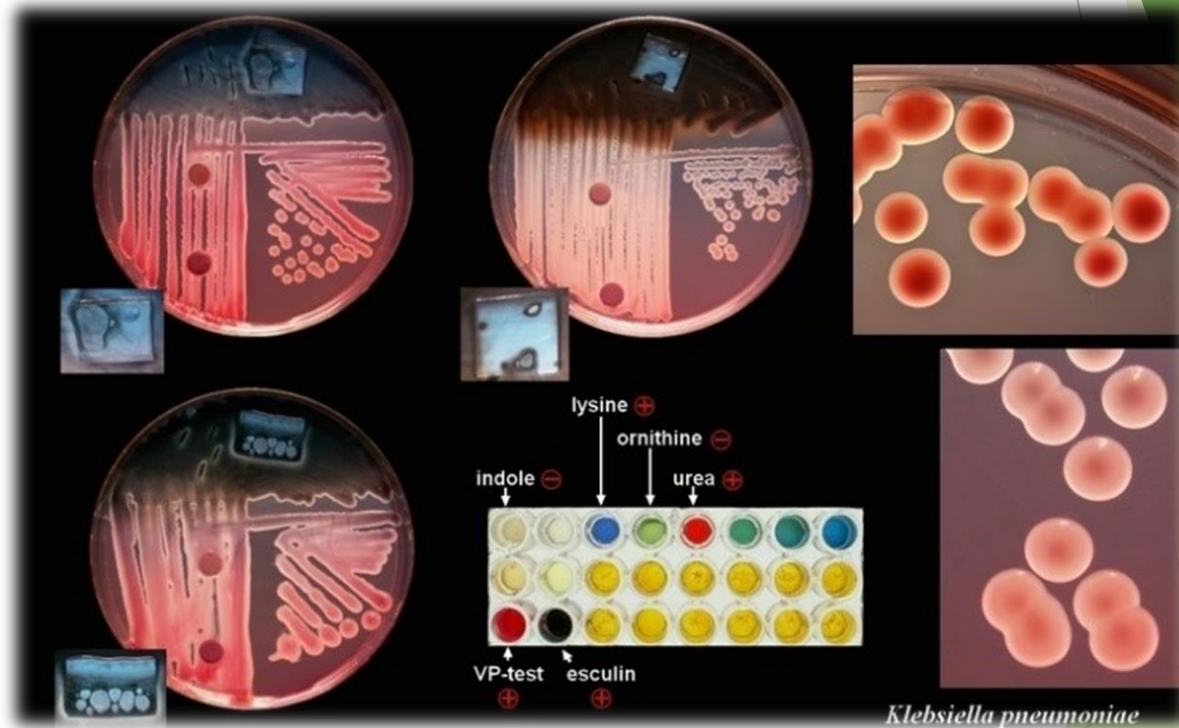


Identifikasi Bakteri

Purwanto
Fakultas Farmasi UGM

Metode yang sering digunakan :

1. Uji pewarnaan
2. Uji biokimia
3. Uji PCR



1. UJI PEWARNAAN

- Bakteri merupakan organisme yang sangat kecil → tipis sekali sehingga tembus cahaya.
- Akibatnya, akan sangat sulit untuk dilihat dengan teliti dibawah mikroskop
→ Agar dpt dilihat dgn jelas → Haruslah diwarnai

Pada dasarnya, pewarnaan bakteri → memperjelas kontras antara sel dan latar belakangnya, sehingga dapat mempertajam bentuk sel mikroba itu sendiri, dengan cara mewarnai sel-sel mikroba dengan zat warna khusus seperti kristal violet

Types of staining techniques

Simple staining
(use of **a single stain**)



**For visualization of
morphological
shape & arrangement.**

Differential staining
(use of **two contrasting stains**
separated by **a decolorizing agent**)

Identification

Gram
stain

Acid fast
stain

Visualization
of structure

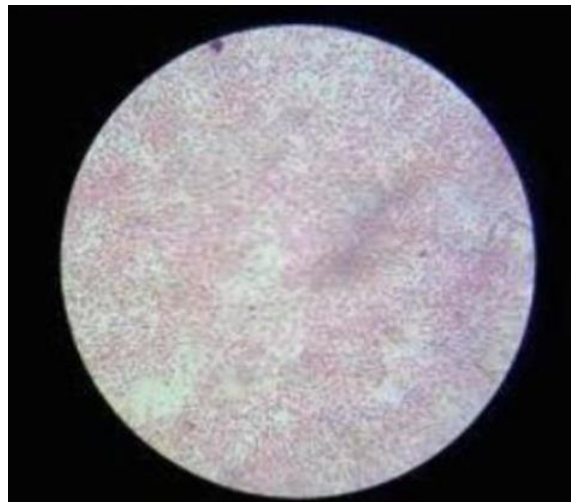
Spore
stain

Capsule
stain

1. UJI PEWARNAAN

a. Pewarnaan Sederhana

- ✓ Hanya menggunakan satu jenis zat warna
- ✓ Kebanyakan bakteri mudah bereaksi dengan pewarnaan-pewarnaan sederhana karena sitoplasamanya bersifat basofilik (suka dengan basa).
- ✓ Dapat mengetahui bentuk dan rangkaian sel-sel bakteri
- ✓ Contoh pewarna basa : biru metilen (30-60 detik), ungu kristal (10 detik) dan fukhsinkarbol (5 detik)

