

PEMBUATAN MEDIA DAN PEREAKSI UNTUK ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI, *Vibrio* sp.

Nurjanna

Teknisi Litkayasa pada Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau, Maros

PENDAHULUAN

Media tumbuh merupakan faktor utama kegiatan mengisolasi bakteri, hal ini disebabkan karena media tumbuh yang digunakan sangat menentukan jenis bakteri yang akan terisolasi. Beberapa media tumbuh dapat digunakan untuk mengisolasi bakteri secara umum tetapi ada juga yang telah diramu khusus untuk mengisolasi bakteri tertentu saja. Jadi keberhasilan dalam mengisolasi suatu jenis bakteri sangat tergantung pada media tumbuh yang digunakan. Ketepatan dalam penimbangan setiap komponen media tumbuh juga memegang peranan penting selain sterilisasi alat-alat yang digunakan, baik dalam pembuatan media tumbuh maupun pada saat mengisolasi bakteri.

Langkah selanjutnya yang harus diperhatikan adalah pembuatan media dan pereaksi untuk identifikasi bakteri. Seperti halnya media tumbuh, media dan pereaksi yang akan digunakan untuk identifikasi sangat erat kaitannya dengan bakteri yang akan diidentifikasi, misalnya untuk mengidentifikasi bakteri *Vibrio* sp., kita harus mempersiapkan media dan pereaksi sesuai kebutuhan untuk uji fisik dan biokimia bakteri tersebut. Adapun dalam pembuatan media dan pereaksi yang dipaparkan dalam tulisan ini diambil dari beberapa pustaka yang berkaitan dengan identifikasi bakteri. Media ini merupakan media standar atau khusus untuk isolasi bakteri *Vibrio* sp.

POKOK BAHASAN

Media yang Digunakan untuk Menumbuhkan (media tumbuh) Bakteri *Vibrio* sp.

Media TCBSA (*Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar*) (Muir, 1996)

Timbang media agar TCBSA sebanyak 8,9 g masukkan ke dalam Erlenmeyer volume 250 dan larutkan dengan akuades steril sebanyak 100 mL, atur

pH sampai 8,6 panaskan di atas pemanas sambil diaduk dengan stirer magnet sampai larut dan mendidih. Angkat lalu diamkan sampai suhunya turun $\pm 50^{\circ}\text{C}$ tuang ke cawan petri ± 15 mL per cawan masukkan ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 12—24 jam dengan posisi cawan petri terbalik. Hal ini dilakukan untuk menguapkan kadar air yang terkandung dalam media tumbuh. Media ini mudah didapatkan di pasaran dan harganya mengikuti kurs rupiah. Harga media TCBSA Rp 1.054.000,- / botol (500 g) dan dapat dibuat media agar sebanyak 250 cawan petri, dan media ini yang paling banyak digunakan.

Media Tryptic Soy Agar Miring (TSA) (Muir, 1996)

Timbang media agar 4 g dalam 100 mL tambahkan dengan NaCl 1,5 g masukkan ke dalam erlenmeyer yang berkapasitas 250 mL, panaskan sambil diaduk dengan stirer magnet setelah larut dan berubah warna angkat dan dipipet ke dalam tabung berkapasitas 8 mL sebanyak 1,5 mL tutup dengan kapas steril kemudian sterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C tekanan 1 atmosfer selama 15 menit. Setelah steril keluarkan dan miringkan sampai mengeras, lalu masukkan ke dalam kulkas suhu 4°C siap digunakan. Media ini mudah didapatkan di pasaran dan harganya mengikuti harga kurs. Harga media TSA Rp 570.000,- / botol (500 g) dan dapat dibuat media agar sebanyak 600 cawan petri.

Media Marine Agar (MA) (Muir, 1996)

Timbang media agar 5,51 g dalam 100 mL dan dilarutkan dalam larutan basal media (BM) yang terdiri atas beberapa campuran yaitu: Aquades steril 66,0 mL, ASW 3x 30,0 mL, Tris 1M 2 mL, NH_4Fe citrate 1 mL NH_4Cl 1 mL, dan 1 mL K_2HPO_4 ke dalam erlenmeyer. Larutkan dan atur pH menjadi 7,5. Panaskan dan sterilisasikan dengan *autoclave* suhu 121°C dengan tekanan 1 Atm selama 15 menit dan biarkan suhunya mencapai 60°C — 70°C lalu tuangkan ke cawan petri ± 20 mL / cawan. Media ini mudah

didapatkan dipasaran dan harganya mengikuti harga kurs. Harga media TSA Rp 1.461.000,- / botol (500 g) dan dapat dibuat media agar sebanyak 400 cawan petri.

