

IDENTIFIKASI BAKTERI MELALUI PENGGUNAAN KIT *ANALYTICAL PROFILE INDEX* (API) 20E

Diah Artati dan Moh. Oman

Balai Riset Pemuliaan Ikan
Jl. Raya 2 Sukamandi, Patokbeusi, Subang, Jawa Barat 41263
E-mail: siepelayananteknis.brpl@gmail.com

ABSTRAK

Bakteri merupakan mikroorganisme yang memiliki struktur sederhana yaitu bersel tunggal, tidak memiliki membran inti sel dan memiliki ukuran yang mikroskopis. Metode identifikasi bakteri dapat dilakukan berdasarkan morfologi sel, uji aktivitas biokimia, analisis DNA, dan uji serologis. Identifikasi bakteri melalui pengamatan aktivitas biokimia saat ini bisa lebih mudah dengan menggunakan kit *analytical profile index* (API). API 20E berguna untuk mengidentifikasi spesies dan subspecies *Enterobacteriaceae* dan identifikasi kelompok, serta spesies mikroorganisme non-fermentatif. Kegiatan pengujian evaluasi penggunaan kit API 20E dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Balai Riset Pemuliaan Ikan, Sukamandi dengan tujuan untuk mengetahui hasil identifikasi bakteri pada ikan nila dengan menggunakan metode identifikasi KIT API 20E. Tahap-tahap pengujian yang dikerjakan meliputi uji oksidase, preparasi strip kit API 20E, preparasi inokulum dan proses inokulasi pada strip, pembacaan strip, penambahan reagen, dan proses pengisian data menggunakan *software*. Hasil identifikasi bakteri pada sampel A.P1 menunjukkan kemungkinan besar jenis bakteri yang teridentifikasi merupakan bakteri *Raoultella planticola*.

KATA KUNCI: API 20E; identifikasi bakteri

PENDAHULUAN

Bakteri merupakan mikroorganisme yang memiliki struktur sederhana yaitu bersel tunggal, tidak memiliki membran inti sel, dan memiliki ukuran yang mikroskopis. Ada beberapa dasar dalam pengelompokan bakteri, yaitu berdasarkan bentuk, jumlah dan letak flagel, kebutuhan terhadap oksigen, karakteristik dinding sel, dan cara mendapatkan makanan. Beragamnya jenis bakteri yang ada di alam menuntut kita untuk melakukan kegiatan identifikasi bakteri dalam keperluan pengujian.

Metode identifikasi bakteri dapat dilakukan berdasarkan morfologi sel, uji aktivitas biokimia, analisis DNA, dan uji serologis. Identifikasi berdasarkan morfologi sel biasa dilakukan melalui pemeriksaan mikroskopis untuk mengetahui bentuk, ukuran, kelompok bakteri (uji gram dan uji tahan asam), serta melihat struktur yang mencakup ada tidaknya flagel, kapsul, spora, granula, dan nukleus. Identifikasi bakteri melalui pengamatan aktivitas biokimia saat ini bisa lebih mudah dengan menggunakan Kit *analytical profile index* (API) seperti pernyataan Carson (2001) bahwa identifikasi yang dilakukan dengan uji API merupakan cara yang paling mudah dan uji API ini memberikan hasil identifikasi yang akurat.

Terdapat beberapa jenis kit API yang dapat digunakan tergantung pada jenis pengujian yang dibutuhkan. Berdasarkan pernyataan Feltham (1984), API 20E berguna untuk mengidentifikasi spesies dan subspecies *Enterobacteriaceae* dan identifikasi kelompok, serta spesies mikroorganisme non-fermentatif. Selain API 20E, terdapat juga beberapa jenis produk seperti API 20NE yang berfungsi untuk identifikasi bakteri Gram negatif yang merupakan non-*Enterobacteriaceae*. API Rapid 20E berguna untuk identifikasi *Enterobacteriaceae*. API NH berfungsi untuk identifikasi *Branhamella catarrhalis* dan *Neisseria haemophilus*. RAPIDEC Staph yang berguna untuk identifikasi *staphylococci*. API 20 Strep berguna untuk identifikasi *streptococci* dan *enterococcus*. API Staph berguna untuk identifikasi *staphylococci* dan *micrococci*. API *coryne* berguna untuk identifikasi *Corynebacteria* dan organisme *coryne*. API 20A berguna untuk identifikasi bakteri anaerob. Kegiatan pengujian menggunakan kit API 20E dilakukan dengan tujuan untuk mengidentifikasi bakteri yang terdapat pada ikan nila.

