



JURNAL LABORATORIUM KHATULISTIWA

e - ISSN : 2597-9531

p - ISSN : 2597-9523



Identifikasi Bakteri Mirip Coliform pada Media Cromocoult Coliform Agar (CCA)

✉ **Paulina Rosa Evriarti**

Instalasi Mikrobiologi, Balai Besar Laboratorium Kesehatan Makassar

E-mail : rosa19oke@gmail.com

Submitted : 29 Agustus 2022; **Revised** : 15 November 2022; **Accepted** : 23 November 2022

Published : 30 November 2022

Abstract

Coliform-like bacteria can be found when examining coliforms in fresh water using the CCA media on membrane filter method. Therefore, it is necessary to characterize and identify coliform-like colonies that grow on CCA medium so that is easier to perform colony count analysis. One hundred ml of fresh water samples were filtered using filter membrane paper and then planted in CCA medium. Two different colonies growing on the media (red (A) and pink-purple (B)) were subjected to oxidase test, gram staining and re-cultured in various growth media such as blood agar, nutrient agar, MacConkey, and B. coli agar. Both colony types were also identified with Vitek MS to determine the species. The results of the examination showed that the red colonies (code A) were coliform-like bacteria, while the pink-purple colonies (code B) were coliform bacteria. The characteristics of coliform-like bacteria are that they produce hemolysis on blood agar and do not ferment lactose. Identification with Vitek MS showed that the isolated coliform-like bacteria was *Aeromonas hydrophilla*. Therefore, it can be concluded that *Aeromonas* sp. are coliform-like bacteria that grow on CCA, so further verification is needed when counting membrane filter colonies using CCA media.

Keywords : CCA, Coliform, Membran Filter Test, Non-Coliform

Bakteri mirip koliform dapat ditemukan saat melakukan pemeriksaan koliform pada air bersih dengan metode membrane filter menggunakan media CCA. Oleh karena itu perlu dilakukan karakterisasi dan identifikasi pada koloni mirip koliform yang tumbuh pada medium CCA sehingga semakin memudahkan dalam melakukan analisis hitung koloni. 100 ml sampel air bersih disaring menggunakan kertas membran filter lalu ditanam pada medium CCA. Dua koloni berbeda yang tumbuh pada media (warna merah (A) dan warna pink-keunguan (B)) dilakukan uji oksidase, pewarnaan gram dan direkultur diberbagai media pertumbuhan seperti agar darah, nutrient agar, macconkey, dan B.coli agar. Kedua jenis koloni juga dilakukan identifikasi dengan VitekMS untuk mengetahui spesiesnya. Hasil pemeriksaan menunjukkan bahwa koloni berwarna merah (kode A) adalah bakteri mirip koliform, sedangkan koloni berwarna pink-keunguan (kode B) adalah bakteri koliform. Karakteristik bakteri mirip koliform yaitu menghasilkan hemolisa pada agar darah dan tidak memfermentasi laktosa. Identifikasi dengan Vitek MS menunjukkan bahwa bakteri mirip koliform yang diisolasi adalah *Aeromonas hydrophilla*. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa *Aeromonas* sp. merupakan bakteri mirip koliform yang tumbuh pada CCA sehingga diperlukan verifikasi lebih lanjut ketika melakukan hitung koloni membrane filter menggunakan media CCA.

Kata Kunci : CCA, Membran Filter, Mirip koliform, Koliform

PENDAHULUAN

Bakteri koliform merupakan golongan bakteri basil Gram-negatif yang tidak membentuk spora, bersifat fakultatif anaerobik, oksidase negatif, dan dapat mendegradasi laktosa menjadi asam dan gas dalam waktu 24 - 48 jam pada suhu $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Kelompok bakteri koliform bersifat oportunistik patogen (Carroll, Butel, & Morse, 2015; Halkman & Halkman, 2014; Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2020). Bakteri yang termasuk ke dalam bakteri koliform antara lain genus *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, dan *Klebsiella* (Halkman & Halkman, 2014; Tominaga & Ishii, 2020). Bakteri koliform biasanya digunakan sebagai salah satu indikator untuk menganalisis kualitas air, termasuk air bersih karena kehadiran mereka dapat menunjukkan kemungkinan kondisi sanitasi yang tidak memadai serta adanya patogen yang berbahaya (Halkman & Halkman, 2014; Talaro, Chess, Wiersema, & Sen, 2013).