Media Agar Amylase Plate (Muir, 1996)

Timbang *yeast extract* 1 g; *soluble starch* 0,1 g; bacto agar 2 g larutkan dengan basal medium 100 mL pH 7,5 panaskan dan sterilkan pada *outoclove* suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah suhu agak dingin tuang ke dalam cawan petri ± 20 mL / cawan diinginkan dan simpan pada posisi terbalik.

Media Oksidatif dan Fermentatif (Muir, 1996)

Timbang D-glukosa 1 g; yeast ekstrak 0,005 g; bacto agar 0,3 g; bromocresol purpel (2%) 0,1 mL larutkan dengan larutan basal medium sebanyak 100 mL pH 7,0 larutkan dan panaskan sambil diaduk dengan stirer magnit setelah mendidih angkat dan dipipet ke tiap-tiap tabung sebanyak 5 mL pertabung dan sterilkan dengan *outoclove*, dinginkan dengan posisi tegak.

Media VP Test (Voges pocker) (Muir, 1996)

Timbang D-glukosa 1,0 g; yeast ekstrak 1 g; bacto agar 0,3 g; pH 7,0 larutkan dengan larutan basal medium sebanyak 100 mL panaskan dan larut. Diamkan sampai dingin setelah dingin pipet ke dalam tabung reaksi masing-masing 5 mL per tabung kemudian sterilkan dengan *outoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan 1 atm. Setelah itu angkat dan dinginkan pada posisi tegak

Media Arginin Dihydrolase Test (Muir, 1996)

Timbang bacto pepton 0,1 g; L-arginin 1,0 g; phenol red 0,001 g; bacto agar 0,3 g pH 7,0 larutkan dengan larutan basal medium sebanyak 100 mL panaskan sampai betul-betul larut. Angkat dan dinginkan selanjutnya dipipet ke dalam tabung reaksi masing-masing 5 mL pertabung sterilkan dengan *outoclove* selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan 1 atm. Setelah itu angkat dan dinginkan pada posisi tegak.

Stok Agar BM (Basal Media) (Muir, 1996)

Timbang bacto agar sebanyak 8 g dan larutkan dengan basal medium sebanyak 800 mL panaskan sampai betul-betul larut dan seterilisasi dengan

outoclove selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan 1 atm.

Media Putricine (Muir, 1996)

20 mL stok agar BM tambahkan dengan stok larutan putricine sebanyak 1 mL homogenkan dan tuang ke petridish untuk 1 plate.

Media Sucrose (Muir, 1996)

20 mL stok agar BM tambahkan dengan stok larutan sukrosa sebanyak 1 mL homogenkan dan tuang ke petridish untuk 1 plate.

Media Xantine (Muir, 1996)

20 mL stok agar BM tambahkan dengan stok larutan sukrose sebanyak 1 mL homogenkan dan tuang ke petridish untuk 1 plate.

Media L-serine (Muir, 1996)

20 mL stok agar BM tambahkan dengan stok larutan L-serine sebanyak 1 mL homogenkan dan tuang ke petridish untuk 1 plate.

Media Heptanoic Acid (Muir, 1996)

20 mL stok agar BM tambahkan dengan stok heptanoic acid sebanyak 1 mL homogenkan dan tuang ke petridish untuk 1 plate.

Media Etanol (Muir, 1996)

20 mL stok agar BM tambahkan dengan stok ethanol sebanyak 0,02 mL homogenkan dan tuang ke petridish untuk 1 plate.

Media Aminobutirat (Muir, 1996)

20 mL stok agar BM tambahkan dengan stok aminobutirat sebanyak 1 mL homogenkan dan tuang ke petridish untuk 1 plate.

Media L-arabinose (Muir, 1996)

20 mL stok agar BM tambahkan dengan stok L-arabinose sebanyak 1 mL homogenkan dan tuang ke petridish untuk 1 plate.

Media Cellubiose (Muir, 1996)

20 mL stok agar BM tambahkan dengan stok larutan selubiosa sebanyak 1 mL homogenkan dan tuang ke petrididsh untuk 1 plate.

Media Glucuronate (Muir, 1996)

20 mL stok agar BM tambahkan dengan stok larutan glucuronate sebanyak 1 mL homogenkan dan tuang ke petridish untuk 1 plate.