BAHAN DAN METODE

Kegiatan identifikasi bakteri ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Balai Riset Pemuliaan

Ikan, Sukamandi. Sampel uji bakteri yang digunakan adalah hasil isolasi bakteri pada ikan nila. Bakteri hasil isolasi didapatkan dari organ ginjal kemudian dimurnikan pada media TSA. Proses penanaman dan pemurnian bakteri dilakukan di dalam *bio safety cabinet* kemudian diinkubasi pada suhu 30°C dan digunakan untuk pengujian pada umur 18-24 jam.

Uji Oksidase

Uji oksidase dilakukan dengan menggunakan *oxidase discs*. Pengujian ini dilakukan dengan cara mengambil 1-2 ose koloni menggunakan jarum ose non-logam steril kemudian digoreskan pada *oxidase discs*. Hasil goresan kemudian diamati muncul tidaknya warna biru pada *oxidase discs*. Jika terjadi perubahan warna menjadi biru berarti menunjukkan hasil yang positif.

Preparasi Strip KIT API 20E

Kit API 20E telah dilengkapi dengan kotak inkubasi yang terdiri atas wadah dan penutup berbahan plastik transparan untuk inkubasi strip selama pengujian berlangsung. Wadah yang akan digunakan sebelumnya telah diberikan kode sampel terlebih dahulu kemudian tiap sumurannya diisi dengan akuades. Strip yang akan digunakan kemudian ditempatkan pada kotak inkubasi tersebut secara hati-hati. Strip terdiri atas sumur-sumur yang telah berisi *reagen* dalam bentuk kering dengan dilengkapi kode-kode jenis pengujian (keterangan masing-masing kode uji terdapat pada Tabel 1).

Preparasi Inokulum dan Proses Inokulasi Pada Strip

Inokulum yang digunakan untuk pengujian ini adalah inokulum yang berumur 18-24 jam yang ditumbuhkan pada media TSA. Inokulum tersebut diambil 2-3 ose dan dilarutkan dalam 5 mL PBS kemudian dihomogenkan. Suspensi bakteri yang telah dibuat kemudian didistribusikan pada masing-masing sumur pada strip secara hati-hati agar tidak terbentuk gelembung udara yang akan memengaruhi pengujian. Volume suspensi bakteri pada sumur terbagi menjadi dua, yaitu untuk uji dengan kode CIT, VP, dan GEL maka sumur diisi penuh sedangkan untuk uji lainnya hanya diisi sebagian yaitu hanya sampai pada batas penutup sumur (Gambar 2). Penambahan *mineral oil* dilakukan pada uji ADH, LDC, ODC, H₂S, dan URE untuk membuat kondisi menjadi anaerob. Setelah distribusi sampel selesai kemudian kotak inkubasi ditutup dan sampel diinkubasi pada suhu 36°C ± 2°C selama 18-24 jam.

Pembacaan Strip

Setelah periode inkubasi selesai kemudian strip dibaca berdasarkan *reading table* yang telah tersedia pada Kit API 20E. Jika terdapat tiga atau lebih hasil pengujian yang dinyatakan positif (tidak termasuk hasil uji GLU) maka dapat dilanjutkan ke tahap pengujian selanjutnya dengan terlebih dahulu mencatat hasil pengujian sementara pada lembar hasil yang telah disediakan. Jika hasil uji (termasuk uji GLU) didapatkan hasil kurang dari tiga yang menunjukkan hasil positif, maka dilakukan inkubasi kembali selama 24 jam ± 2 jam sebelum dilakukan pengujian lebih lanjut.

Penambahan Reagen

Penambahan *reagen* dilakukan setelah pembacaan strip menunjukkan hasil yang telah sesuai dengan kriteria pengujian. Jenis uji yang membutuhkan penambahan *reagen* adalah uji TDA, IND, dan VP. Uji TDA dilakukan dengan cara menambahkan satu tetes *reagen* TDA pada *tube strip* dengan kode TDA. Jika terbentuk warna coklat kemerahan maka mengindikasikan bahwa terjadi reaksi positif pada uji tersebut. Penambahan *reagen* JAMES dilakukan pada uji IND yaitu dengan cara menambahkan satu tetes *reagen* JAMES pada *tube strip* dengan kode IND, kemudian diamati ada atau tidaknya warna merah muda yang terbentuk pada bagian atas tabung (cupule) yang menunjukkan reaksi positif. Sedangkan pada uji VP, ditambahkan *reagen* VP-1 dan VP-2 masing-masing sebanyak satu tetes kemudian tunggu selama 10 menit. Jika muncul warna merah muda atau merah maka menunjukkan reaksi positif. Jika setelah 10 menit muncul sedikit warna merah muda maka dapat dikategorikan hasil reaksinya negatif.

