cahyono. 1993. *Bahan Pangan Hasil Fermentasi*. Food and Nutrition Culture Collection (FNCC). Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Soeparno. 2005. *Ilmu dan Teknologi Daging*. Edisi ke-4. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. Hal 1-5, 144-200, 216-219.
- Suryanie. 2000. Metode Pembuatan Media Pertumbuhan Kuman *Escherichia coli* Dari Ekstrak Daging Sapi. *Media Kedokteran Hewan* 16(1): 45-50. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Suryanie. 2001. Pembuatan Media Pertumbuhan Kuman *Streptococcus pyogenes* dan *Salmonella pullorum* Dari Ekstrak Daging Sapi Yang Ditambah Sari Kacang Hijau. *Media Kedokteran Hewan* 17(1): 18-22. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Tyasningsih, W. dan Suryanie. 1999. Pembuatan Media Pertumbuhan Beberapa Kuman dari Ekstrak Daging Sapi. *Media Kedokteran Hewan*. 15(4): 271-275. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.

Winn, W., S. Allen, W. Janda, E. Koneman, G. Procop, P. Schreckenberger, and G. Woods. 2006. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins. USA.