

KULTIVASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ANAEROB *BACTEROIDES FRAGILIS*Conny Riana Tjampakasari^{1*}, Nadyatul Hanifah²¹Departemen Mikrobiologi FKUI
²Program Magister Ilmu Biomedik FKUI

Email Korespondensi: connyrianat@yahoo.com

Disubmit: 12 Agustus 2023

Diterima: 24 September 2023

Diterbitkan: 01 November 2023

Doi: <https://doi.org/10.33024/mahesa.v3i11.11537>**ABSTRACT**

*Anaerobic infections are infections caused by bacteria that grow and develop without the need for oxygen. Anaerobic bacteria are found in various human bodies such as on the skin, mucosal surfaces, and are in high concentrations in the mouth and digestive tract as part of the normal flora. These bacteria can infect deep wound, deeper tissues, and internal organs that require little oxygen. Cultivation and identification of anaerobic bacteria is one of the most important steps as the basis diagnosis of a disease. Cultivation can be done by choosing the right medium, while to get a growth environment without oxygen, an anaerobic jar equipped with an anaerogen chemical gas generation sachet is used. The process of identifying bacteria was carried out starting from Gram staining followed by a carbohydrate utilization examination. Technological developments support the development of various automatic methods to identify anaerobic bacteria, one of which is the Vitek-2 machine. *Bacteroides fragilis* from clinical specimens was successfully identified with a probability of >90%, Gram negative, rod-shaped anaerobic bacterium.*

Keywords: Cultivation, Identification, Anaerobic Bacteria

ABSTRAK

Infeksi anaerob adalah infeksi yang disebabkan oleh bakteri yang tumbuh dan berkembang tanpa membutuhkan oksigen. Bakteri anaerob ditemukan pada berbagai tubuh manusia seperti di kulit, permukaan mukosa, dan berada dalam konsentrasi tinggi di mulut dan saluran pencernaan sebagai bagian dari flora normal. Bakteri ini dapat menginfeksi luka yang dalam, jaringan yang lebih dalam, dan organ dalam yang membutuhkan sedikit oksigen. Kultivasi dan proses identifikasi bakteri anaerob menjadi salah satu tahapan yang sangat penting sebagai dasar diagnosis terhadap suatu penyakit. Kultivasi dapat dilakukan dengan pemilihan medium yang tepat sedangkan untuk mendapatkan lingkungan pertumbuhan tanpa oksigen digunakan jar anaerob yang dilengkapi dengan gas *generation sachet anaerogen chemical*. Proses identifikasi bakteri dilakukan mulai dari pewarnaan Gram dilanjutkan dengan uji pemanfaatan karbohidrat. Perkembangan teknologi menunjang berkembangnya berbagai metode otomatis untuk melakukan identifikasi bakteri anaerob, salah satunya adalah mesin Vitek-2. *Bacteroides fragilis* dari spesimen klinik berhasil diidentifikasi dengan probabilitas >90%, merupakan bakteri anaerob berbentuk batang bersifat Gram negatif.

Kata Kunci: Kultivasi, Identifikasi, Bakteri Anaerob

PENDAHULUAN

Setiap mikroorganisme di alam selalu melakukan aktivitas metabolisme dasar untuk menjaga kelangsungan hidupnya. Begitu pula dengan mikroba. Bakteri dalam aktivitas hidupnya memerlukan molekul karbon sebagai salah satu sumber nutrisi dan energi untuk melakukan metabolisme dan berkembang biaknya (Fifendy, 2017). Metabolisme bakteri merupakan semua reaksi biokimia yang terjadi pada sel bakteri, termasuk anabolisme dan katabolisme yang dikatalisis oleh enzim metabolik. Metabolisme bakteri merupakan semua reaksi biokimia yang terjadi pada sel bakteri, termasuk anabolisme dan katabolisme yang dikatalisis oleh enzim metabolik (Syauqi, 2017).

Oksigen bebas dari udara sangatlah penting bagi bakteri untuk respirasi sel, namun keperluan bakteri akan oksigen bebas tersebut sangatlah berbeda, tergantung pada adanya sistem enzim biooksidatif yang ada pada tiap spesies, sehingga dikenal adanya respirasi aerob dan anaerob. Respirasi yang menggunakan oksigen bebas sebagai penerima elektron disebut respirasi aerob, dan yang menggunakan senyawa anorganik sebagai penerima elektron disebut respirasi anaerob.

Identifikasi dan isolasi bakteri anaerob tentunya berbeda dengan bakteri aerob. Kultur bakteri anaerob obligat memerlukan kondisi tidak adanya oksigen di lingkungan. Oksigen bersifat racun pada bakteri ini beracun, karena tidak memiliki pertahanan terhadap kehidupan aerobik maka tidak dapat bertahan hidup di udara. Proses identifikasi dapat dilakukan dengan cara konvensional dan otomatis. Teknologi terbaru menggunakan mesin otomatis

Vitek-2 dapat memudahkan proses identifikasi dengan waktu relatif cepat. Hasil yang diperoleh berupa identifikasi dan uji kepekaan kepekaan antibiotik yang sudah divalidasi dan sesuai dengan standar *The Clinical Laboratory Standard International (CLSI)* (Murwani, 2015).