Proses Pengisian Data Menggunakan Software

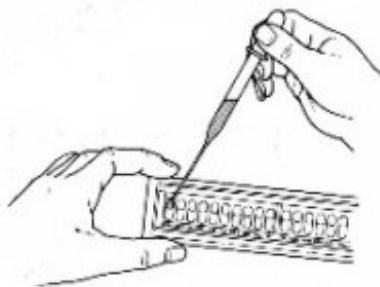
Proses identifikasi diperoleh berdasarkan *numerical profile*. Penentuan nilai *numerical profile* pada lembar hasil dibagi dalam tiga kelompok nilai, yaitu nilai-1, 2, dan 4 untuk tiap-tiap jenis uji yang akan mengindikasikan hasil tertentu. Penilaian masing-masing kelompok berdasarkan reaksi positif yang ditunjukkan selama pengujian akan memperoleh tujuh digit nomor profil untuk 20 jenis pengujian pada strip API 20E. Reaksi oksidase merupakan pengujian ke-21 dan memiliki nilai-4 jika positif. Hasil identifikasi dapat diketahui dengan menggunakan *apiweb™ identification software*.

HASIL DAN BAHASAN

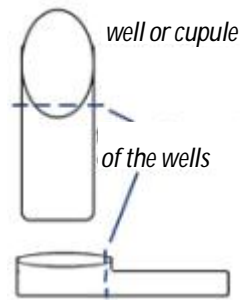
Kit API 20E memiliki kemampuan dalam mengidentifikasi spesies dan sub-spesies *Enterobacte-*

Tabel 1. Reading table kit API 20E

Tests	Active ingredients	QTY (mg/cup)	Reactions/enzymes	Results	
				Negative	Positive
ONPG	2-nitrophenyl-bD-galactopyraoside	0.223	b-galactosidase (Ortho NitroPhenyl-bD-Galactopyranosidase)	colorless	yellow (1)
<u>ADH</u>	L-arginine	1.9	Arginine DiHydrolase	yellow	red/orange (2)
<u>LCD</u>	L-lysine	1.9	Lysine DeCarboxylase	yellow	red/orange (2)
<u>ODC</u>	L-ornithine	1.9	Ornithine Decarboxylase	yellow	red/orange (2)
CIT	trisodium thiosulfate	0.756	CITrate utilization	pale green/yellow	blue-green/blue (3)
<u>H₂S</u>	sodium thiosulfate	0.075	H ₂ S production	colorless/greyish	lack deposit/thin line
<u>URE</u>	urea	0.76	UREase	yellow	red/orange (2)
TDA	L-trytophane	0.38	Tryptophane DeAminase	<u>TDA/immediate</u>	
				yellow	reddish brown
IND	L-trytophane	0.19	INDole production	<u>JAMES/immediate</u>	
				colorless pale green/yellow	pink
VP	sodium pyruvate	1.9	acetoin production (Voges Proskauer)	<u>VP1 + VP2 / 10 min</u>	
				colorless	pink/red (5)
GEL	Gelatin (ovine origin)	0.6	GELatinase	no diffusion	diffusion of black pigment
GLU	D-glucose	1.9	fermentation/oxidation (GLUcose) (4)	blue/blue-green	yellow/greyish yellow
MAN	D-mannitol	1.9	fermentation/oxidation (MANnitol) (4)	blue/blue-green	yellow
INO	inositol	1.9	fermentation/oxidation (INOsitol) (4)	blue/blue-green	yellow
SOR	D-sorbitol	1.9	fermentation/oxidation (SORbitol) (4)	blue/blue-green	yellow
RHA	L-rhamnose	1.9	fermentation/oxidation (RHAmnose) (4)	blue/blue-green	yellow
SAC	D-sucrose	1.9	fermentation/oxidation (SACcharose) (4)	blue/blue-green	yellow
MEL	D-melibiose	1.9	fermentation/oxidation (MELibiose) (4)	blue/blue-green	yellow
AMY	amygdalin	0.57	fermentation/oxidation (AMYgdalin) (4)	blue/blue-green	yellow
ARA	L-arabinose	1.9	fermentation/oxidation (ARAbinose) (4)	blue/blue-green	yellow
OX	(see oxidase test package insert)		CytochromeOXidase	(see oxidase test package insert)	



Gambar 1. Suspensi bakteri dimasukkan ke dalam sumur yang berisi reagen kering.