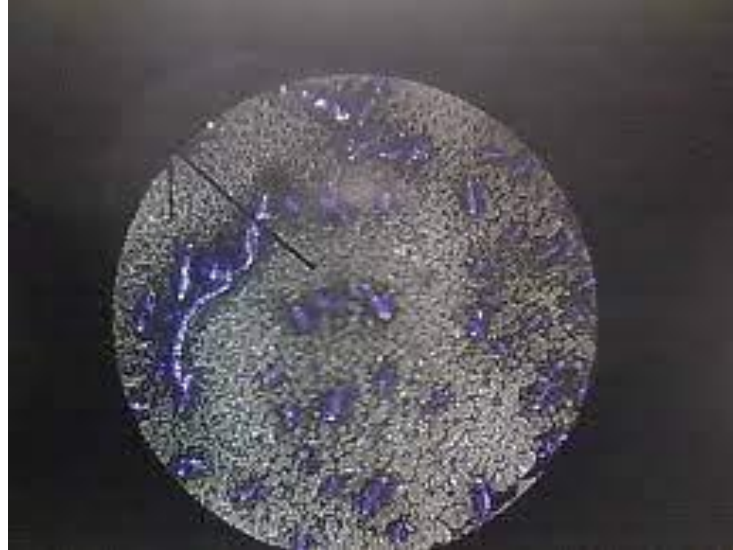


- *E. coli* dg mikroskop cahaya, perbesaran 40x.
- Berwarna ungu.
- Bentuk seperti batang (basil) pendek

1. UJI PEWARNAAN

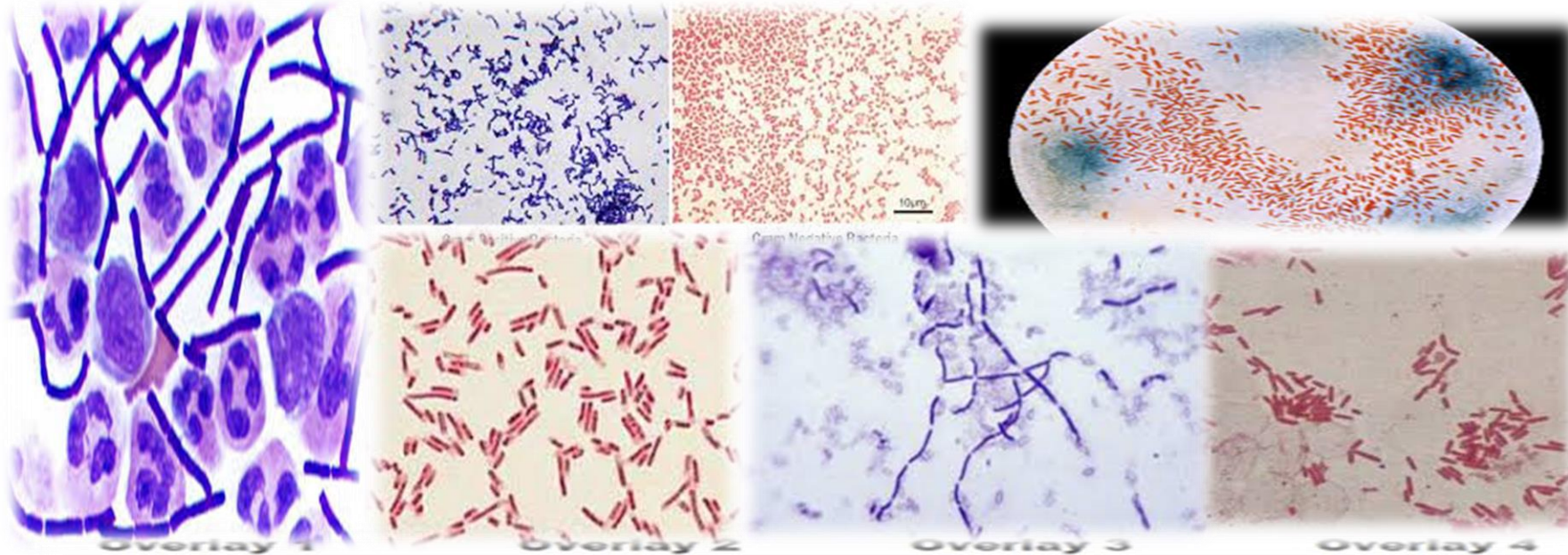
a. Pewarnaan Sederhana → pewarnaan negatif

- ✓ Untuk bakteri yang sulit diwarnai seperti spirochaeta
- ✓ Yang diwarnai adalah latar belakangnya
- ✓ Memerlukan pewarna asam seperti eosin atau negrosin
- ✓ Pewarna asam → sifatnya negatif, shg tidak menembus atau berpenetrasi ke dalam sel karena negative charge pada permukaan bakteri



1. UJI PEWARNAAN

b. Pewarnaan Gram



History of Gram Staining....