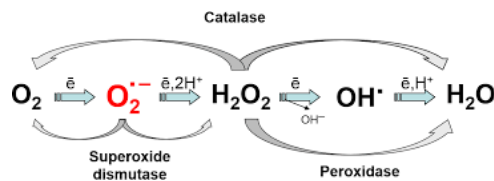
KAJIAN PUSTAKA

Bakteri Anaerob

Oksigen bebas dari udara sangatlah penting bagi bakteri untuk respirasi sel, namun keperluan bakteri akan oksigen bebas tersebut sangatlah berbeda, tergantung pada adanya sistem enzim biooksidatif yang ada pada tiap spesies, sehingga dikenal adanya respirasi aerob dan anaerob. Respirasi yang menggunakan oksigen bebas sebagai penerima elektron disebut respirasi aerob, dan yang menggunakan senyawa anorganik sebagai penerima elektron disebut respirasi anaerob (Nasution, 2022). Berdasarkan dari kebutuhan terhadap oksigen, bakteri dapat digolongkan menjadi:

1. Aerob : Tumbuh di udara sekitar, yang mengandung 21% oksigen dan sejumlah kecil (0,03%) karbondioksida, contoh: *Bacillus cereus*.
2. Aerob obligat: Bakteri ini memiliki kebutuhan mutlak akan oksigen untuk tumbuh, contoh: *Pseudomonas aeruginosa* dan *Mycobacterium tuberculosis*.
3. Anaerob obligat : Bakteri yang sama sekali tidak dapat tumbuh pada kondisi ada oksigen. contoh: *Clostridium perfringens* dan *Clostridium botulinum*.
4. Anaerob fakultatif: Bakteri ini mampu tumbuh di bawah kondisi aerobik dan anaerobik, contoh: Kelompok *Enterobacteriaceae*, dan *Staphylococcus aureus*.

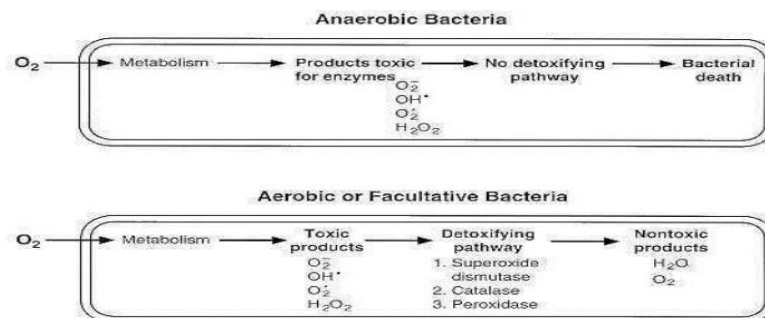
5. Aerotoleran anaerob: Adalah bakteri anaerob yang tidak terbunuh oleh paparan oksigen.
6. Capnophiles: Bakteri *capnophilic* membutuhkan peningkatan konsentrasi karbondioksida (5%-10%) dan sekitar 15% oksigen. Kondisi ini dapat dicapai dengan inkubasi di toples lilin (3% karbondioksida) atau inkubator karbondioksida, contoh: *Haemophilus influenzae* dan *Neisseria gonorrhoeae*.
7. Mikroaerofilik: Kelompok bakteri yang dapat tumbuh di oksigen tereduksi (5% hingga 10%) dan peningkatan karbondioksida (8% hingga 10%). Ketegangan oksigen yang lebih tinggi mungkin menghambat mereka. Lingkungan ini dapat diperoleh dalam stoples atau adah yang dirancang khusus, contoh: *Campylobacter jejuni*, dan *Helicobacter pylori* (Ridwan, 2018).



Gambar 1. Enzim yang terdapat di bakteri aerob

Kebutuhan oksigen bakteri mencerminkan mekanisme yang digunakan oleh bakteri tertentu untuk memenuhi kebutuhan energi mereka. Anaerob obligat tidak melakukan fosforilasi oksidatif. Selanjutnya akan terbunuh dengan keberadaan oksigen. Bakteri anaerob obligat kekurangan enzim katalase, peroksidase dan superoksida dismutase. Katalase merupakan enzim yang memiliki

fungsi untuk memecah hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air dan oksigen, peroksidase berfungsi untuk memecah H_2O_2 menjadi air dan superoksida dismutase berfungsi untuk mengubah O_2^- menjadi H_2O_2 dan O_2 (Gambar 1). Enzim-enzim ini mendetoksifikasi peroksida (H_2O_2) dan radikal bebas oksigen yang dihasilkan selama metabolisme dengan adanya oksigen



Gambar 2. Perbedaan Metabolisme Pada Bakteri Anaerob Dan Aerob

Keberadaan oksigen justru menyebabkan bakteri anaerob mati atau terhambat pertumbuhannya. Hal ini dikarenakan dalam suasana terdapat

oksigen akan terbentuk H_2O_2 (radikal bebas) dan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang bersifat toksik terhadap bakteri anaerob (Gambar 2).