Bakteri koliform pada air bersih dapat diidentifikasi dengan berbagai metode pemeriksaan terstandar, salah satunya yaitu metode membran filter. Prinsip dari metode ini ialah menyaring sampel air pada kertas filter lalu menanamnya pada media yang mengandung kromogen dan laktosa (Carranzo, 2012). Terdapat beberapa media yang dapat digunakan pada metode membran filter salah satunya, Chromocoult Coliform Agar (CCA) (SNI, 2015). Suatu studi yang dilakukan oleh Lange, et.al. menunjukkan CCA dapat digunakan sebagai metode untuk menghitung keberadaan bakteri *E. coli* and coliform pada sampel (Lange, Strathmann, & Oßmer, 2013). Bakteri koliform akan menghasilkan warna merah muda hingga merah violet pada media ini sedangkan *E. coli* akan membentuk koloni berwarna biru tua hingga ungu (SNI, 2015).

Namun, pada manual prosedur SNI 3554:2015 menyebutkan bahwa pada medium CCA dapat tumbuh koloni lain yang menyerupai bakteri koliform, namun dengan hasil tes oksidase positif seperti *Aeromonas sp* (SNI, 2015). Oleh karena itu studi ini dilakukan untuk mengidentifikasi dan mengkaraktir-sai koloni mirip koliform yang tumbuh pada medium CCA sehingga semakin memudahkan dalam melakukan analisis hitung koloni.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian deskripsi observasional yang dilakukan dengan mengamati sampel penelitian lalu mendeskripsikan hasil yang diamati.

Isolasi Bakteri

Bakteri diisolasi dari sampel air bersih menggu-

nakan metode membran filter. Sebanyak 100 ml air bersih disaring menggunakan kertas filter berukuran 0,45 μm . Selanjutnya kertas filter ditanam dalam media Chromocoult Coliform Agar (CCA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35 $^{\circ}\text{C}$. Pilih koloni berwarna pink-kemerahan atau merah atau violet yang tumbuh pada media CCA untuk dilakukan uji oksidase.

Uji Oksidase

Uji oksidase dilakukan menggunakan kertas oksidase. Satu cuplikan koloni diambil dengan tusuk gigi lalu diusapkan pada kertas oksidase. Perubahan kertas menjadi warna ungu menunjukkan hasil uji oksidase positif.

Subkultur pada Media Blood Agar, Nutrient Agar, MacConkey dan B.coli

Masing-masing koloni yang memiliki warna berbeda pada media CCA di rekultur pada media Agar Darah, Nutrient Agar, MacConkey dan *B. coli* untuk melihat perbedaan karakteristik antar koloni.

Pewarnaan Gram

Masing-masing koloni yang tumbuh pada media Nutrient agar dilakukan pewarnaan gram. Satu cuplikan koloni diberi NaCl 0,9 % lalu diratakan membentuk suspensi pada preparat. Setelah mengering, difiksasi dengan melewati di atas api sebanyak tiga kali. Lalu, diberi larutan gentian violet selama satu menit, lugol selama 10-20 detik, dan safranin selama 20-30 detik.

Identifikasi Spesies dengan Vitek MS

Masing-masing koloni yang tumbuh pada media NA dilakukan identifikasi spesies menggunakan Vitek MS dari BioMérieux Clinical Diagnostics sesuai dengan instruksi kerja alat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan mikrobiologi pada air bersih menggunakan metode membran filter menunjukkan adanya bakteri pada sampel air bersih setelah diinkubasi selama 24 jam (Gambar 1). Jenis koloni yang tumbuh pada membran memiliki warna pink keunguan dan pink kemerahan.