Gambar 2. Suspensi bakteri dimasukkan hanya sebatas bagian sumur yang tertutup.

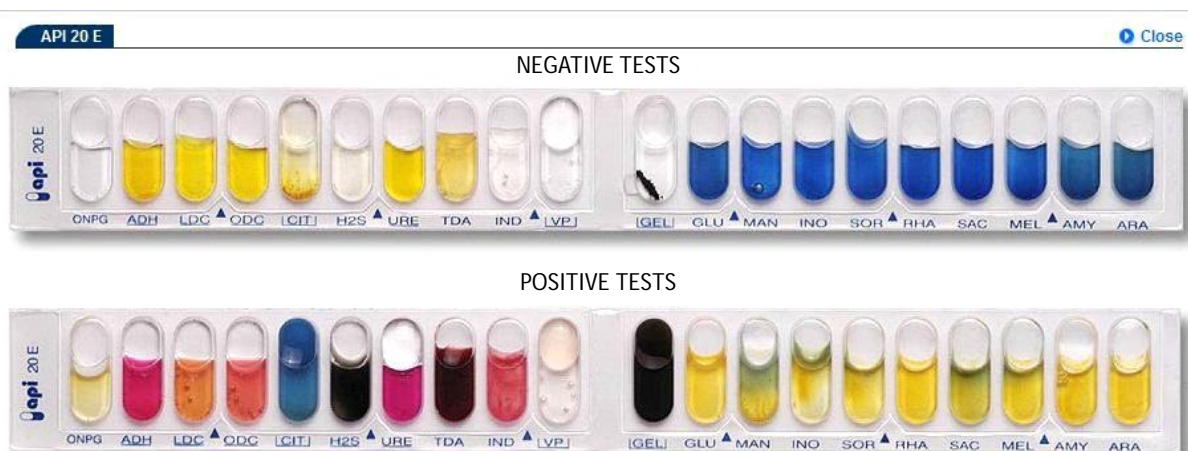
riaceae dan identifikasi kelompok, serta spesies mikroorganisme non-fermentatif. Bakteri kelompok *Enterobacteriaceae* merupakan kelompok bakteri Gram negatif yang berbentuk batang, bersifat anaerob fakultatif, dan bisa bergerak menggunakan alat bantu gerak yang disebut flagella peritrik yaitu flagella yang secara merata tersebar di seluruh permukaan sel (Pelczar & Chan, 1986). Bakteri ini terdiri atas bakteri non-patogen dan patogen yang bisa ditemukan di tanah, hewan, tanaman, dan manusia. Spesies dari bakteri ini banyak ditemukan hidup di sistem pencernaan dan merupakan penyebab sebagian besar penyakit. Sebagian spesies bersifat motil dan mampu menempel pada inang (*host*), serta menghasilkan enterotoksin.

Data hasil pengujian yang dilakukan pada sampel A.P1 menggunakan kit API 20E terlihat pada Gambar 3. Penentuan hasil didasarkan pada *reading table* dan acuan hasil uji positif dan negatif berdasarkan warna (Gambar 4). Sampel dengan kode A.P1 menunjukkan hasil positif (+) pada uji ONPG, ADH, LDC, ODC, CIT, URE, VP, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA, dan OX. Sedangkan pada uji H₂S, TDA, IND, dan GEL memperoleh hasil negatif.