Asimilasi glukosa dalam kondisi aerobik menghasilkan generasi terminal superoksida radikal bebas (O_2^-). Superoksida direduksi oleh enzim superoksida dismutase menjadi gas oksigen dan Hidrogen peroksida (H_2O_2). Selanjutnya, hidrogen peroksida beracun yang dihasilkan dalam reaksi ini diubah menjadi air dan oksigen oleh enzim katalase, yang ditemukan pada bakteri aerobik dan anaerobik fakultatif, atau oleh berbagai peroksidase yang ditemukan pada beberapa bakteri anaerob aerotoleran.

Bakteri anaerob biasanya ditemukan di area tubuh tertentu tetapi menyebabkan infeksi serius ketika mereka memiliki akses ke cairan tubuh yang biasanya steril atau jaringan dalam yang kurang teroksigenasi. Beberapa anaerob biasanya hidup di celah-celah kulit, di hidung, mulut, tenggorokan, usus, dan vagina (Usman, 2022). Cedera pada jaringan ini (terpotong, luka tusukan, atau trauma) terutama pada atau berdekatan dengan selaput lendir memungkinkan bakteri anaerob masuk ke area tubuh yang steril dan merupakan penyebab utama infeksi anaerob. Sumber

kedua infeksi anaerob terjadi dari masuknya spora ke tempat yang biasanya steril. Bakteri anaerob penghasil spora hidup di tanah dan air, dan spora dapat masuk melalui luka, terutama tusukan. Infeksi anaerob paling mungkin ditemukan pada orang yang mengalami immunosupresi, mereka yang baru-baru ini diobati dengan antibiotik spektrum luas, dan orang yang memiliki cedera jaringan yang membusuk pada atau di dekat selaput lendir, terutama jika tempat tersebut berbau busuk. Identifikasi anaerob sangat kompleks, dan laboratorium dapat menggunakan sistem identifikasi yang berbeda. Mikroorganisme ini diidentifikasi dengan melihat morfologi kolonial dan mikroskopis selnya, pertumbuhan pada media selektif, toleransi oksigen, karakteristik biokimia (termasuk fermentasi gula, kelarutan empedu, eskulin, pati, dan hidrolisis gelatin, pencernaan kasein dan gelatin, katalase, lipase, lesitinase, dan produksi indol, reduksi nitrat, asam lemak volatil), kerentanan terhadap antibiotik (dengan metode pengenceran kaldu tabung mikro) (Dunders. 2020).



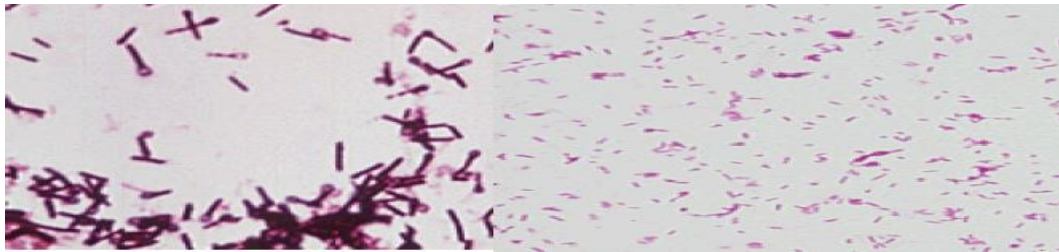
Gambar 3. Alat Vitek-2 dan kaset

Selain identifikasi menggunakan metode konvensional, telah dikembangkan metode identifikasi otomatis, yaitu menggunakan alat Vitek-2 (Gambar 3). Alat ini merupakan alat bersistem

otomatik tinggi (*Highly Automatic System*) untuk identifikasi dan antimikroba berdasarkan prinsip *Advanced Colorimetry* dan *Turbidimetry*. Hasil ini memungkinkan selesai dalam waktu

5-8 jam sedangkan pemeriksaan bakteri anaerob biasanya memerlukan waktu lebih lama dari 12-18 jam. Pengumpulan spesimen bakteri anaerob merupakan salah satu tahap penting dalam kultur, termasuk bagaimana langkah agar bisa mengumpulkan spesimen bebas kontaminasi dan melindunginya dari paparan oksigen. Kultur bakteri anaerob harus diperoleh dari tempat yang sesuai tanpa petugas kesehatan mengontaminasi sampel dengan bakteri dari kulit, selaput lendir, atau jaringan yang berdekatan. Swab

harus dihindari saat mengumpulkan spesimen untuk biakan anaerob karena serat kapas dapat merusak bakteri anaerob. Abses atau cairan dapat disedot menggunakan spuit steril yang kemudian ditutup rapat untuk mencegah masuknya udara. Sampel jaringan harus ditempatkan ke dalam kantong tanpa gas dan disegel, atau ke dalam botol ulir bergas yang mungkin berisi media kultur prereduksi bebas oksigen dan ditutup rapat. Spesimen harus kultur di medium secepat mungkin.