Media Alfa Ketogluronate (Muir, 1996)

20 mL stok agar BM tambahkan dengan stok larutan alfa ketogluronate sebanyak 1 mL homogenkan dan tuang ke petridish untuk 1 plate.

Media L-alanin (Muir, 1996)

20 mL stok agar BM tambahkan dengan stok larutan L-alanin sebanyak 1 mL homogenkan dan tuang ke petridish untuk 1 plate.

Media L-leucin (Muir, 1996)

20 mL stok agar BM tambahkan dengan stok larutan L-leucin sebanyak 1 mL homogenkan dan tuang ke petridish untuk 1 plate.

Media Propionate (Muir, 1996)

20 mL stok agar BM tambahkan dengan stok larutan propionate sebanyak 1 mL homogenkan dan tuang ke petridish untuk 1 plate.

Media Kontrol (Muir, 1996)

20 mL stok agar BM tuang ke petridish sebagai kontrol dari media identifikasi.

Media Na+

Timbang gliserol 0,2 g; asetat succinic acid 0,1 g; larutkan dengan basal medium 100 mL pH 7,5 panaskan sampai larut dan sterilkan dengan *outoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan 1 atm.

Media Na-

Timbang KCl 2,98 g; MgSO₄·7H₂O 0,29; Glyc-erol 0,2 mL; asetat succinic acid 0,1 g larutkan dengan basal medium 100 mL pH 7,5 panaskan sampai larut dan sterilkan dengan *outoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan 1 atm.

Media Lysin

Timbang bacto pepton 0,5 g; yeast ekstrak 0,5 g; pyridoxal 0,5 mg; glukosa 0,05 g; bromocresol purpel 0,75 mL larutkan dengan akuades steril 66,0 mL; dan

asw 3 x 33,0 mL pH 6,0 larutkan dan sterilkan pada *outoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan 1 atm.

Catatan: untuk pembuatan lysin, ornithine, dan kontrol media dasar sama setelah steril lalu ditambahkan dengan bahan lysin yang difiltrat dengan filter ukuran 0,45 micron ke dalam larutan dasar tadi.

Media Ornithine

Timbang bacto pepton 0,5 g; yeast ekstrak 0,5 g; pyridoxal 0,5 mg; glukosa 0,05 g; bromocresol purpel 0,75 mL larutkan dengan akuades steril 66,0 mL; dan asw 3x 33,0 mL pH 6,0 larutkan dan sterilkan pada *outoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan 1 atm.

Catatan: untuk pembuatan ornithine ditambahkan dengan bahan media ornithine yang difiltrat dengan filter ukuran 0,45 micron ke dalam larutan dasar tadi.

Media Kontrol

Timbang bacto pepton 0,5 g; yeast ekstrak 0,5 g; pyridoxal 0,5 mg; glukosa 0,05 g; bromocresol purpel 0,75 mL larutkan dengan aquades steril 66,0 mL; dan asw 3x 33,0 mL pH 6,0 larutkan dan sterilkan pada *outoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan 1 atm.

Untuk ketiga media lysin, ornithine, dan kontrol masing-masing dipipet ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 mL tiap tabung.

Pereaksi yang Digunakan untuk Identifikasi Bakteri *Vibrio Harveyi*

Larutan Artificial Seawater 3 x (3 x ASW) untuk 1.000 mL (Muir, 1996)

- Aquades steril 1.000 mL
- NaCl 52,7 g
- KCL 2,25 g
- Na₂SO₄ 0,856 g
- MgCl₂·6H₂O 15,24 g
- CaCl₂·2H₂O 0,436 g

Larutan BM (Basal Media) untuk 1.000 mL (Muir, 1996)

- Aquades steril 660 mL
- Asw 3x 330 mL 330 mL
- Tris 1M 20 mL (stok 121 g / 1.000 mL, pH 7,5)
- NH₄ Fe Citrate 5 mL stok 0,5 g / 100 mL

- NH₄ Cl 5 mL stok 20 g / 100 mL
- K₂HPO₄ 5 mL stok 1,4 g / 100 mL

Pereaksi Oksidase Test (Lewis, 1973)

Timbang tetramethyl-p-phenylenediamine sebanyak 0,2 g dan ascorbic acid 0,02 g larutan dengan aquades sebanyak 20 mL simpan dalam botol gelap sebab mudah teroksidasi.