Data hasil pengujian tersebut dimasukkan ke dalam lembar hasil uji sementara dan selanjutnya dimasukkan dalam *software* seperti pada Gambar 5 dan 6. Gambar 5, merupakan data numerik hasil uji sampel sedangkan

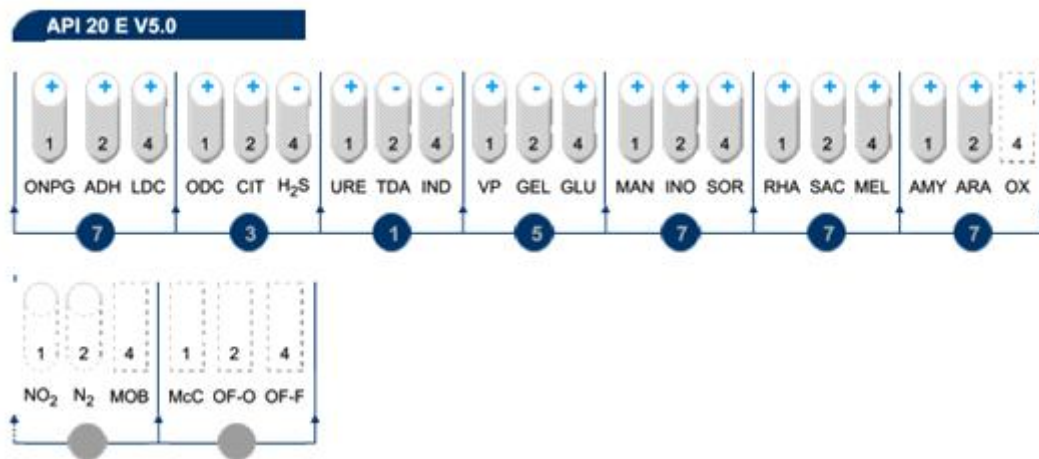


Gambar 3. Hasil uji sampel A.P1 pada strip kit API 20E.



The above examples are not intended to replace the reading table in the package insert

Gambar 4. Acuan hasil uji negatif dan positif API 20E berdasarkan warna.



Gambar 5. Data numerik hasil uji sampel A.P1 menggunakan software API 20E.

REFERENCE
A.P1
COMMENT

DATE
9/4/19

UNACCEPTABLE PROFILE										
Strip	API 20 E V5.0									
Profile	7 3 1 5 7 7 7									
Note	POSSIBILITY OF <i>Raoultella planticola</i>									
Significant taxa	% ID	T	Tests against							
<i>Enterobacter aerogenes</i>			ADH	0%	URE	1%	OX	0%		
<i>Raoultella ornithinolytica</i>			ADH	0%	IND	100%	OX	0%		
<i>Enterobacter cloacae</i>			LDC	1%	URE	1%	INO	12%	OX	0%
<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 1</i>			ADH	1%	ODC	0%	OX	0%		
Next taxon	% ID	T	Tests against							
<i>Enterobacter gergoviae</i>			ADH	0%	INO	23%	SOR	1%	OX	0%

Gambar 6. Data bakteri yang teridentifikasi pada sampel A.P1 menggunakan software API 20E.

Gambar 6, merupakan data jenis bakteri yang berhasil diidentifikasi pada sampel. Hasil identifikasi bakteri pada sampel dengan kode A.P1 menunjukkan kemungkinan besar bakteri yang teridentifikasi merupakan jenis bakteri *Raoultella planticola*. Bakteri *Raoultella planticola* merupakan bakteri yang mampu memproduksi histamin. Menurut Kung *et al.* (2009), *Hafnia alvei* diidentifikasi sebagai bakteri pembentuk histamin yang lemah, sedangkan *Raoultella ornithinolytica* dan *Raoultella planticola* dapat menghasilkan histamin lebih dari 500 mg/L dalam media *trypticase soy broth histidine* (TSBH).

KESIMPULAN

Hasil identifikasi bakteri pada sampel dengan kode A.P1 menggunakan Kit API 20E menunjukkan bahwa diduga jenis bakteri yang teridentifikasi merupakan jenis bakteri *Raoultella planticola*.

DAFTAR ACUAN

- Carson, J., Wagner, T., Wilson, T., & Donachie, L. (2001). Miniaturized tests for computer assisted identification of motile *Aeromonas* species with an improved probability matrix. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 190-200.
- Feltham, R.K.A., Wood, P.A., & Sneath, P.H.A. (1984). A general-purpose system for characterizing medically important bacteria to genus level. *Journal of Applied Bacteriology*, 57, 279-290.
- Kung, H.F., Wang, T.Y., Huang, Y.R., Lin, C.S., Wu, S.W., Lin, C.M., & Tsai, Y.H. (2009). Isolation and identification of histamine forming bacteria in tuna sandwiches. *J. Food Cont.*, 20, 1013-1017.
- Pelczar, M.J. & Chan, E.C.S. (1986). Dasar-dasar mikrobiologi. Volume 2. Jakarta: Universitas Indonesia Press, hlm. 949.