Gambar 4. Pewarnaan Gram, Kiri: *Actinomyces* Gram Postif Batang; Kanan: *Bacteroides* Gram Negatif Batang

Pemeriksaan penting yang perlu dilakukan adalah pewarnaan Gram (Gambar 4). Pewarnaan Gram dilakukan dengan metoda teknik pewarnaan bertingkat. Zat warna yang digunakan adalah kristal violet, lugol iodin, safranin, alkohol dan air suling. Contoh bakteri anaerob Gram positif meliputi: *Actinomyces* (infeksi kepala, leher, panggul; pneumonia aspirasi); *Bifidobacterium* (infeksi telinga, infeksi perut); *Clostridium* (gas, gangren, keracunan makanan, tetanus, kolitis pseudomembran); *Peptostreptococcus* (infeksi mulut, pernapasan, dan intra- abdomen), dan *Propionibacterium* (infeksi shunt).

Sedangkan bakteri anaerob Gram negatif meliputi: *Bacteroides* (anaerob yang paling sering ditemukan dalam kultur; infeksi intra-abdomen, abses rektal, infeksi jaringan lunak, infeksi hati),

Fusobacterium (abses, infeksi luka, infeksi paru dan intrakranial), *Porphyromonas* (pneumonia aspirasi, periodontitis), dan *Prevotella* (infeksi intra-abdomen, infeksi jaringan lunak):

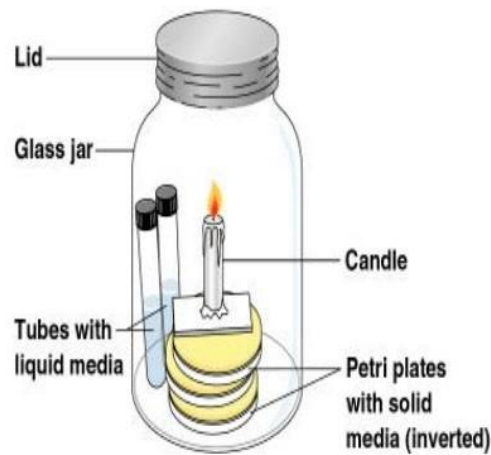
Kultur bakteri anaerob adalah metode yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri anaerob dari spesimen klinis. Anaerob obligat adalah bakteri yang hanya dapat hidup tanpa adanya oksigen. Anaerob obligat dihancurkan ketika terkena atmosfer selama 10 menit. Beberapa anaerob toleran terhadap sejumlah kecil oksigen. Anaerob fakultatif adalah organisme yang akan tumbuh dengan atau tanpa oksigen. Metode memperoleh spesimen untuk kultur anaerobik dan prosedur kultur dilakukan untuk memastikan bahwa organisme terlindung dari oksigen. Sangat penting bahwa penyedia layanan kesehatan mendapatkan sampel

untuk kultur melalui teknik aseptik. Beberapa jenis spesimen harus selalu dibiakkan untuk anaerob jika dicurigai adanya infeksi. Termasuk specimen abses, gigitan, darah, cairan serebrospinal dan cairan tubuh eksudatif, luka dalam, dan jaringan mati. Spesimen harus dilindungi dari oksigen selama pengumpulan dan pengangkutan dan harus segera dibawa ke laboratorium. Kultur harus ditempatkan di lingkungan yang bebas oksigen, pada suhu 35 ° C selama 48 jam sebelum pelat diperiksa untuk pertumbuhan.

Pada umumnya anaerob obligat tidak hanya membutuhkan tidak adanya oksigen untuk memulai pertumbuhan, tetapi juga potensial redoks di bawah -300mV, yang hanya dapat dicapai dengan suplementasi media dengan agen pereduksi. Kaldu tioglikolat adalah media diferensial yang diperkaya untuk menentukan kebutuhan oksigen mikroorganisme. Natrium tioglikolat dalam media mengkonsumsi oksigen dan memungkinkan pertumbuhan anaerob obligat, dikombinasikan dengan difusi oksigen dari bagian atas kaldu dan menghasilkan berbagai konsentrasi oksigen di media sepanjang kedalamannya. Konsentrasi oksigen pada tingkat tertentu ditunjukkan oleh pewarna sensitif redoks seperti resazurin yang berubah menjadi merah muda dengan adanya oksigen. Media pereduksi secara kimiawi menghilangkan molekul oksigen (O²) yang dapat mengganggu pertumbuhan bakteri anaerob. Media pelapisan utama untuk menginokulasi spesimen anaerob meliputi agar darah nonselektif dan media selektif.

Media yang dapat digunakan untuk kultur bakteri anaerob adalah agar darah anaerob (media nonselektif untuk isolasi anaerob dan fakultatif anaerob), brucella agar / agar brucella + kanamisin, agar kuning telur (nonselektif untuk membuat produksi lesitinase dan lipase oleh *clostridia* dan *fusobacteria*), dan kaldu daging masak (nonselektif anaerob). Brucella Agar Base dengan suplemen direkomendasikan untuk pengayaan, isolasi, dan kultivasi spesies *Brucella* atau *Campylobacter* dari spesimen klinis dan nonklinis. Media brucella adalah media modifikasi yang diformulasikan untuk mendukung pertumbuhan subur bakteri lainnya seperti *Streptococci*, *pneumococci*, *Listeria*, *Neisseria meningitides*, dan *Haemophilus influenzae*. Penambahan darah pada agar brucella dapat digunakan untuk menentukan reaksi hemolitik bakteri (Ridhwan, 2023).