Larutan NaOH 40% (Lovell, 1981)

Timbang NaOH 40 g dan larutkan dengan aquades 100 mL

Pereaksi VP Test (Lewis, 1973)

Larutan A: Timbang 6 g naptol larutkan dengan Ethanol 100 mL

Larutan B: Timbang 0,3 g creatine dan 40 g KOH dilarutkan dengan 100 mL aquades

Larutan HCl 10 N (Direktorat Jenderal Perikanan, Departemen Pertanian, 1981)

Larutan HCl pekat 37% BM 36,46 g/mol, 1 L setara 1,19 kg

Cara menghitung:

$$\begin{aligned} \text{HCL } 37\% &= 37/100 \times 1.000 \text{ mL} = 370 \text{ mL} \\ &= 0,37 \text{ L} \\ &= 370 \text{ mL} \times 1,19 \text{ kg} = 440,3 \text{ kg} \\ &= 440,3 \text{ kg HCl} = 440,3/\text{BM} \\ &= 440,3/36,46 = 12,07 \text{ mol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Grek} &= \text{mol} \times (\text{H}^+) \\ &= 12,07 \times 1 \\ &= 15,12 \end{aligned}$$

$$\text{Normalitet} = \text{g grek/L} = 12,07 \text{ N}$$

Untuk membuat larutan HCl 1 N sebanyak 100 mL dari HCl di atas:

$$\begin{aligned} V_1 \cdot N_1 &= V_2 \cdot N_2 \\ V_1 \cdot 12,07 &= 100 \cdot 1 \\ V_1 &= 100/12,07 \\ &= 8,28 \text{ mL} \end{aligned}$$

maka diambil larutan HCL 37% sebanyak 8,28 mL dilarutkan ke dalam 100 mL aquades.

Larutan NaOH 10 N (Lovell, 1981)

BM NaOH = 40 g / mol, Berat ekivalen NaOH = 1

$$\begin{aligned} \text{Jadi Gram} &= \text{BM} \times \text{mol} = 40 \times 10 \text{ mol} \\ &= 400 \text{ g/L} \\ &= 40,0 \text{ g/100 mL} \end{aligned}$$

Jadi untuk membuat larutan NaOH 10 N ditimbang 40,0 g dan dilarutkan ke dalam 100 mL akuades.

Pewarnaan Gram (Lewis, 1973)

Stok Kristal Violet:

Larutan A: Crystal violet 2 g, ethyl alkohol 20 mL tambahkan dengan aquades 18 mL

Larutan B: Amonium oxalate 0,8 g larutkan dengan aquades 80 mL

Untuk membuat larutan kristal violet larutan A dipipet 1 mL dan larutan B dipipet 40 mL

Larutan Iodine:

Timbang J2 0,3 g; KI 0,6 g larutkan dengan 100 mL akuades

Stok Safranin:

Timbang safranin 0,75 g; larutkan dengan 10 mL etil alkohol. Jadi untuk membuat larutan safranin larutan stok dipipet 1 mL dan ditambahkan dengan aquades sebanyak 9 mL.

PENUTUP

- ❖ Dalam pembuatan media dan perekasi diperlukan ketepatan dan ketelitian pengukuran dalam penimbangan pada setiap komponen media dan bahan kimia
- ❖ Alat-alat yang digunakan harus disterilisasi dengan cara memanaskan dalam *autoclave* dengan suhu 180°C selama 2 jam sebelum digunakan di laboratorium untuk menghindari kontaminasi

DAFTAR PUSTAKA

Anonim. 1993. *Praktikum Penuntun Kimia Industri*. Departemen Perindustrian Sekolah Menengah Analis Kimia Bogor, 4 pp.
Direktorat Jenderal Perikanan, Deptan. 1981. *Kumpulan Petunjuk Praktis Pengujian Kimia Hasil Perikanan*. Jakarta, p. 51—61.
Lovell, R.T. 1981. *Laboratory Manual for Fish Feed Analysis and Fish Nutrition Studies*. Departemen of Fisheris and Allied Aquaculture

- International Center for Aqua Culture, Auburn University. U.S.A., p. 6, 21, 26, 35, 38.
- Lewis, D.H. 1973. *Predominat Aerobic Bacteria of Fish and Shelfish*, texas A & M University, Sea Grant College, Texas, 1 pp.
- Muir, P. 1996. *Identification of Vibrio and Pseudomonas Bacteria*. Departement of Microbiology. Biomedical and Tropical Veterinary Science. James Cook University of North Queensland. Australia, 6 pp.