Hans Christian Joachim Gram

- Seorang bakteriologi Denmark. Di Berlin, pada tahun 1884, ia mengembangkan metode untuk membedakan antara dua kelompok utama bakteri. Teknik ini, pewarnaan Gram, terus menjadi prosedur standar dalam mikrobiologi medis. Gram mendapatkannya saat mempelajari jaringan paru-paru dari seorang pasien yang meninggal karena **pneumonia**.

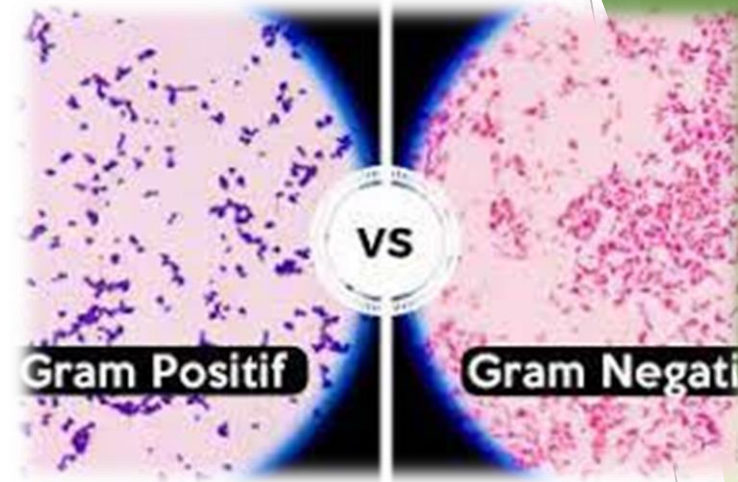
Gram, H.C. (1884). "Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten". Fortschritte der Medizin (in German). 2: 185-189.

Pewarnaan Gram:

- Merupakan pewarnaan differensial yang cukup penting dalam bakteriologi
- Bakteri diklasifikasikan kedalam dua bagian besar :

a) Gram positive:

- Penampakannya ungu setelah pewarnaan Gram
- Membran dalam sitoplasma
- Lapisan luar yang tebal terdiri dari peptidoglikan (60-100%)
- Contoh: *Clostridium botulinum* , *Bacillus subtilis* , *S. aureus* & *Lactobacillus* sp



b) Gram negative:

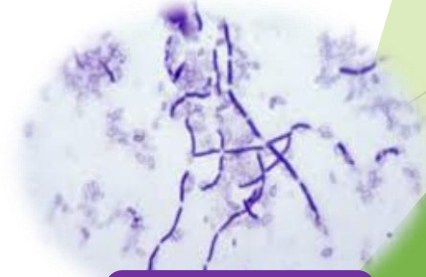
- Penampakannya merah setelah pewarnaan Gram
- Membran dalam sitoplasma
- Lapisan peptidoglikan (5-10%)
- Lapisan luar terdiri LPS (Lipopolisakarida)
- Contoh: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans* , *vibrio cholera*

Prinsip Pewarnaan Gram

Memberi pewarna *Kristal violet*, *Larutan iodine*, *Etanol* dan *Safranin* pada bakteri yang ingin diketahui warnanya. bakteri **Gram positif** akan berwarna **ungu** dan bakteri **Gram negative** akan berwarna **merah/pink**.



Gram (-)



Gram (+)

Fungsi Reagen

KIAS Kristal violet
Iodin
Alkohol
Safranin

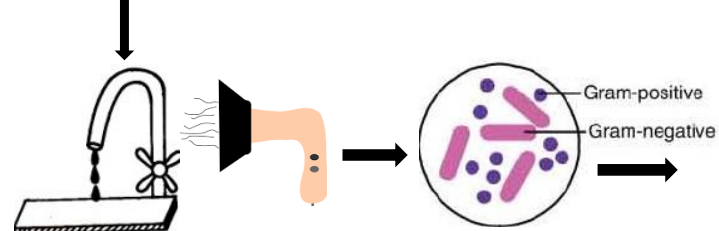
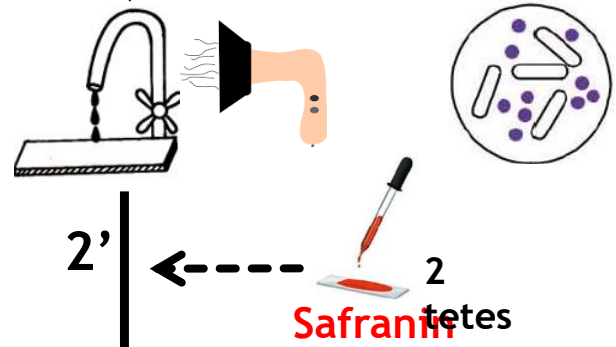
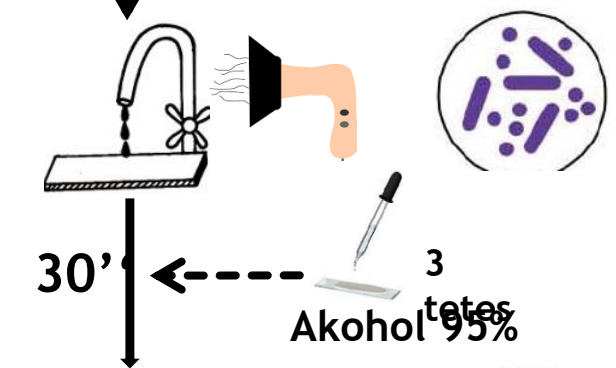
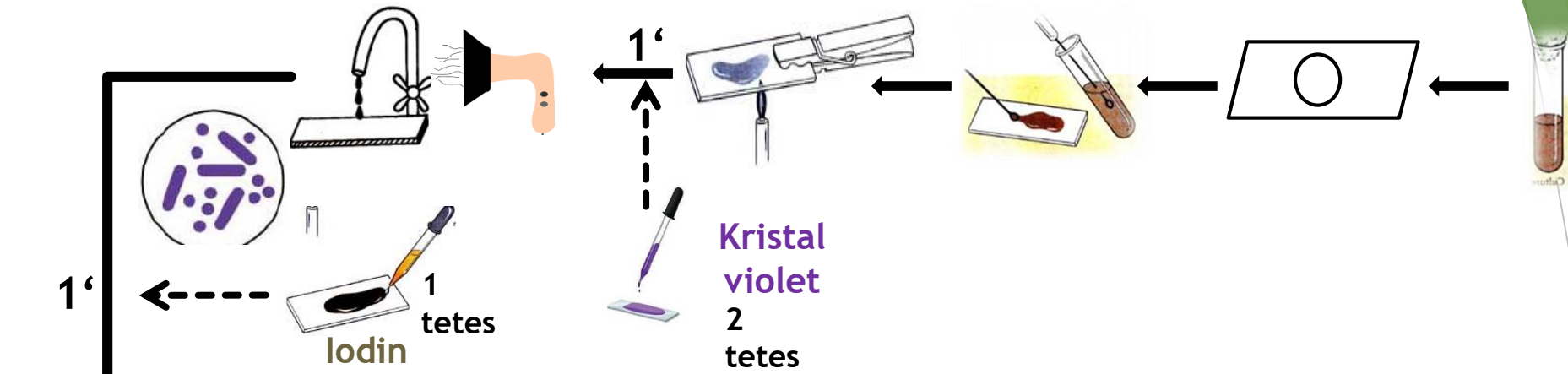


- Pewarna utama
- Mewarnai membran sel menjadi warna ungu

- Mordant
- Menjadikan warna utama kompleks tidak larut pada dinding sel

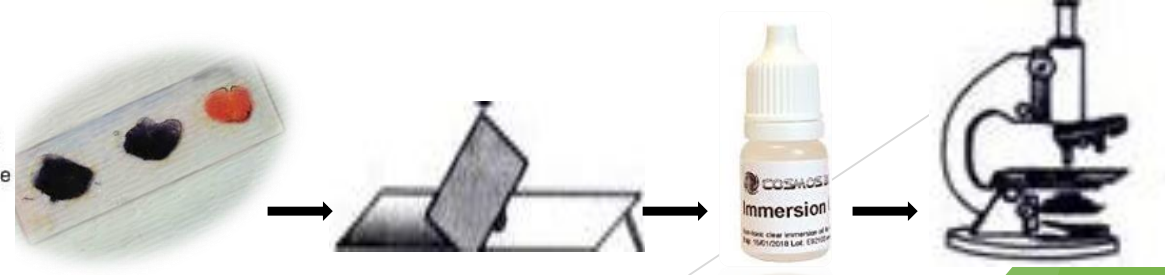
- Decolorization
- Alkohol 95% sudah bisa melarutkan membran luar pada bakteri Gram negatif

- Counterstain
- Diserap membran yang sebelumnya tidak berwarna pada Gram (-)



Metode Pewarnaan Gram

<https://www.youtube.com/watch?v=Jy2I5NmKnGg>



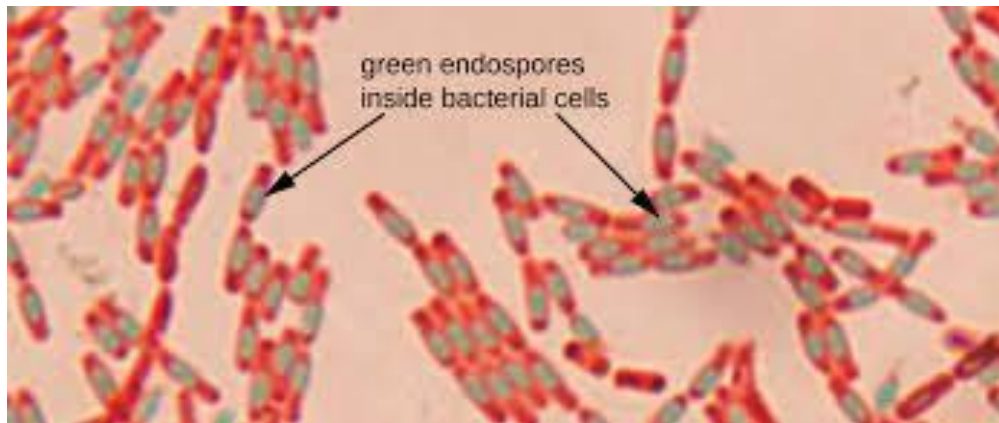
Faktor-faktor keberhasilan pewarnaan Gram

- ❑ Umur kultur
- ❑ Pencucian dengan air mengalir
- ❑ Waktu *decolorization*
 - *Over* : Gram (+) terlihat sebagai Gram (-)
 - *Low* : Gram (-) terlihat sebagai Gram (+)
- ❑ Waktu fiksasi
 - *Over* : Gosong → kultur berwarna hitam
 - *Low* : Tidak ada kultur pada slide → tidak menempel
- ❑ Konsentrasi reagent
- ❑ Umur reagent
- ❑ Endapan reagent

1. UJI PEWARNAAN

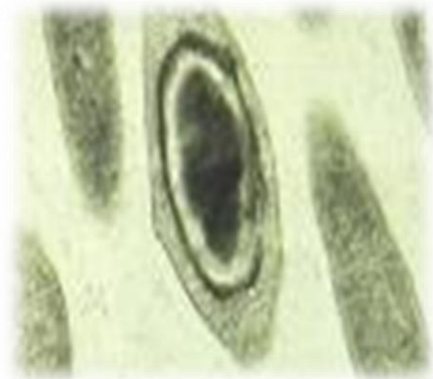
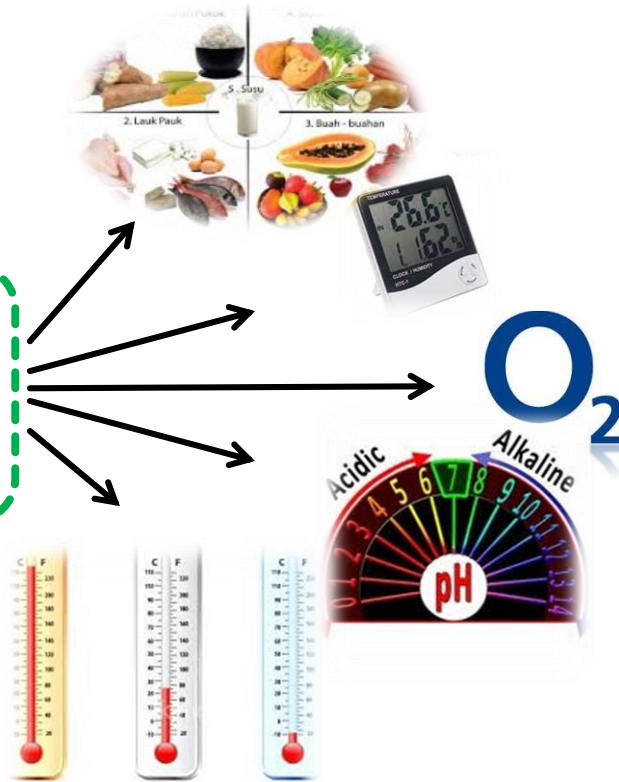
c. Pewarnaan Khusus

- Mewarnai organel tertentu dari bakteri
- Contoh : pewarnaan endospora dari Clostridium



Endospora

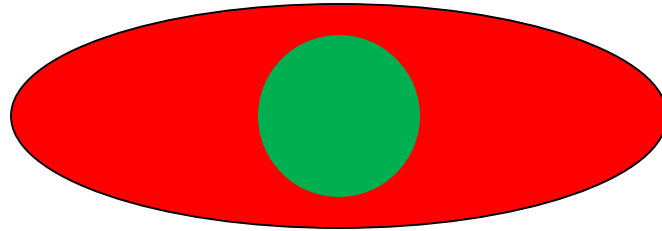
Struktur dorman yang nonreproduktif, sebagai bentuk pertahanan diri dari lingkungan yang ekstrim