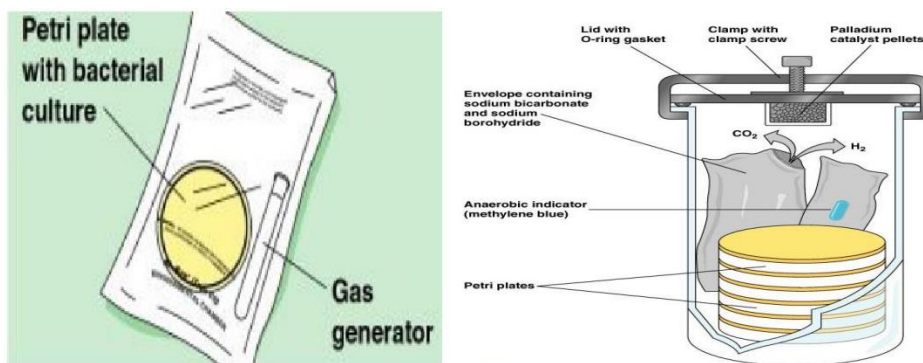
Media selektif dan diferensial yang digunakan dalam bakteriologi anaerob contohnya adalah *Bacterioides bile esculin agar* (BBE), yaitu media selektif dan diferensial untuk kelompok *Bacterioides fragilis* dan baik untuk identifikasi dugaan. Media lainnya adalah *Laked Kanamycin-vancomycin blood agar* (LKV) yang merupakan media selektif untuk isolasi *Prevotella* dan *Bacterioides* spp. *Anaerobic phenylethyl alcohol agar* (PEA), merupakan media selektif untuk penghambatan batang gram negatif dan dipenuhi oleh beberapa *Clostridia*. *Cycloserine cefoxitin fructose agar* (CCFA) merupakan media selektif untuk *Clostridium difficile*.



Gambar 5. Toples lilin

Mikroaerofil adalah mikroorganisme yang membutuhkan oksigen untuk bertahan hidup, tetapi membutuhkan lingkungan yang mengandung kadar oksigen lebih rendah daripada yang ada di atmosfer (konsentrasi 20%) (Sari, 2017); (Sirait, 2017); (Syauqi, 2017). Banyak mikrofil juga kapnofil, karena mereka membutuhkan konsentrasi karbon dioksida yang tinggi. Di laboratorium bakteri ini dapat dengan mudah dikultur dalam toples lilin (Gambar 5). Wadah lilin adalah wadah tempat lilin yang menyala dimasukkan sebelum menyegel tutup wadah yang kedap

udara. Nyala lilin menyala sampai padam karena kekurangan oksigen, yang menciptakan suasana kaya karbon dioksida dan miskin oksigen di dalam toples. Laboratorium yang memiliki akses langsung ke karbon dioksida, dapat menambahkan tingkat karbon dioksida yang diinginkan langsung ke inkubator tempat mereka ingin menumbuhkan mikroaerofil. Toples lilin digunakan untuk menumbuhkan bakteri yang membutuhkan peningkatan konsentrasi CO₂ (kapnofil). Toples lilin meningkatkan konsentrasi CO₂ dan masih menyisakan sedikit O₂



Gambar 6. Lingkungan pertumbuhan anaerob, kiri: paket gas pack anaerob ; kanan: jar anaerobik

Paket gas (Gambar 6 kiri) juga dapat menghasilkan CO₂ dan umumnya digunakan sebagai pengganti toples lilin. Paket tersebut terdiri dari kantong berisi cawan petri dan generator gas CO₂. Generator gas dihancurkan untuk mencampur bahan kimia yang dikandungnya dan memulai reaksi yang menghasilkan CO₂. Gas ini mengurangi konsentrasi oksigen dalam kantong menjadi sekitar 5% dan memberikan konsentrasi CO₂ sekitar 10%. Cawan petri dapat diinkubasi dalam tabung anaerobik atau ruang anaerobik (Gambar 6 kanan). Natrium bikarbonat dan natrium borohidrida dicampur dengan sedikit air untuk menghasilkan CO₂ dan H⁺. Katalis paladium dalam tabung bergabung dengan O₂ dalam tabung dan H⁺ untuk menghilangkan O₂.