Bakteri kelompok koliform akan menghasilkan warna tersebut bila ditanam pada medium CCA. (SNI, 2015) Meski demikian, dilakukan verifikasi dengan tes oksidase untuk memastikan bahwa koloni yang tumbuh adalah bakteri koliform. Tes oksidase dilakukan bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri yang memiliki sitokrom-c dan mampu menghasilkan enzim intraseluler yang disebut enzim oksidase. Bakteri

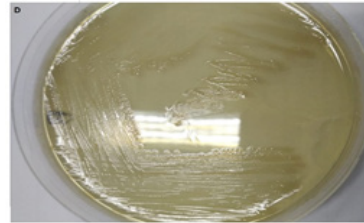
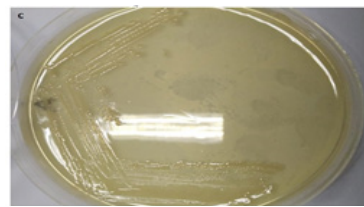
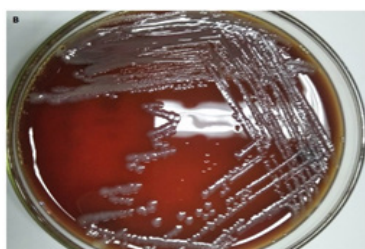
ini akan menunjukkan reaksi oksidase-positif dengan mengubah koloni menjadi berwarna biru/ungu saat ditetaskan reagen oksidase. Sedangkan, bakteri dengan oksidase-negatif yang kekurangan sitokrom-c tidak mampu untuk mengoksidasi reagen oksidase sehingga koloni tidak akan menunjukkan perubahan saat ditetesi reagen (Chavan, Khatoon, Anokhe, & Kalia, 2022; Shields & Cathcart, 2010).

Bakteri koliform merupakan kelompok bakteri Enterobacteriaceae yang tidak mampu mengoksidasi Tetra-methyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (kandungan dalam reagen oksidase) sehingga menunjukkan hasil negatif pada tes oksidase (Aryal, 2022b; Shields & Cathcart, 2010). Pada studi ini, hasil uji oksidase menunjukkan hasil negatif untuk koloni yang berwarna pink keunguan dan positif untuk koloni yang berwarna pink kemerahan (Tabel 1). Oleh karena itu, hal ini menunjukkan bahwa koloni berwarna pink keunguan adalah bakteri koliform sedangkan koloni berwarna pink kemerahan bukanlah koliform.

Tabel 1. Hasil Tes Oksidase

Koloni	Hasil Tes Oksidase	Pewarnaan Gram
Koloni A	Oksidase positif	Basil gram negatif
Koloni B	Oksidase negatif	Basil gram negatif

Selanjutnya, dilakukan pewarnaan gram untuk melihat morfologi bakteri secara mikroskopik. Hasil pewarnaan menunjukkan bahwa kedua kelompok bakteri merupakan bakteri gram negative basil (Tabel 1). Lalu, dilakukan subkultur untuk mengamati perbedaan karakteristik pertumbuhan dari kedua koloni pada berbagai media seperti media Nutrient Agar, Agar darah, dan B. coli agar (Gambar 1). Kedua koloni yang berbeda warna namun mirip ini nyatanya memiliki karakteristik pertumbuhan yang berbeda, misalnya pada agar darah, bakteri koliform tidak membentuk hemolisa sedangkan bakteri yang mirip koliform membentuk hemolisa (Gambar 1a dan 1b).



Gambar 1. Karakteristik Bakteri Koliform dan Mirip Koliform pada berbagai media
 Sumber : Dokumentasi Pribadi

Catatan : Koloni bakteri mirip koliform memiliki karakteristik koloni berwarna putih kekuningan dan membentuk zona hemolisa pada agar darah (a), sedangkan koloni bakteri koliform berwarna putih keabuan dan tidak membentuk hemolisa (b). Sementara itu pada media nutrient agar, kedua koloni memiliki karakteristik yang sulit dibedakan (c dan d). Selanjutnya pada media B. coli, bakteri mirip koliform berwarna merah tua (e), sedangkan koloni bakteri koliform berwarna pink (f). Pada MacConkey, bakteri mirip coliform berwarna kuning (g) dan bakteri koliform berwarna pink (h).

Agar darah merupakan media pertumbuhan yang terdiri dari dua komponen dasar yaitu medium basal (misalnya tryptic soy, brain heart infusion, dan Brucella base) dan 5% darah domba (Aryal, 2022a; Murray et al., 2020). Agar darah bersifat memperkaya (enrichment) pertumbuhan bakteri sekaligus membedakan bakteri. Kemampuan agar darah dalam membedakan bakteri disebabkan oleh adanya sel darah pada media agar (Carroll et al., 2015). Beberapa bakteri mampu menghasilkan hemolisin, suatu eksotoksin yang mengganggu membran sel-sel darah merah sehingga mengalami hemolisis (Carroll et al., 2015; Talaro et al., 2013). Adanya hemolisa akan ditunjukkan dengan terbentuknya zona hemolisis disekitar koloni yang tumbuh (Carroll et al., 2015). Hal ini menunjukkan bahwa koloni bakteri mirip koliform yang membentuk zona hemolisa pada media agar darah (Gambar 2a) merupakan kelompok bakteri yang mampu menghasilkan hemolisin. Studi ini selaras dengan teori dan studi lain yang telah tersedia, bahwa bakteri koliform merupakan bakteri yang tidak menghasilkan zona hemolisa pada media agar darah kecuali *E. coli* (MC, 2020a, 2020b, 2020c; Ristow & Welch, 2016).

Selain dilakukan karakterisasi, dilakukan juga identifikasi spesies menggunakan Vitek MS untuk memastikan jenis koloni yang tumbuh. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa koloni bakteri yang mirip koliform adalah *Aeromonas hydrophila*, sedangkan bakteri koliform yang tumbuh adalah *Enterobacter* sp (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil Identifikasi Koloni dengan Vitek MS

Koloni	Jenis Koloni	Identifikasi Vitek MS
Koloni A	Non-Koliform	<i>Aeromonas hydrophilla</i>
Koloni B	Koliform	<i>Enterobacter</i> sp.

Enterobacter merupakan salah satu kelompok bakteri koliform yang mampu memfermentasi laktosa dan menghasilkan koloni berwarna pink keunguan pada media CCA. (SNI, 2015) Sedangkan *Aeromonas* merupakan kelompok bakteri gram negatif, fakultatif anaerob yang mampu memfermentasi karbohidrat, tidak mampu memfermentasi laktosa dan secara morfologis dapat menyerupai anggota famili *Enterobacteriaceae* (Carroll et al., 2015; Murray et al., 2020; MuttalibAl-shalah, 2017). Namun, *Aeromonas* menunjukkan hasil positif pada tes oksidase. Selain itu, pada agar darah, *Aeromonas* dapat membentuk zona hemolisa (Fernández-Bravo & Figueras, 2020; Lamy & Horneman Amy, 2019; MuttalibAl-shalah, 2017). Karakteristik tersebut sesuai dengan yang diperoleh pada studi ini bahwa *Aeromonas hydrophila* memiliki karakteristik koloni berwarna merah pada CCA, membentuk zona hemolisa pada agar darah,

tidak berwarna pada media MacConcey, dan hasil tes oksidase positif.

Aeromonas dapat ditemukan pada lingkungan seperti air permukaan, air bawah tanah/air sumur/air bersih, air minum, botol, residu, air laut, dan air irigasi. *Aeromonas* dianggap sebagai oportunistik patogen karena dapat menyebabkan penyakit pada manusia, terutama gastroenteritis, dan bakteremia/septikemia pada kondisi immunocompromised dan immunocompetent (Fernández-Bravo & Figueras, 2020). *Aeromonas* juga telah dikaitkan dengan berbagai penyakit ekstraintestinal, seperti infeksi kulit dan jaringan lunak, infeksi luka traumatis, dan infeksi saluran pernapasan bawah/saluran kemih (Batra, Mathur, & Misra, 2016). Meskipun telah diketahui bahwa *Aeromonas* memiliki potensi sebagai patogen, bakteri ini tidak ditetapkan sebagai salah satu indikator kualitas air.

PENUTUP

Aeromonas sp. merupakan salah satu bakteri patogen oportunistik yang memiliki karakteristik koloni yang hampir mirip dengan bakteri koliform bila ditanam pada medium CCA. Namun memiliki karakteristik yang berbeda bila ditanam pada media agar darah dan MacConkey, dan hasil uji oksidase positif. Oleh karena itu, diperlukan ketelitian dan verifikasi koloni saat melakukan hitung jumlah koloni yang tumbuh pada pemeriksaan air bersih menggunakan metode membran filter.

DAFTAR PUSTAKA

- Aryal, S. (2022a). Blood Agar- Composition, Preparation, Uses and Pictures. Retrieved from <https://microbiologyinfo.com/blood-agar-composition-preparation-uses-and-pictures/>
- Aryal, S. (2022b). Oxidase Test- Principle, Uses, Procedure, Types, Result Interpretation, Examples and Limitations. Retrieved from <https://microbiologyinfo.com/oxidase-test-principle-uses-procedure-types-result-interpretation-examples-and-limitations/>
- Batra, P., Mathur, P., & Misra, M. C. (2016). *Aeromonas* spp.: an emerging nosocomial pathogen. *Journal of laboratory physicians*, 8(01), 001-004.
- Carranzo, I. V. (2012). Standard Methods for examination of water and wastewater. Paper presented at the *Anales De Hidrología Médica*.
- Carroll, K. C., Butel, J., & Morse, S. (2015). *Jawetz melnick and adelbergs medical microbiology* 27 E: McGraw-Hill Education.
- Chavan, D., Khatoon, H., Anokhe, A., & Kalia, V. (2022). Oxidase test: A biochemical method in bacterial identification.

Fernández-Bravo, A., & Figueras, M. (2020). An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. *Microorganisms*, 8, 129. doi:10.3390/microorganisms8010129

Halkman, H. B. D., & Halkman, A. K. (2014). Indicator Organisms. In C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition) (pp. 358-363). Oxford: Academic Press.

Lamy, B., & Horneman Amy, J. (2019). *Aeromonas*.

Lange, B., Strathmann, M., & Oßmer, R. (2013). Performance validation of chromogenic coliform agar for the enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. *Letters in applied microbiology*, 57(6), 547-553.

MC, E. (2020a). Microbe Canvas: *Citrobacter*. Retrieved from <https://www.microbe-canvas.com/search.php?tags=citrobacter&nc=-1>

MC, E. (2020b). Microbe Canvas: *Enterobacter*. Retrieved from <https://www.microbe-canvas.com/search.php?tags=enterobacter&nc=-1>

MC, E. (2020c). Microbe Canvas: *Klebsiella*. Retrieved from <https://www.microbe-canvas.com/search.php?tags=klebsiella&nc=-1>,

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2020). *Medical microbiology E-book*: Elsevier Health Sciences.

MuttalibAl-shalah, L. A. (2017). The study characters of *Aeromonas hydrophila* on some media. *Mesopotamia Environmental Journal*(Special Issue C).

Ristow, L. C., & Welch, R. A. (2016). Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: A cloak or a dagger? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(3), 538-545. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.08.015>

Shields, P., & Cathcart, L. (2010). Oxidase test protocol. *American Society for Microbiology*, 1-9.

SNI. (2015). SNI 3554:2015: Cara uji air minum dalam kemasan. Retrieved from <https://vdocuments.site/9402sni-3554-2015.html?page=2>

Talaro, K., Chess, B., Wiersema, D. S., & Sen, P. (2013). *Foundations in Microbiology*, 2012: McGraw-Hill.

Tominaga, T., & Ishii, M. (2020). Chapter 11 - Detection of microorganisms with lateral flow test strips. In C. S. Pavia & V. Gurtler (Eds.), *Methods in Microbiology* (Vol. 47, pp. 351-394): Academic Press.