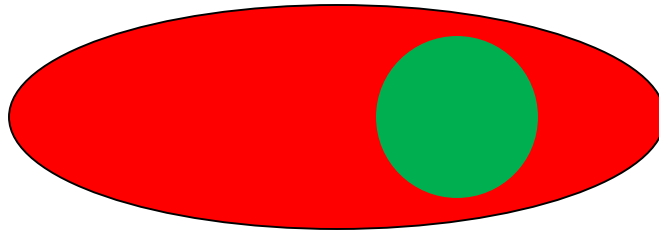
Letak Endospora

- ▶ Central, Sub-Terminal, and Terminal spores

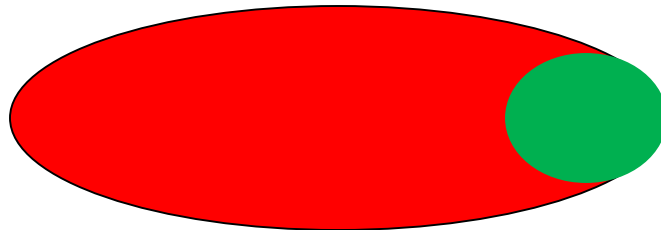
Central



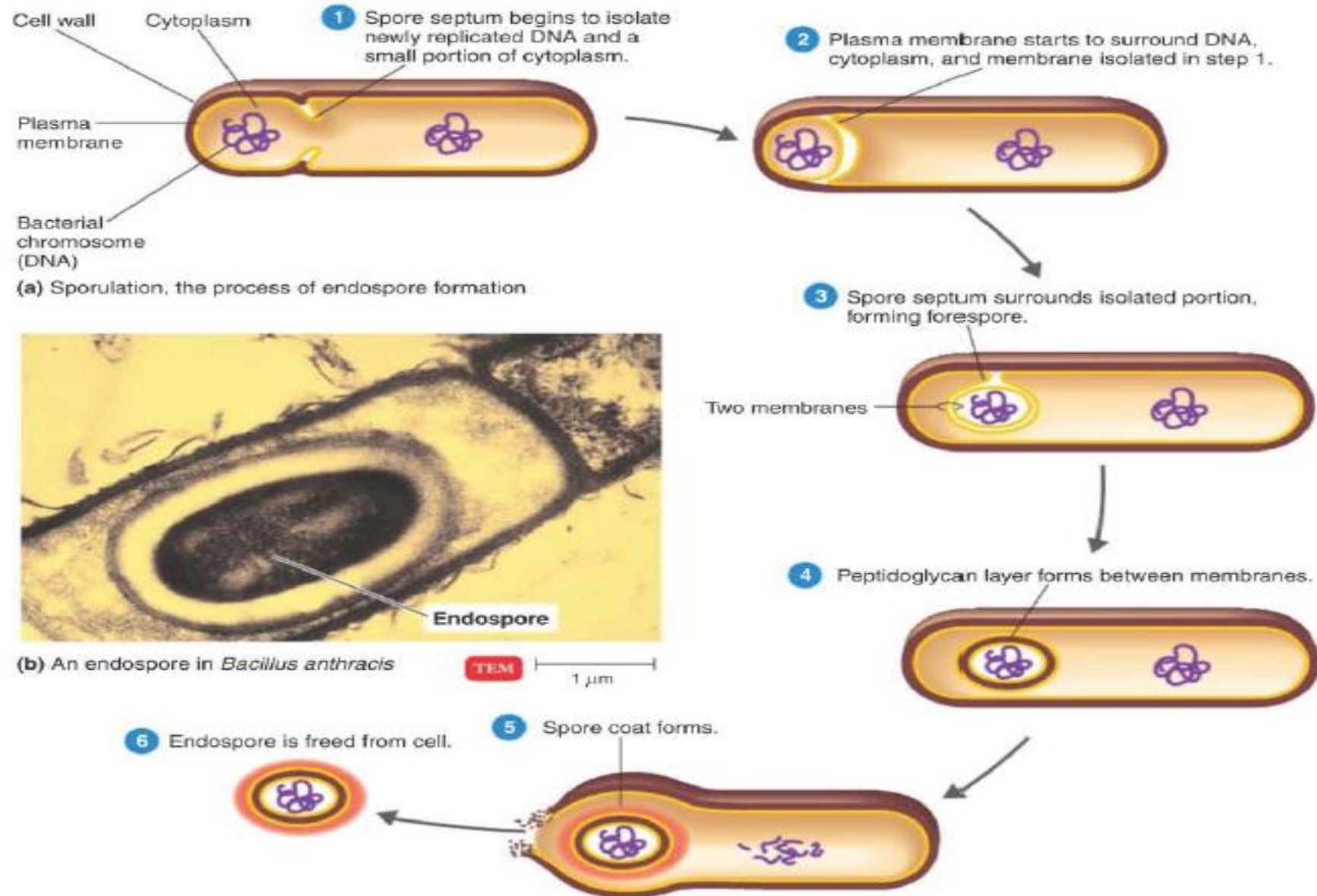
Sub-Terminal



Terminal



Pembentukan Endospora



(a) Sporulation, the process of endospore formation

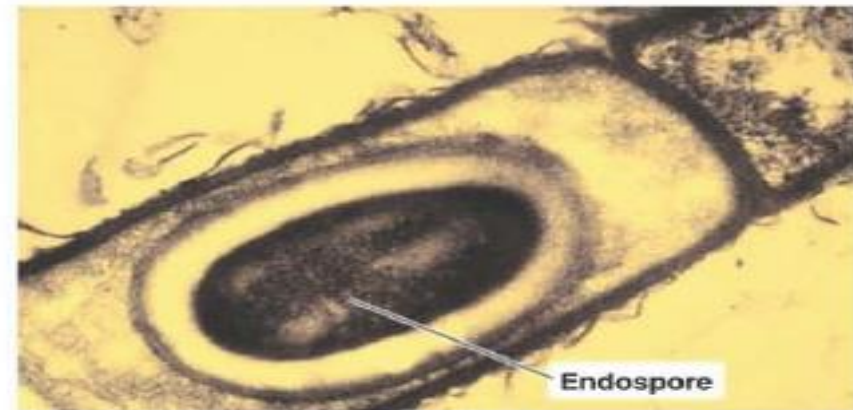


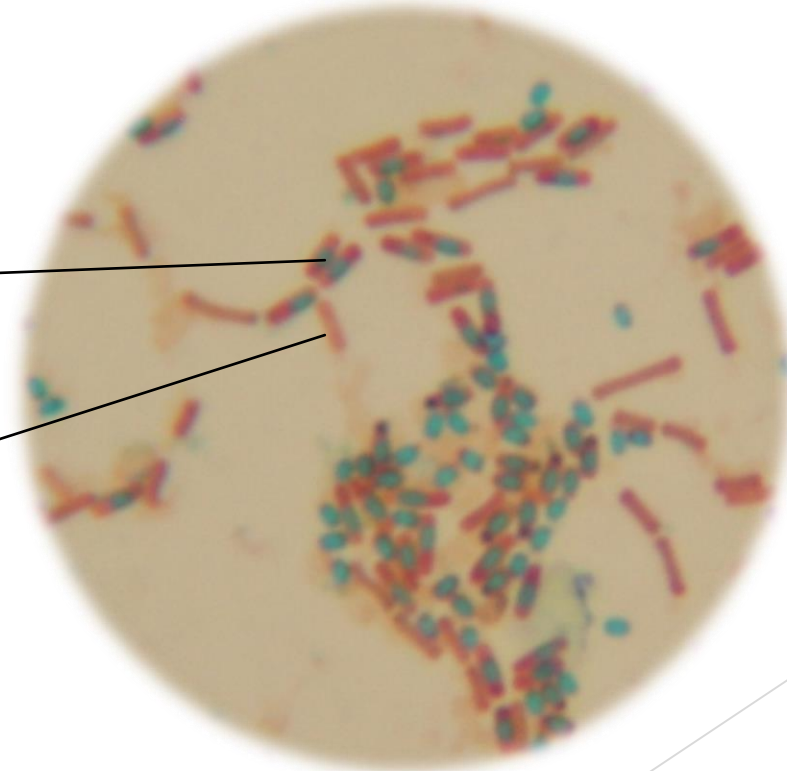
Figure 4.21 Formation of endospores by sporulation.

Prinsip Pewarnaan Endospora “Metode *Schaeffer-Fulton*”

Membedakan **SEL SPORA** dengan **SEL VEGETATIF** menggunakan pereaksi malachite green yang diikat oleh spora setelah pencucian dengan air

Endospora

Sel Vegetatif



Fungsi Reagent



- Pewarna utama
- Mewarnai dinding sel spora menjadi warna hijau
- Terikat pada protein kreatin sel spora



- Counterstain
- Mewarnai dinding sel vegetatif menjadi warna pink akibat *decolorizer* yang meluruhkan dinding sel

2. UJI BIOKIMIA

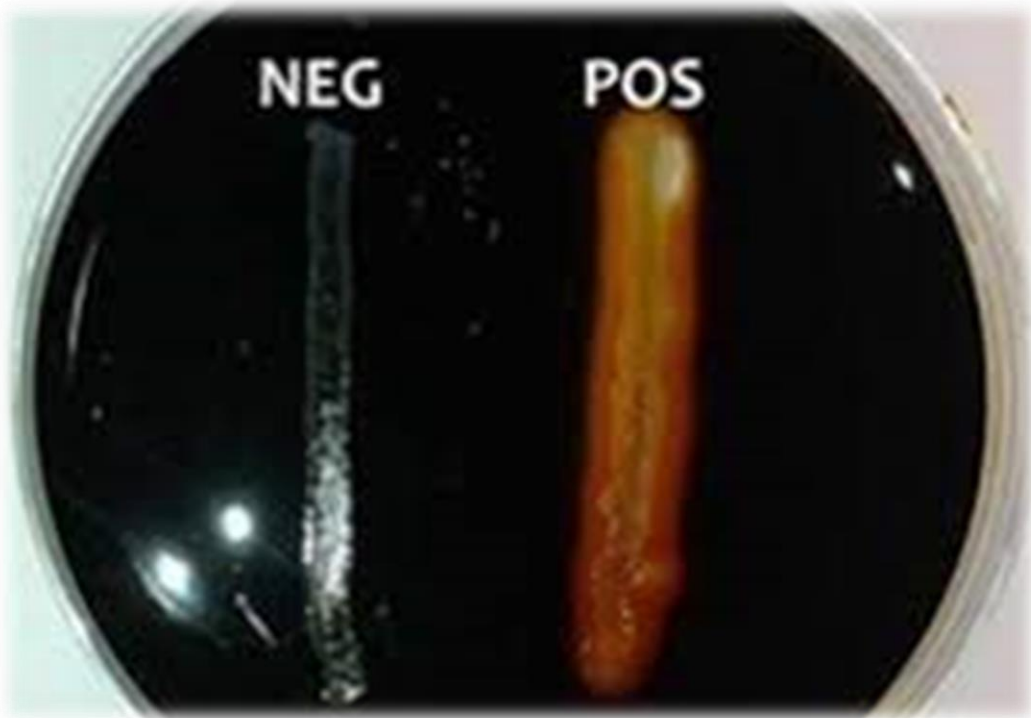
- ❖ Identifikasi bakteri berdasar sifat-sifat fisiologinya
- ❖ Proses biokimia erat kaitannya dengan metabolisme sel
- ❖ Metabolisme sel bakteri (melibatkan enzim) bs dibedakan satu sama lain

MACAM

1. Uji hidrolisis pati
2. Uji hidrolisis gelatin
3. Uji katalase

2. UJI BIOKIMIA

a. Uji hidrolisis pati



- Media uji bakteri ditambah pati
- Setelah pertumbuhan bakteri, permukaan media ditambah larutan iodine



**Pati yang terhidrolisis
tidak berwarna biru**

Apa artinya ???

2. UJI BIOKIMIA

b. Uji hidrolisis gelatin

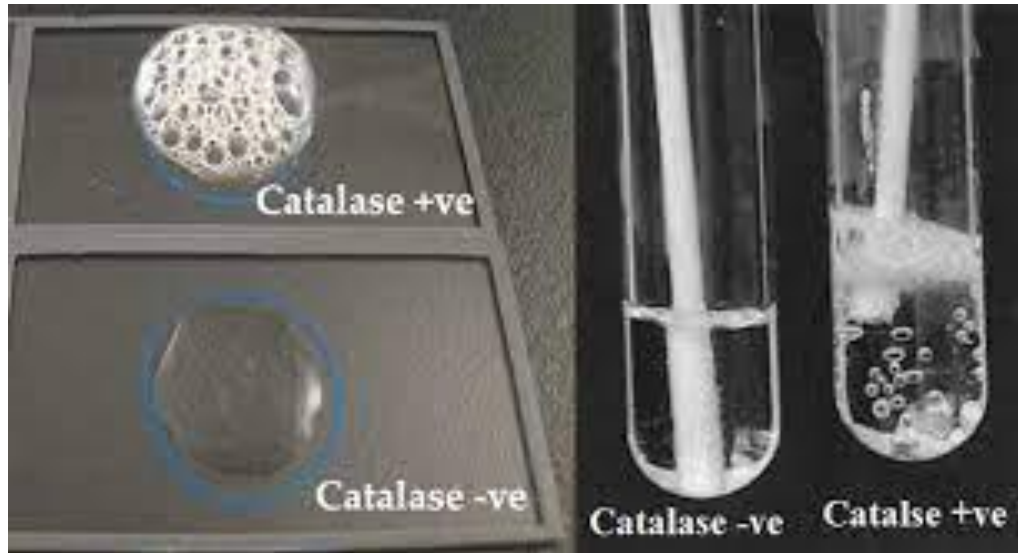


Daerah disekitar
biakan Bacillus menjadi bening

Apa artinya ???

2. UJI BIODIAGNOSTIK

c. Uji katalase



Biakan bakteri ditambah H_2O_2

Apa artinya ???

3. UJI PCR

Polymerase Chain Reaction → metode utk menggandakan potongan DNA tertentu

Prinsip dalam identifikasi bakteri :

- Urutan ribosom sub unit 16 S adalah spesifik utk tiap bakteri

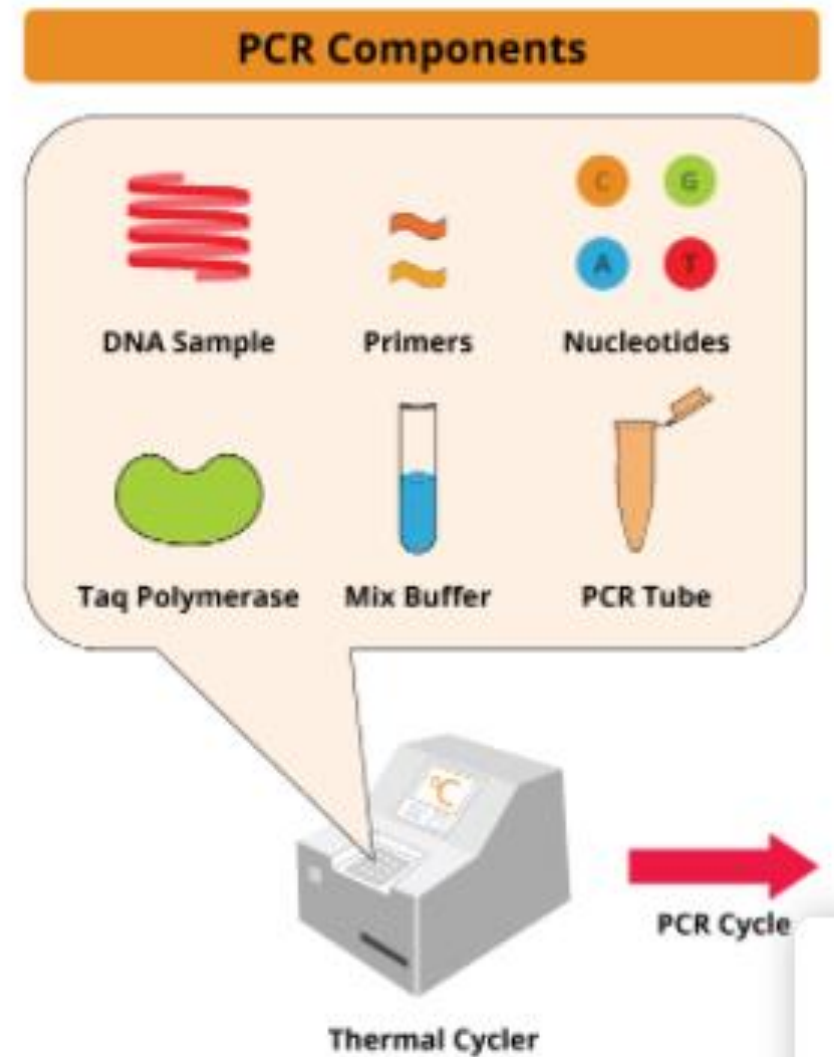
Hasil PCR dari unit 16 S sampel uji



Di sekuensing/dicari urutan DNANYA



Dibandingkan dengan data base





thank
you