METODOLOGI PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang diperlukan dalam pemeriksaan bakteri anaerob adalah :

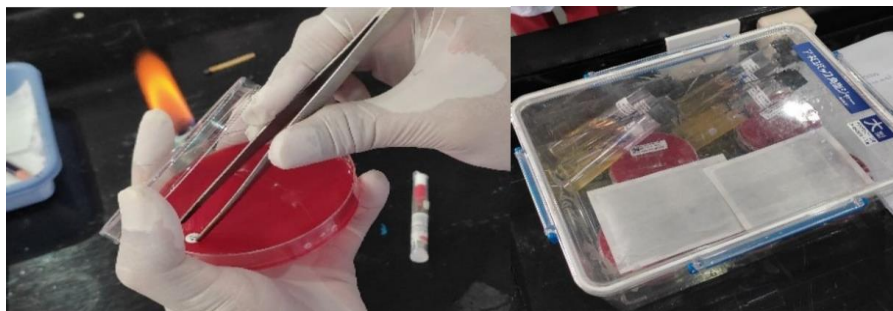
1. Pinset kecil dan ose
2. Kaca objek
3. Nacl fisiologis
4. Bunsen
5. Spesimen klinik
6. Tioglikolat

7. Agar brucella dan Agar brucella + kanamisin
8. Jar anarerob
9. Gas generation sachet Anaerogen 2,5 L
10. Cakram antibiotik Metronidazole
11. Reagen pewarnaan gram (*Crystal Violet*, Lugol, Alkohol, dan Safranin)
12. *Nephelometer Mc-Farland* 0,5
13. Mikroskop
14. Inkubator 37oC
15. *DensiCheck*
16. *Vitek-2 dan Anaerobic Cassete*
17. Komputer

Cara Kerja

Isolasi bakteri *Bacteroides fragilis* (Gambar 7)

1. Satu ose sampel klinik ditanam pada Agar brucella dan Agar brucella + kanamisin serta pada media kaldu tioglikolat, menggunakan metode Penipisan *Koch*.
2. Pada goresan kuadran 1 dan 2 ditambah antibiotik metronidazole.
3. Diinkubasi pada jar anaerob, dengan menggunakan *gas generation sachet anaerogen chemical* 2,5 L yang dapat membuat kondisi jar kurang oksigen, selama 2X24 jam;



Gambar 7. Isolasi Dan Proses Inkubasi *B. Fragilis*

Pewarnaan Gram

1. Disiapkan reagen untuk pewarnaan gram (Gambar 8)
2. Spesimen klinik diambil 1 ose dan di ratakan pada objek glass dengan ditambahkan satu tetes NaCl fisiologis (jika diperlukan)
3. Preparat dibiarkan kering diudara beberapa saat kemudian di fiksasi diatas api 3 kali
4. *Crystal violet* diteteskan pada object glass dan biarkan selama 1 menit
5. Pewarna di cuci dengan air mengalir
6. *Cairan Grams' iodine* (lugol) di teteskan dan diabiarkan selama 1 menit
7. Pewarna di cuci dengan air mengalir
8. Kaca objek dicelupkan ke dalam etil alkohol beberapa detik hingga warna ungu pudar
9. Kaca objek kemudian dicuci dengan air mengalir
10. Pewarna safranin diteteskan dan dibiarkan selama 45 detik
11. Pewarna di cuci dengan air mengalir dan keringkan di udara
12. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali dengan bantuan minyak imersi.



Gambar 8. Reagen pewarnaan Gram

Identifikasi menggunakan Vitek-2 (Gambar 9)

1. Mempersiapkan Vitek-2 dan komputer
 - a. Mesin Vitek-2 dihidupkan: Tekan tombol ON pada conditioner, UPS,
 - b. Pada komputer masukkan username dan password
 - c. Selama beberapa menit awal instrumen dinyalakan akan berada pada status Warming.
 - d. Tunggu instrumen hingga menunjukkan status OK
2. Persiapan koloni :
 - a. Koloni yang tumbuh pada cawan diobservasi, jika terlihat zona hambat di sekitar metronidazol, sebelum uji identifikasi dengan Vitek, pewarnaan Gram perlu dilakukan. Hasil Gram di cocokkan dengan hasil pewarnaan Gram sampel langsung.
 - b. Siapkan tabung berisi 3 ml larutan NaCl 0,45 % pH 5,0
 - c. Koloni tersangka bakteri anaerob tersebut diambil dan dibuat suspensinya pada larutan NaCl
 - d. Dikocok hingga homogen, target kekeruhan suspensi dicocokkan dengan standart Vitek-2 , tingkat kekeruhan dilihat dengan *DensiCheck* .
 - e. Jika kekeruhan kurang maka tambahkan koloni bakteri

- f. Meletakkan kartu ID dan AST serta tabung ke dalam cassette VITEK.
 - g. *Cassette* kemudian dimasukkan ke dalam alat Vitek-2 dan dilakukan analisis secara otomatis.
 - h. Pada kolom pertama, cairan dalam tabung akan dialirkan ke dalam dalam kartu ID & AST, apabila telah berhasil, pipa
 - 2) Setelah data ter-input, kemudian klik RUN
 - 3) Alat akan bekerja selama semalaman, dan pada keesokan harinya hasil sudah dapat terbaca.
- biru dari tabung akan terpotong
- i. Proses selanjutnya, mesin akan melakukan inkubasi untuk kemudian diidentifikasi otomatis.
 - 1) Pada Komputer, dilengkapi tabel/kolom identitas dari bakteri, termasuk jenis gramnya.