Lampiran 1. Media untuk Bakteri Biokontrol

Bahan: Media SWC 100% dan 10%

- Bacto pepton
- Bacto agar
- Glycerol
- Akuades
- Air laut
- Antibiotik: eritromysin

Alat:

- labu ukur 50 mL
- Stirer magnit
- Petridish
- Gelas piala
- Gelas ukur
- Pemanas
- Autoclave
- Timbangan elektrik

Cara kerja:

Stok antibiotik 10.000 mg/L

Antibiotik Rifanfisin ditimbang dengan menggunakan timbangan elektrik sebanyak 0,5 g dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan dilarutkan dengan etahnol 100% sebanyak 50 mL, sambil dibolak-balik secara pelan-pelan sampai tidak ada lagi endapan simpan pada suhu 4°C dalam botol gelap karena mudah teroksidasi.

Media SWC (*Sea Water Artificial*) 100% sebanyak 1.000 mL dan penambahan antibiotik 50 mg/L

Penambahan antibiotik ke dalam media sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan cukup dengan menggunakan rumus: $V1 \cdot N1 = V2 \cdot N2$

Cara pengenceran

$$\begin{aligned} V1 \cdot N1 &= V2 \cdot N2 \\ V1 \cdot 10.000 &= 400 \cdot 50 \text{ mg/L} \\ V1 &= \frac{10.000}{10.000} \\ &= 1 \text{ mL antibiotik ke dalam} \\ &\quad 400 \text{ mL media agar} \end{aligned}$$

Ditimbang media bacto pepton 5 g, yest ekstrak 1 g, bacto agar 15 g gliserol 3 mL dilarutkan dalam akuades steril 250 mL dan air laut steril sebanyak 750

mL dengan salinitas 28 ppt, sambil diaduk dengan stirer magnit di atas pemanas sampai larut dan pelan-pelan dinaikkan suhunya sampai media berubah warna menjadi jernih angkat lalu masukkan ke dalam *autoclave* sterilkan pada suhu 121°C dengan tekanan 1 Atm selama 15 menit. Media yang telah steril keluarkan lalu dinginkan sampai suhu 60°C atau hangat kuku lalu ditambahkan dengan antibiotik sesuai dengan dosis (mg/L) yang diinginkan lalu dituang ke tiap-tiap plate kurang lebih 20 mL setiap plet. Setelah agar di dalam plet dingin plet tersebut dibalik simpan pada suhu ruang dalam kantong hitam agar tidak kena cahaya atau sinar langsung karena media ada yang mudah teroksidasi. Sehingga warna bisa berubah.

Media SWC 10% 1.000 mL

Timbang bakto pepton 0,5 g; yest ekstrak 0,1 g; bacto agar 15 g gliserol 3 mL akuades 250 mL dan air laut steril 750 mL masing-masing bahan tersebut dimasukkan ke dalam erlemeyer 250 mL sebanyak 5 buah. Larutkan dan panaskan di atas pemanas sambil stirer dengan stirer maganit setelah larut naikkan suhu secara pelan-pelan sampai terjadi perubahan warna menjadi jernih angkat dan masukkan ke *autoclave* dan sterilisasi basah. Setelah steril angkat dan dinginkan sampai suhu 60°C atau hangat kuku tambahkan antibiotik sesuai dosis yang diinginkan tuang ke tiap-tiap plet sebanyak kurang lebih 20 mL setiap plet. Setelah agar dalam plet dingin balik dan simpan dalam kantong hitam pada suhu ruang untuk menghindari cahaya atau sinar karena media tersebut mudah teroksidasi.

Media untuk Identifikasi Bakteri Umum

Media Tryptic Soy Agar (TSA)

Timbang media agar TSA sebanyak 40 g tambahkan dengan NaCl 15 g masukkan ke dalam erlemeyer dan larutkan dengan aquades steril sebanyak 1.000 mL, panaskan di atas pemanas sambil aduk dengan stirer magnit setelah larut dan berubah warna, angkat dan masukkan ke dalam *autoclave* sterilisasi basah. Setelah steril dinginkan sampai suhu 60°C—70°C tuang ± 20 mL ke tiap plet. Setelah kering masukkan ke dalam inkubator suhu 37°C selama 6—12 jam dengan posisi petridish terbalik.

Media Tryptic Soy Agar Miring (TSA)

Timbang media agar 8 g tambahkan dengan NaCl 3 g masukkan ke dalam erlemeyer larutkan dengan

akuades steril sebanyak 200 mL panaskan sambil diaduk dengan stirer magnet setelah larut dan berubah warna angkat dan dipipet ke dalam tabung kecil sebanyak 1,5 mL tutup dengan kapas sterilkan pada *autoclave* setelah steril keluarkan dan miringkan.