Gambar 9. Peralatan yang digunakan dalam tes identifikasi dengan Vitek-2

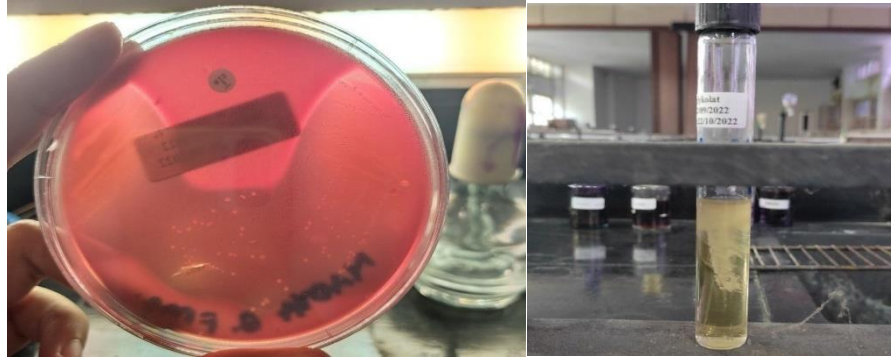
HASIL PENELITIAN

Spesimen di kultur pada media yang sesuai dan diinkubasi dalam lingkungan tidak ada oksigen/suasana anaerob menggunakan jar anaerob yang dilengkapi *gas generation sachet anaerogen chemical*. Setelah diinkubasi selama 2x24 jam atau lebih, pada medium Agar brucella dan Agar brucella + kanamisin serta Tioglikolat ternyata bakteri tersebut tumbuh dengan subur (**Gambar 10**).

Hal yang menunjukkan bahwa bakteri ini adalah tersangka anaerob dengan terbentuknya zona di sekitar antibiotik *metronidazole* (**Gambar 10**). Antibiotik ini digunakan sebagai indikator yang menunjukkan adanya bakteri anaerob, karena 90% lebih bakteri anaerob sensitif terhadap antibiotik ini.¹⁵ Apabila zona hambat tidak terbentuk, inkubasi

dilanjutkan hingga 2x24 jam berikutnya. Hal lain yang dapat dilakukan adalah mengulang kultivasi dari tioglikolat, Agar brucella dan Agar brucella + kanamisin, menginkubasinya kembali dan melakukan langkah sesuai prosedur. Apabila koloni tersangka bakteri anaerob tidak tumbuh atau tidak terbentuk zona maka langkah tersebut diulangi hingga hasil dinyatakan negatif pada hari ke-14. Hal ini dilakukan untuk memastikan tumbuh/tidaknya bakteri anaerob tersebut.

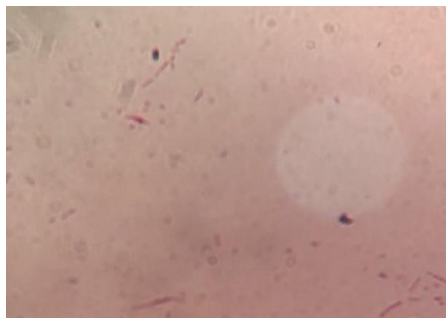
Berdasarkan hasil pewarnaan Gram dari hasil kultivasi tersebut diperoleh hasil morfologi berbentuk batang, berwarna merah, bersifat Gram negatif (**Gambar 11**). Hasil ini sesuai dengan hasil pewarnaan Gram langsung dari spesimen.



Gambar 10. Hasil Kultur *B. Fragilis* Pada Media Agar Brucella Dan Tioglikolat

Identifikasi dilanjutkan menggunakan Vitek-2 yang menunjukkan ditemukannya *B. fragilis* dengan probabilitas >90%. Hal ini sesuai dengan referensi bahwa *B. fragilis* merupakan bakteri yang tumbuh cepat dalam suasana anaerob dan dirangsang pertumbuhannya oleh adanya

empedu dan tergolong dalam bakteri anaerob obligat. Bakteri ini tumbuh dengan baik dalam Agar brucella yang telah ditambahkan darah. Koloni berwarna putih sampai abu-abu semi-buram, halus. Ukuran diameter pada cawan 1-3 mm.



Gambar 11. Hasil Pewarnaan Gram *B. Fragilis*, Menunjukkan Hasil Gram Negative Hasil Dari Spesimen Langsung. B. Hasil Dari Kultivasi

Bakteri ini tergolong dalam Phylum: *Bacteroidetes*, Class: *Bacteroidetes*, Order: *Bacteroidales*, Family: *Bacteroidaceae* dan Genus: *Bacteroides*. Hal ini sesuai dengan referensi bahwa morfologi *B. fragilis* merupakan bakteri batang Gram negatif yang biasanya berbentuk pleomorfik dengan vakuola dan pembengkakan, dengan ukuran lebih kecil dibandingkan dengan *E. coli* (berkisar 0,6 μm , sedangkan *B.*

fragilis 1,5- 4,5 μm), ujung dari bentuk basil membulat, tidak membentuk spora dan tidak memiliki flagela.

KESIMPULAN

Keberhasilan dalam melakukan kultivasi dan identifikasi bakteri anaerob ditentukan oleh pemilihan media dan isolasi dan penentuan metode kultivasi yang tepat, yaitu dengan menciptakan lingkungan pertumbuhan tanpa

oksigen. Hal ini dapat dicapai dengan menggunakan metode jar anaerob yang dilengkapi dengan gas generation sachet anaerogen chemical. Identifikasi bakteri menggunakan alat otomatis Vitek-2 menjadi salah satu metode yang banyak dipakai dan dikembangkan karena kecepatan dan efisiensinya dalam mengidentifikasi bakteri. *Bacteroides fragilis* merupakan bakteri anaerob yang berhasil diidentifikasi dengan karakteristik berbentuk batang bersifat Gram negatif.

DAFTAR PUSTAKA

- Dunders, G., Morein, N., & Kumars, M. (2020). *Mikrobiologi Medis li: Sterilisasi, Diagnosis Laboratorium, Dan Respon Imun*. Cambridge Stanford Books.
- Fifendy, M. (2017). *Mikrobiologi*. Kencana.
- Kadir, I. R. (2016). Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat (Bal) Kandidat Probiotik Asal Saluran Pencernaan Doc Broiler Terhadap Berbagai Kondisi Asam Lambung. *Universitas Islam Negri Aulauddin. Makasar*.
- Kusumaningrum, S. B. C., Widyaswara, G., Rahman, A., & Zain, K. R. (2023). *Mikrobiologi Dasar Untuk Bidang Kesehatan*. Penerbit Nem.
- Lestari, P. B., & Hartati, T. W. (2017). *Mikrobiologi Berbasis Inquiry*. Penerbit Gunung Samudera [Grup Penerbit Pt Book Mart Indonesia].
- Murwani, S. (2015). *Dasar-Dasar Mikrobiologi Veteriner*. Universitas Brawijaya Press.
- Nasution, L., & Si, S. M. (2022). *Monograf: Pemanfaatan Bakteri Indigen Secara Invitro Dalam Memperoleh Model Remediasi Lahan Pertanian Yang Terpapar Dichloro Diphenyl Trichloroethane (Ddt)*. Umsu Press.
- Noor Madani, F. (2021). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kumis Kucing (*Orthosiphon Stamineus*) Terhadap Bakteri *Propionibacterium Acnes*.
- Nurika, I., Hidayat, N., Anggarini, S., & Azizah, N. (2022). *Rekayasa Bioproses*. Universitas Brawijaya Press.
- Rahayu, I. E. S., & Utami, I. T. (2019). *Probiotik Dan Gut Microbiota: Serta Manfaatnya Pada Kesehatan*. Pt Kanisius.
- Ratnasari, E. (2018). *Bakteriologi:: Mikroorganisme Penyebab Infeksi*. Deepublish.
- Ridhwan, M., Kurniawan, F. B., Ak, M. D., Hansur, L., Asrinawaty, A. N., Nikmatullah, N. A., ... & Hartati, R. (2023). *Mikrobiologi Dan Parasitologi*. Global Eksekutif Teknologi.
- Ridwan, D. F. (2018). Sintesis Dan Karakterisasi Serta Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Organotimah (Iv) 4-Hidroksi Benzoat Terhadap Bakteri Gram Positif *Bacillus Subtilis* Dan Gram Negatif *Pseudomonas Aeruginosa*.
- Rini, C. S., & Rohmah, J. (2020). *Buku Ajar Mata Kuliah Bakteriologi Dasar*. Umsida Press, 1-108.
- Rini, C. S., & Rohmah, J. (2020). *Buku Ajar Mata Kuliah Bakteriologi Dasar*. Umsida Press, 1-108.
- Sari, R., & Prayudyaningsih, R. (2017). Karakter Isolat *Rhizobia* Dari Tanah Bekas Tambang Nikel Dalam Memanfaatkan Oksigen Untuk Proses

- Metabolismenya. *Buletin Eboni*, 14(2), 123-136.
- Sirait, R. (2017). *Penundaan Pemeriksaan Kultur Urin Pasien Dengan Penyimpanan Menggunakan Coolbox Pada Pertumbuhan Bakteri Di Rsup Dr. Kariadi Semarang* (Doctoral Dissertation, Muhammadiyah University Of Semarang).
- Syauqi, A. (2017). *Mikrobiologi Lingkungan Peranan Mikroorganisme Dan Kehidupan*. Penerbit Andi.
- Syauqi, A. (2017). *Mikrobiologi Lingkungan Peranan Mikroorganisme Dan Kehidupan*. Penerbit Andi.
- Usman, N. (2022). *Formulasi Dan Uji Aktivitas Masker Gel Peel-Off Minyak Atsiri Daun Kemangi (Ocimum Basilicum.) Berbasis Karbopol 940 Terhadap Bakteri Propionibacterium Acnes* (Doctoral Dissertation, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim).