

**ANALISIS WAKTU INKUBASI DALAM IDENTIFIKASI BAKTERI
Eshcerichia coli ATCC 25922 DENGAN MENGGUNAKAN METODE
KROMATOGRAFI GAS**



Oleh:

**Dyah Sukma Rengganingtiyas
19133875 A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

**ANALISIS WAKTU INKUBASI DALAM IDENTIFIKASI BAKTERI
Escherichia coli ATCC 25922 DENGAN MENGGUNAKAN METODE
KROMATOGRAFI GAS**

SKRIPSI

 *Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
derajat Sarjana Farmasi (S. Farm)
Program Studi S1- Farmasi pada Fakultas Farmasi*

Universitas Setia Budi

Oleh :

**Dyah Sukma Rengganingtiyas
19133875A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

PENGESAHAN SKRIPSI
berjudul

**ANALISIS WAKTU INKUBASI DALAM IDENTIFIKASI BAKTERI
Escherichia coli ATCC 25922 DENGAN MENGGUNAKAN METODE
KROMATOGRAFI GAS**

Oleh :

Dyah Sukma Rengganingtyas
19133875A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal : 10 Juni 2017

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi



Dekan,

Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt.

Pembimbing,

Iswandi, S.Si, M.Farm., Apt
Pembimbing Pendamping,

D. Andang Arif Wibawa, S.P., M.Si

Penguji :

1. Dra. Nony Puspawati, M.Si
2. Dr. Supriyadi, M.Si
3. Dr. Jason Merari P, M.Si., MM., Apt
4. Iswandi, S.Si., M.Farm., Apt

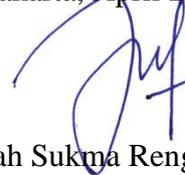
1.....
2.....
3.....
4.....

PERNYATAAN

Saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Saya siap menerima sanksi baik akademis maupun hukum apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian/karya ilmiah/skripsi orang lain.

Surakarta, April 2017



Dyah Sukma Rengganingtiyas

MOTTO

“**Sesungguhnya sesudah kesulitan pasti akan ada kemudahan. “**

(QS. Al – Insyirah ayat 6)

“Barang siapa yang menempuh jalan untuk mencari ilmu maka Allah akan memudahkan jalan menuju Surga.”

“Sesungguhnya malaikat akan membentangkan sayap-sayapnya kepada orang yang menuntut ilmu karena ridha dengan apa yang diperbuatnya.”

“Keutamaan orang yang berilmu atas orang yang tidak berilmu adalah seperti keutamaan bulan purnama atas semua bintang-bintang.”

(HR A bu Dawud & At Tirmidzi)

“Dan nama special untuk usaha adalah keyakinan. Berjalan dengan keikhlasan adalah proses luar biasa. Cobaan adalah Pelajaran hidup yang tak pernah dimiliki dia yang lain”

(Penulis)

“Saya datang, saya bimbingan, saya ujian, saya revisi dan saya menang!”

(Penulis)

Special tribute to :

Allah SWT yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang.

Kedua orang tuaku (Bapak dan Ibu) yang telah membesarkan, memberikan kasih sayang, dan selalu memberi motivasi hingga aku mampu berdiri disini.

Kakakku (Angga), adik-adikku (Indri dan Jati) dan keluarga besarku yang telah memberi motivasi hingga terselesaikannya skripsi ini.

Teman berjuangku (Teti).. Teman seperjuanganku

(Gita,Sem,Wulan,Maya,Nora,Cella,Amrina). Sahabatku

(Masyitah,Thina,Ella,Maya,Yoga dan anak DEPLU lainnya) yang member

dukungan dan hiburan. Sahabatku 10 tahun ini

(Nimas,Yeni,Desy,Nidia,Yunisa dan anak ICT 2013)

Anak Kost Bu Tarmo (Umama,Agnes,Titah,Ayu,Fatim,Riris)

Pembimbingku tercinta (Bapak Iswandi dan Bapak Andang)

Almamaterku, USB.

Semua pihak yang membantu yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Semua ini merupakan anugrah dan pengalaman terindah yang tak dapat terlupakan.

KATA PENGANTAR

Assalammu'alaikum Wr.Wb

Puji syukur kehadirat Allah SWT, karena atas segala rahmat dan hidayahNya, Penulis dapat menyelesaikan Skripsi guna memenuhi persyaratan untuk mencapai derajat Sarjana Farmasi (S.Farm) di Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

Alhamdulillahirobbil'alamin, akhirnya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“ANALISIS WAKTU INKUBASI DALAM IDENTIFIKASI BAKTERI *Escherichia coli* ATCC 25922 DENGAN MENGGUNAKAN METODE KROMATOGRAFI GAS”** Diharapkan dapat memberikan sumbangan bagi ilmu pengetahuan dalam bidang teknologi farmasi.

Penelitian dan penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, baik secara moril maupun materil. Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Allah SWT yang senantiasa memberikan anugerah, nikmat serta petunjuk di setiap langkah hidupku
2. Dr. Djoni Tarigan, MBA selaku Rektor Universitas Setia Budi.
3. Prof. DR. R.A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
4. Iswandi, S.Si, M.Farm., Apt selaku Pembimbing Utama dan D. Andang Arif Wibawa, S. P, M.Si selaku Pembimbing Pendamping yang telah banyak memberikan ilmu, masukan, pengarahan dan bimbingan selama penyusunan skripsi ini
5. Dosen penguji yang telah memberikan masukan demi kesempurnaan dalam skripsi ini.

6. Seluruh Dosen, Asisten Dosen, Staf Perpustakaan dan Staf Laboratorium Universitas Setia Budi.
7. Bapak, Ibu, Kakak Angga Widyah Ayu Anggraina serta kedua adikku Dyah Sukma Indri Astutik dan Dyah Sukma Jati Pamungkas yang telah memberikan cinta, kasih sayang, doa, dukungan dan pengorbanan, serta semangat untuk segera menyelesaikan skripsi ini.
8. Sahabat-sahabatku (Masyitah, Thina, Ella, Maya, dan anak DEPLU BEM Fakultas Farmasi) dan sahabatku 10 tahun ini (Nimas, Desy, Nidia, Yeni, Yunisa dan anak ICT 2013) serta teman seperjuanganku Teti Insani Karimah, serta anak-anak kos pink tercinta (Gita, Sem, Wulan, Maya, Cella, Nora, Amrina) yang telah memberikan semangat serta tempat untuk menyelesaikan skripsi ini.
9. Semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Tak ada gading yang tak retak, begitu pula dengan penyusunan skripsi ini. Penulis menyadari banyak kekurangan dan masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu penulis berharap segala saran dan kritik dari pembaca untuk menyempurnakan skripsi ini. Semoga skripsi ini berguna bagi siapa saja yang membacanya.

Wallaikumsalam Wr.Wb

Surakarta, April 2017



Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN	iii
HALAMAN MOTO PERSEMBAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Perumusan Masalah.....	3
C. Tujuan Masalah	3
D. Kegunaan Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. Bakteri <i>Escherichia coli</i>	5
1. Sistematika <i>Escherichia coli</i>	5
2. Morfologi dan identifikasi <i>Escherichia coli</i>	5
3. Komponen sel <i>Escherichia coli</i>	6
3.1 Asam Nukleat	6
3.2 Asam Amino.....	7
3.3 Protein.....	7
3.4 Polisakarida.....	7
3.5 Lemak	7
4. Faktor-faktor patogenesis <i>Escherichia coli</i>	8
4.1 Antigen permukaan.....	8
4.2 Enterotoksis	8
5. Fisiologi bakteri <i>Escherichia coli</i>	8
6. Toksin bakteri <i>Escherichia coli</i>	9
7. Sifat <i>Escherichia coli</i>	9
B. Pertumbuhan Bakteri	10

1.	Fase lamban (<i>lag</i>)	10
2.	Fase eksponensial	11
3.	Fase stationer puncak	11
4.	Fase penurunan: fase kematian	11
C.	Metode	12
1.	Sterilisasi	12
2.	Teknik penanaman dari suspensi	12
2.1	<i>Spread Plate</i> (Agar tabur ulas)	13
2.2	<i>Pour Plate</i> (Agar tuang)	13
3.	Teknik penanaman dengan goresan (<i>Streak</i>)	13
3.1	Goresan sinambung	13
3.2	Goresan T	14
3.3	Goresan kuadran (<i>Streak quadrant</i>)	14
4.	Esterifikasi	14
5.	Saponifikasi	14
5.1	Pengertian saponifikasi	14
5.2	Prinsip saponifikasi	15
6.	Metilasi	15
7.	Ekstraksi	15
7.1	Pengertian Ekstrak	15
7.2	Pelarut	16
D.	Media	16
1.	Pengertian media	16
2.	Macam-macam media	17
3.	Klasifikasi media	17
E.	Kromatografi gas	18
1.	Prinsip kromatografi gas	18
2.	Komponen alat kromatografi gas	19
2.1	Fase gerak	19
2.2	Ruang suntik sampel	19
2.3	Kolom	20
2.4	Detektor	20
F.	Analisis	20
1.	Metode analisis asam lemak bakteri <i>Escherichia coli</i>	20
2.	Kondisi analisis	21
G.	Landasan Teori	21
H.	Hipotesis	23
BAB III	METODE PENELITIAN	24
A.	Populasi dan Sampel	24
1.	Populasi	24
2.	Sampel	24
B.	Variabel Penelitian	24
1.	Identifikasi variabel utama	24
2.	Klasifikasi variabel utama	24
3.	Definisi operasional variabel utama	25
C.	Alat dan Bahan	25
1.	Bahan	25
2.	Alat	26

D.	Jalannya Penelitian.....	26
1.	Sterilisasi alat.....	26
2.	Pembuatan plat agar.....	26
3.	Kultur bakteri.....	26
4.	Uji identifikasi <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	27
5.	Pembuatan suspensi bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	29
6.	Penyiapan reagen.....	29
7.	Penyiapan sampel ekstraksi.....	30
8.	Analisis dengan kromatografi gas.....	30
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	33
1.	Sterilisasi.....	33
2.	Pembuatan plat agar.....	33
3.	Hasil identifikasi bakteri uji <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	33
3.1	Identifikasi koloni bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 secara makroskopis.....	33
3.2	Identifikasi mikroskopis <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 dengan pewarnaan gram.....	34
3.3	Identifikasi biokimia <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	35
4.	Hasil pembuatan suspensi bakteri uji <i>E.coli</i> ATCC 25922.....	37
5.	Pelarut.....	38
6.	Penyiapan sampel asam lemak metil ester (<i>FAME</i>) bakteri uji <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	38
7.	Hasil analisis asam lemak metil ester (<i>FAME</i>) bakteri uji <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	39
7.1	Pemilihan kondisi analisis asam lemak metil ester (<i>FAME</i>) bakteri pada kromatografi gas.....	39
7.1.1.	Pemilihan suhu awal kolom untuk analisis asam lemak metil ester (<i>FAME</i>) <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	39
7.1.2	Pemilihan laju alir gas pembawa analisis asam lemak metil ester (<i>FAME</i>) <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	40
7.2	Hasil analisis sampel asam lemak metil ester bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 dengan kromatografi gas.....	40
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN.....	43
A.	KESIMPULAN.....	43
B.	SARAN.....	43
	DAFTAR PUSTAKA.....	44
	LAMPIRAN.....	49

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Identifikasi uji biokimia pada <i>E. coli</i>	35
Tabel 2. Perbandingan hasil identifikasi uji biokimia pada <i>E.coli</i>	37
Tabel 3. Hasil waktu retensi dan luas area.....	42

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Morfologi Bakteri <i>E.coli</i>	6
Gambar 2. Kurva Pertumbuhan Bakteri.....	10
Gambar 3. Proses Esterifikasi Asam Lemak.....	21
Gambar 4. Proses Kultur Bakteri dengan metode <i>quadrant streak</i>	27
Gambar 5. Skema Jalannya Penelitian	32
Gambar 6. Makroskopis <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 pada media EA	34
Gambar 7. Mikroskopis <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 pada media EA	35
Gambar 8. Uji biokimia <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	37
Gambar 9. Hasil kromatogram analisis asam lemak metil ester <i>E.coli</i> ATCC 25922 ...	41

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Foto Alat	49
Lampiran 2. Foto Bahan.....	51
Lampiran 3. Hasil identifikasi bakteri <i>E.coli</i> ATCC 25922 secara makroskopis .	52
Lampiran 4. Hasil identifikasi bakteri <i>E.coli</i> ATCC 25922 secara pewarnaan gram	52
Lampiran 5. Hasil identifikasi bakteri <i>E.coli</i> ATCC 25922 secara uji biokimia ..	53
Lampiran 6. Penyiapan Reagen.....	54
Lampiran 7. Kultur bakteri <i>E.coli</i> ATCC 25922 pada variasi waktu inkubasi	56
Lampiran 8. Sampel asam lemak metil ester bakteri <i>E.coli</i> ATCC 25922	57
Lampiran 9. Formulasi dan Pembuatan Media	57
Lampiran 10. Perhitungan SD dan RSD	61
Lampiran 11. Hasil kromatogram asam lemak bakteri <i>E.coli</i> ATCC 25922 pada kromatografi gas.....	63
Lampiran 12. Hasil kromatogram pelarut	68
Lampiran 13. Hasil kromatogram media <i>MacConkey</i>	71

INTISARI

RENGGANINGTIYAS, D.S. 2017, ANALISIS WAKTU INKUBASI DALAM IDENTIFIKASI BAKTERI *Escherichia coli* ATCC 25922 DENGAN MENGGUNAKAN METODE KROMATOGRAFI GAS, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Infeksi adalah proses invasi dan pembiakan mikroorganisme yang terjadi di jaringan tubuh manusia yang dapat menimbulkan cedera seluler lokal, salah satu penyebab penyakit infeksi adalah bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Mendeteksi bakteri penginfeksi pada tubuh manusia dengan metode konvensional biasanya diperlukan waktu 24 jam setelah pemeriksaan mengenai gejala-gejala timbulnya infeksi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan kromatografi gas dalam mengidentifikasi bakteri *E. coli* dalam waktu inkubasi kurang dari 24 jam, mengetahui perbedaan pola kromatogram dari senyawa yang dihasilkan oleh bakteri *E. coli* dalam berbagai variasi waktu inkubasi, dan mencari waktu inkubasi bakteri *E. coli* yang paling optimal untuk dapat diidentifikasi senyawanya dengan metode kromatografi gas.

Derivatisasi asam lemak *E. coli* diubah menjadi asam lemak metal ester (*FAME*) dengan menggunakan metode esterifikasi. Variasi waktu pertumbuhan bakteri *E. coli* dilakukan masing-masing 6 jam, 12 jam, 24 jam, 36 jam dan 48 jam. Sampel bakteri *E. coli* yang telah dipisahkan asam lemaknya dan diesterifikasi menjadi asam lemak metil ester. Identifikasi bakteri *E. coli* dianalisis dengan Kromatografi gas dengan kondisi suhu awal kolom 120°C.

Pada analisis menggunakan kromatografi gas semua variasi waktu pertumbuhan bakteri dapat diidentifikasi. Waktu retensi (t_R) yang didapatkan dari masing-masing sampel adalah 3,737 menit; 3,795 menit; 3,477 menit; 3,830 menit; dan 3,470 menit. Pada hasil penelitian ini diketahui kromatografi gas mampu mengidentifikasi bakteri pada waktu pertumbuhan kurang dari 24 jam, yaitu 6 jam dan 12 jam, dan waktu paling optimal untuk kromatografi gas dapat mengidentifikasi bakteri *E. coli* adalah pertumbuhan 6 jam.

Kata kunci : Bakteri, *Escherichia coli*, Kromatografi gas, Asam lemak metil ester, Analisis

ABSTRACT

RENGGANINGTIYAS, D.S. 2017, ANALYSIS OF INCUBATION TIME IN IDENTIFICATION OF BACTERIA *Escherichia coli* ATCC 25922 BY USING GAS CHROMATOGRAPHY METHOD, ESSAY, PHARMACEUTICAL FACULTY, UNIVERSITY OF BUDI, SURAKARTA.

Infection is a process of invasion and breeding of microorganisms that occur in human tissue which can cause local cellular injury, one of the infectious diseases causes by bacteria *E.coli*. Detection of bacteria that cause infection on human body with conventional methods usually takes 24 hours after examination the symptoms of infection. This study has a purpose to know the ability of gas chromatography to analyze the compound product from *E.coli* bacteria at growth time less than 24 hours. Second, to know different of chromatogram from compound product of *E.coli* bacteria a various incubation time, and third, to find how long incubation time of *E.coli* bacteria that can identify the compound with GC.

Derivatization the fatty acid of *E.coli* is transform to fatty acid metal ester (FAME) by esterification method. Variations in the growth time of *E.coli* bacteria are perform at 6, 12, 24, 36 and 48 hours, respectively. *E. coli* bacteria samples that will separate the fatty acid and esterified into fatty acid methyl ester. Identification of *E.coli* bacteria was analyze by gas chromatography with the initial temperature conditions of column 120°C.

In the analysis using gas chromatography all variations of bacterial growth time can be identified. The retention time (t_R) obtained from each sample was 3.737; 3,795; 3,477; 3,830; and 3.470 minutes. The results of this study revealed that gas chromatography was able to identify bacteria at growth time of less than 24 hours, was 6 hours and 12 hours, and the most optimal time for gas chromatography can identify *E.coli* bacteria was 6 hours growth.

Keywords: Bacteria, *Escherichia coli*, Gas chromatography, Fatty acid methyl ester, Analysis

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Infeksi adalah proses invasi dan pembiakan mikroorganisme yang terjadi di jaringan tubuh manusia yang secara klinis mungkin tidak terlihat atau dapat menimbulkan cedera seluler lokal akibat kompetisi metabolisme, toksin, replikasi intrasel atau respon antigen-antibodi (Dorland 2002). Penyakit infeksi masih merupakan jenis penyakit yang paling banyak diderita oleh penduduk di negara berkembang, termasuk Indonesia. Salah satu penyebab penyakit infeksi adalah bakteri. Bakteri merupakan mikroorganisme yang tidak dapat dilihat dengan mata telanjang, tetapi hanya dapat dilihat dengan bantuan mikroskop (Radji 2011).

Masa inkubasi bakteri adalah waktu agar bakteri dapat melangsungkan proses pertumbuhan dengan baik dan sempurna. Kemudian definisi dari inkubasi bakteri adalah proses pemeliharaan kultur bakteri selama periode tertentu dengan suhu tertentu yang bertujuan untuk memantau perkembangan dan pertumbuhan bakteri, dimana yang kita ketahui waktu inkubasi bakteri yaitu 24 jam-48 jam.

Bakteri *E.coli* adalah salah satu jenis bakteri Gram negatif. Bakteri *E.coli* merupakan kuman oportunistik yang banyak ditemukan di usus besar manusia sebagai flora normal. Bakteri *E.coli* dapat berubah menjadi patogen jika pertumbuhan di dalam tubuh melebihi batas normal, akibat perubahan makanan secara mendadak serta perubahan suhu lingkungan. *E.coli* dapat menimbulkan pneumonia, endocarditis, infeksi pada luka, abses pada berbagai organ, meningitis dan dapat menyebabkan penyakit diare (Entjang 2003). Penyakit infeksi yang disebabkan karena *E.coli* seperti infeksi sistem saluran kencing dan diare. Tanda dan gejala infeksi saluran kencing meliputi frekuensi kencing, disuria, hematuria dan piuria (Jawetz *et al* 2005).

Deteksi bakteri penginfeksi pada tubuh manusia biasanya diperlukan waktu 24 jam setelah pemeriksaan mengenai gejala-gejala timbulnya infeksi. Kebutuhan waktu 24 jam untuk mendeteksi dinilai kurang efektif karena jika bakteri tersebut berbahaya untuk tubuh manusia itu dan bakteri akan berkembang

dengan cepat maka dalam waktu 24 jam akan memperbanyak jumlah bakteri dan memperparah keadaan penderita tersebut.

Identifikasi bakteri secara umum biasanya dilakukan dengan cara goresan yaitu dengan menginokulasikan suspensi bakteri pada medium padat dan diinkubasi selama 24 jam, baru dapat kita lihat hasil pertumbuhan koloni bakteri. Bakteri diidentifikasi hingga tingkat spesies (*speciated*) menggunakan koloni tersebut. Sering membutuhkan waktu lebih dari 24 jam (Yuwono 2012).

Mendeteksi bakteri penginfeksi pada tubuh manusia dengan metode konvensional biasanya diperlukan waktu 24 jam setelah pemeriksaan mengenai gejala timbulnya infeksi. Sampel yang di dapatkan diinokulasikan pada media tertentu lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pemeriksaan membutuhkan waktu 24 jam dinilai kurang efektif karena jika bakteri tersebut berbahaya untuk tubuh dan bakteri akan berkembang dengan cepat maka dalam waktu 24 jam akan memperbanyak jumlah bakteri dan memperparah keadaan penderita. Pemberian obat juga kurang efektif, kemungkinan dokter akan memberikan antibiotik spektrum luas untuk pengobatan sementara sebelum diketahui jelas bakteri penginfeksi. Pemberian antibiotik spektrum luas dapat menyebabkan resistensi obat dan dapat mengembangkan efek samping. Saat ini untuk identifikasi bakteri penginfeksi pada manusia dengan cepat dapat menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Meskipun tes PCR yang mendeteksi materi genetik dari bakteri telah dicoba, PCR tampaknya tidak cukup sensitif untuk mendeteksi organisme dalam tinja (hanya sekitar 47% sensitif). Suatu penelitian berpendapat bahwa sensitivitas PCR baik bila dilakukan pada sampel darah daripada feses (84%-95% setelah lima hari infeksi) tetapi tes ini tidak banyak tersedia (Ballesteros 2012). Kromatografi gasberpotensi menjadipilihanutama dalam membantu mengatasi permasalahan dalam duniabioteknologi, farmasi, klinik dan kehidupan manusiasecaraumum dengan biaya yang terjangkau.

Kromatografi gas ini juga digunakan untuk ekstraksi simultan dan transesterifikasi lipid pada bakteri, bakteri yang digunakan bakteri *Micrococcus ureae*, *Gaffkya tetragena*, *Escherichia freundii*, *E. coli*, *Aerobacter cloacae*,

Klebsiella aerogenes (*K. pneumoniae*), *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Pasteurella tularensis*, *Bacillus subtilis* var. *niger*, dan *B. Anthracis* (Abel *et al* 1963). Identifikasi mikroba dengan sistem kromatografi gas, yang dapat mengidentifikasi lebih dari 1.500 spesies bakteri berdasarkan profil asam lemak yang unik dari mereka dan hanya membutuhkan waktu 5 menit per sampel untuk mempersiapkan batch 30 sampel (Sasser 2006). Identifikasi metabolit baru bakteri transformasi indol menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dan kromatografi-massa gas spektrometri. Alasan-alasan inilah, kromatografi kemudian menjadi pilihan utama dalam membantu mengatasi permasalahan dalam dunia bioteknologi, farmasi, klinik dan kehidupan manusia secara umum (Pankaj & Hanhong 2014).

B. Perumusan Masalah

Permasalahan dalam penelitian ini adalah pertama, apakah kromatografi gas mampu menganalisis senyawa yang dihasilkan oleh bakteri *Eschericia coli* pada waktu pertumbuhan kurang dari 24 jam?

Kedua, apakah ada perbedaan pola kromatogram dari senyawa yang dihasilkan oleh bakteri *Eschericia coli* dalam berbagai variasi waktu inkubasi?

Ketiga, berapakah lama waktu inkubasi bakteri *Eschericia coli* yang optimal untuk dapat diidentifikasi senyawanya dengan metode kromatografi gas?

C. Tujuan Penelitian

Pertama, untuk mengetahui kemampuan kromatografi gas dalam menganalisis senyawa yang dihasilkan oleh bakteri *Eschericia coli* pada waktu pertumbuhan kurang dari 24 jam.

Kedua, untuk mengetahui perbedaan pola kromatogram dari senyawa yang dihasilkan oleh bakteri *Eschericia coli* dalam berbagai variasi waktu inkubasi.

Ketiga, untuk mencari lama waktu inkubasi bakteri *Eschericia coli* yang optimal untuk dapat diidentifikasi senyawanya dengan metode kromatografi gas.

D. Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tambahan yang ilmiah dalam ilmu pengetahuan dalam bidang teknologi mikroorganisme dan mikrobiologi. Penelitian ini juga diharapkan mampu digunakan sebagai masukan bagi tenaga medis dalam upaya memanfaatkan metode kromatografi gas sebagai solusi cepat untuk identifikasi bakteri penginfeksi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

Escherichia coli merupakan bakteri flora normal pada saluran cerna, yang dapat menyebabkan infeksi atau diare sedang sampai berat pada saluran cerna manusia. Bakteri ini termasuk dalam family *Enterobacteriaceae* yang dapat hidup dalam usus besar manusia dan hewan, dalam tanah dan dalam air (Jawetz *et al* 2012). *Escherichia coli* dapat menyebabkan diare yaitu dengan mekanisme produksi enterotoksin yang secara tidak langsung menyebabkan kehilangan cairan dan dengan invasi yang sebenarnya lapisan epithelium dinding usus, yang menyebabkan peradangan dan kehilangan cairan (Jawetz *et al* 2012).

1. Sistematika *Escherichia coli*

Menurut Jawetz *et al.* (2012) *Escherichia coli* diklasifikasikan sebagai berikut :

Divisi	: Protophyta
Subdivisi	: Schizomycetea
Kelas	: Schizomycetes
Bangsa	: Eubacteriales
Suku	: Enterobacteriaceae
Marga	: <i>Escherichia</i>
Jenis	: <i>Escherichia coli</i>

2. Morfologi dan identifikasi *Escherichia coli*

Escherichia coli adalah bakteri gram negatif, berbentuk batang pendek, berderet seperti rantai, dapat memfermentasi glukosa dan laktosa membentuk asam dan gas. *Escherichia coli* dapat tumbuh baik pada media *MacConkey* dan dapat memecah laktosa dengan cepat, juga dapat tumbuh pada media agar, serta dapat merombak karbohidrat dan asam lemak menjadi asam dan gas serta dapat menghasilkan gas karbondioksida dan hydrogen (Pelczar & Chan 1998). *Escherichia coli* berbentuk batang pendek (cocobasil), gram negatif dengan

ukuran 0,4 – 0,7 μm x 1,4 μm . sebagian besar bersifat motil (bergerak) dan beberapa strain memiliki kapsul (Supardi 1999).



Gambar 1. Morfologi Bakteri *E. coli* (Feng *et al* 2002)

3. Komponen Sel *Escherichia coli*

Sel pada umumnya memiliki jumlah protein yang lebih banyak daripada DNA (asam nukleat), tetapi DNA merupakan biomolekul terbesar di dalam sel makhluk hidup. Komponen penyusunnya diantaranya adalah air 70 %, Asam Nukleat (DNA 1 % dan RNA 6 %), Nukleotida 0,8 %, Protein 15%, Asam Amino 0,8 %, polisakarida 3 %, Lipid 2 %, Ion Anorganik dan penyusun lain 0,4% (Watson JD 1972).

3.1. Asam Nukleat

Asam nukleat adalah makromolekul yang terdapat sebagai polimer yang disebut *polinukleotida*. Setiap polinukleotida terdiri atas monomer-monomer yang disebut nukleotida (*nucleotide*). Setiap nukleotida tersusun dari tiga bagian: basa nitrogen (*nitrogenous base*), gula berkarbon lima (pentosa), dan gugus fosfat (Campbell 2008).

Asam nukleat adalah suatu polimer yang terdiri dari banyak molekul nukleotida. Ada dua macam asam nukleat yaitu RNA dan DNA. Nukleotida RNA dan DNA terdiri dari tiga komponen, yaitu pentosa, gugus fosfat, dan basa nitrogen. Pada RNA pentosanya merupakan ribosa, sedangkan pada DNA adalah deoksiribosa (Poedjiadji 2006).

3.2. Asam Amino

Asam amino adalah unit molekuler dasar yang membentuk polimer protein panjang. Ada 20 jenis asam amino dalam protein yang menjadi dasar struktur dan fungsi tubuh manusia. Setiap asam amino mengandung sedikitnya satu gugus asam karboksil (-COOH) dan sedikitnya satu gugus amino (-NH₃). Setiap asam amino mempunyai anak rantai yang disebut sebagai satu gugus R. (Sloane 2004).

3.3. Protein

Protein adalah polimer asam amino yang bertanggung jawab untuk melaksanakan instruksi yang terdapat dalam kode genetik. Suatu urutan linier asam amino yang bergabung melalui ikatan peptide disebut struktur primer protein. Setiap jenis protein memiliki struktur primer yang unik, suatu urutan asam-asam amino yang tepat. Perubahan yang sedikit sekali pun dalam struktur primer akan dapat mempengaruhi konformasi protein dan kemampuannya untuk digunakan (Suhara 2008).

3.4. Polisakarida

Polisakarida merupakan polimer dari gula sederhana (yaitu, monosakarida). (istilah sakarida berasal dari sakchar kata Yunani, yang berarti gula atau manis). Pada umumnya polisakarida mempunyai molekul besar dan lebih kompleks daripada mono atau oligosakarida. Molekul polisakarida terdiri atas banyak molekul monosakarida. Polisakarida yang terdiri dari satu macam monosakarida saja disebut homopolisakarida sedangkan yang mengandung senyawa lain disebut heteropolisakarida. Umumnya polisakarida berupa senyawa berwarna putih dan tidak berbentuk kristal, tidak mempunyai rasa manis dan tidak mempunyai sifat mereduksi. Berat molekul polisakarida bervariasi dari beberapa ribu hingga lebih dari satu juta. Polisakarida yang dapat larut dalam air akan membentuk larutan koloid. Beberapa polisakarida yang penting diantaranya ialah amilum, glikogen, dekstrin dan selulosa (Poedjiadi 2005).

3.5. Lemak

Lipida umumnya merupakan senyawa yang hanya larut dalam pelarut nonpolar, misalnya kloroform, eter, alkohol, aseton, dan pelarut nonpolar lainnya. Lipida tidak larut dalam pelarut polar misalnya air. Lipida memiliki beberapa

fungsi yaitu sebagai cadangan makanan misalnya triasilgliserol, sebagai penyusun struktur membran misalnya phospholipidas yang merupakan penyusun utama membran sel, derivat lipida dapat membentuk hormon, bersama protein membentuk senyawa gabungan (lipoprotein), yang memiliki fungsi khusus dalam tubuh organisme (Suhara 2008).

Lipid (Lemak) sederhana terbuat dari dua jenis molekul yang lebih kecil: gliserol dan asam lemak. Gliserol merupakan alkohol dengan tiga karbon yang masing-masing berikatan dengan satu gugus karboksil, sedangkan Asam lemak memiliki rantai karbon panjang dengan salah satu ujungnya merupakan gugus karboksil. (Campbell 2010).

4. Faktor-faktor Patogenesis

4.1. Antigen permukaan. Terdapat 2 tipe fimbriae pada *Escherichia coli* yaitu, tipe manosa sensitif (pili) dan tipe manosa resisten (CFAs I & II). Kedua tipe fimbriae ini penting sebagai *colonization factor*, yaitu untuk melekatkan sel kuman pada sel/jaringan induk. Misalnya: antigen CFAs I dan II melekatkan enteropathogenic *Escherichia coli* pada sel epitel usus binatang.

4.2. Enterotoksis. Ada 2 macam enterotoksin yang telah berhasil diisolasi dari *Escherichia coli* yaitu, toksin LT (termolabil) dan toksin ST (termostabil). Produksi kedua macam toksin ini diatur oleh plasmid yang mampu pindah dari satu kuman ke sel kuman lainnya. Terdapat 2 macam plasmid, satu plasmid mengkode pembentukan toksin LT dan ST dan satu plasmid lainnya mengatur pembentukan toksin ST saja (Karsinah *et al* 1994).

5. Fisiologi Bakteri

Escherichia coli bersifat lateral yaitu peritrik dimana flagel tersebar dari ujung-ujung sampai pada sisi. Rata-rata pergerakan *Escherichia coli* kira-kira 25 μm per detik atau 10 cm per jam. Flagel berguna untuk bergerak, melekat, dan konjugasi. *Escherichia coli* yang ada dalam saluran pencernaan dan menyebabkan diare yang berkepanjangan. *Escherichia coli* berada dalam medium yang mengandung sumber carbon maka akan mengubah derajat keasaman (pH) dalam medium menjadi asam dan akan membentuk gas sebagai hasil proses terurainya glukosa menjadi senyawa lain. *Escherichia coli* tumbuh baik dalam temperatur

antara 8°-48°C dan temperatur optimum 37° C *Escherichia coli* menghasilkan kolisin, yang dapat melindungi saluran pencernaan dari bakteri usus yang patogenik, dipakai sebagai indikator untuk menguji adanya pencernaan air oleh tinja (Melliawati 2009).

6. Toksin Bakteri

Toksin pada *Escherichia coli* dibagi menjadi dua yaitu, 1) *Escherichia coli* enterotoksigenik (ETEC) memproduksi toksin LT dan toksin ST. Toksin – toksin ini bekerja pada enterosit untuk menstimulasi sekresi cairan, menyebabkan terjadinya diare. 2) *Escherichia coli* enteroinvasif (EIEC) menyebabkan penyakit diare seperti disentri yang disebabkan *shigella*. Bakteri menginvasi sel mukosa, menimbulkan kerusakan sel dan terlepasnya lapisan mukosa. 3) *Escherichia coli* enteropathogenic (EPEC) merupakan *Escherichia coli* yang pertama dikenali sebagai pathogen primer yang menyebabkan wabah diare di tempat perawatan anak. Penempelan berhubungan dengan hilangnya mikrovili dan disebabkan oleh pengaturan ulang dari aktin sel penjamu. 4) *Escherichia coli* enterohemoragik (EHEC) memproduksi verotoksin yang bekerja pada sel vero in vitro. Diare berdarah yang disebabkan dapat dipersulit oleh hemolisis dan gagal ginjal akut. Organisme ini ditransmisikan ke manusia melalui buruknya kebersihan di tempat produksi makanan (Gillespie & Bamford 2008).

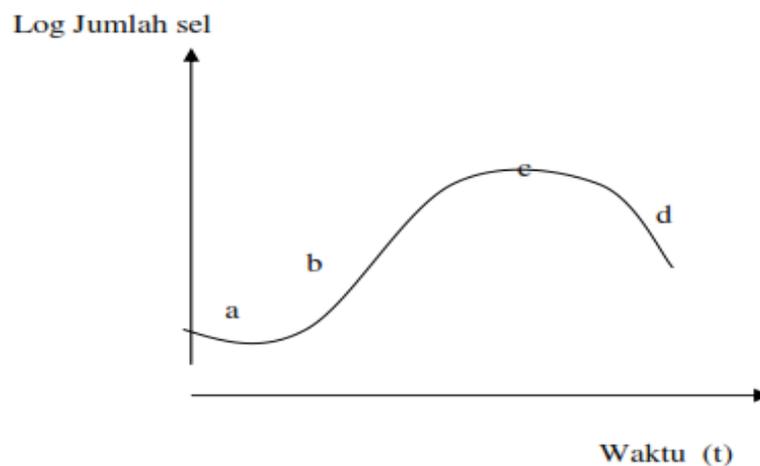
7. Sifat *Escherichia coli*

Bakteri uji *Escherichia coli* dapat diketahui sifat fisiologinya dengan inokulasi pada media-media yang dilakukan secara : mikroskopis, makroskopis, dan uji biokimia. Sifat fisiologinya yaitu *Escherichia coli* secara khas memberikan hasil positif pada uji indol, lisin dekarboksilase, dan fermentasi manitol serta menghasilkan gas dari glukosa. Suatu isolat dari urin dapat diidentifikasi dengan cepat sebagai *Escherichia coli* melalui gambaran hemolisis pada agar darah, morfologi koloni yang khas dengan aneka warna “berkilau” pada medium diferensial seperti agar EMB, dan uji bercak indol yang positif. Lebih dari 90% isolat *Escherichia coli* memberikan hasil yang positif untuk glukuronidase- β dengan menggunakan substrat 4-methylumbelliferyl- β -glucuronide (MUG). Isolat dari lokasi anatomis selain urine, dengan sifat yang

khas seringkali dapat dipastikan sebagai *Escherichia coli* dengan hasil pemeriksaan MUG yang positif (Jawetz *et al* 2013).

B. Pertumbuhan Bakteri

Jika sebuah medium cair dengan volume tetap diinokulasikan dengan sel-sel mikroba yang diambil dari sebuah kultur yang sebelumnya telah ditumbuhkan hingga jenuh dan jumlah sel-sel viable tiap millimeter ditentukan secara berkala dan ditempatkan pada kurva, akan diperoleh sebuah kurva yang sejenis yang ditunjukkan pada gambar 2. Fase-fase kurva pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan pada gambar 2 merupakan refleksi kejadian di dalam populasi sel, tidak pada sel secara individu. Tipe kultur semacam ini dikenal sebagai kultur kelompok/ruahan (*batch culture*). Kurva pertumbuhan yang lazim dapat diuraikan dalam empat fase (Jawetz *et al* 2012).



Gambar 2. Kurva Pertumbuhan Bakteri (Brock & Madigan 1991)

1. Fase lamban (*lag*)

Fase lamban merupakan periode saat sel-sel yang kekurangan enzim dan metabolit akibat kondisi kurang menguntungkan pada akhir riwayat kultur sel-sel tersebut sebelumnya, beradaptasi terhadap lingkungan barunya. Enzim-enzim dan zat antara dibentuk dan dikumpulkan hingga terdapat dalam konsentrasi yang memungkinkan pertumbuhan berlanjut (Jawetz *et al* 2012).

Jika sel-sel diambil dari medium yang sama sekali berbeda, sel-sel tersebut secara genetis sering tidak mampu tumbuh di medium yang baru. Pada kasus seperti ini, dapat terjadi fase lamban yang berkepanjangan yang menunjukkan lamanya periode yang diperlukan bagi beberapa muatan dalam inokulum untuk memperbanyak diri secara adekuat hingga mencapai pertambahan jumlah bersih yang cukup untuk terlihat (Jawetz *et al* 2012).

2. Fase eksponensial

Selama fase eksponensial, sel-sel berada dalam keadaan setimbang. Materi sel yang baru disintesis dalam laju yang konstan, tetapi materi baru itu sendiri bersifat katalitik, dan massanya bertambah secara eksponensial. Hal ini berlanjut hingga terjadinya satu atau dua hal: satu atau lebih nutrient dalam medium telah habis, atau produk metabolik toksik terkumpul dan menghambat pertumbuhan. Bagi organisme-organisme aerob, nutrient yang menjadi terbatas biasanya adalah oksigen. Saat konsentrasi melebihi $1 \times 10^7/\text{mL}$ (untuk bakteri), laju pertumbuhan akan menurun, kecuali ditambahkan oksigen ke dalam medium, baik dengan cara agitasi atau didesak atau dengan membuat gelembung udara. Saat konsentrasi bakteri mencapai $4-5 \times 10^9/\text{mL}$, laju difusi oksigen tidak dapat memenuhi kebutuhan, bahkan pada medium yang diberi udara sekalipun, dan pertumbuhan melambat secara progresif (Jawetz *et al* 2012).

3. Fase stationer puncak

Pada akhirnya, kehabisan nutrient atau akumulasi produk toksik akan menyebabkan pertumbuhan untuk terhenti sepenuhnya. Namun, pada sebagian besar kasus, terjadi pergantian sel pada fase stationer: terjadi kehilangan sel yang lamban melalui kematian yang diimbangi oleh pembentukan sel-sel baru melalui pertumbuhan dan pembelahan sel. Saat hal ini terjadi, hitung sel total bertambah secara perlahan meskipun hitung sel viable tetap konstan (Jawetz *et al* 2012).

4. Fase penurunan : Fase kematian

Setelah suatu periode dalam fase stationer, yang bervariasi sesuai dengan organisme dan kondisi kultur, laju kematian meningkat hingga mencapai tingkat seimbang. Pada kebanyakan kasus, laju kematian sel lebih lambat dari laju pertumbuhan secara eksponensial. Setelah sebagian besar sel mati, laju kematian

sering menurun secara drastis sehingga terdapat sejumlah kecil sel yang masih hidup dan dapat bertahan selama berbulan-bulan, bahkan bertahun-tahun. Bertahanya sel-sel ini pada sebagian kasus mungkin mencerminkan pergantian sel, beberapa sel tumbuh menggunakan nutrient yang dilepaskan dari sel yang mati dan melisis (Jawetz *et al* 2012).

C. Metode

1. Sterilisasi

Sterilisasi merupakan suatu tindakan untuk membebaskan alat dan media dari mikroba. Cara sterilisasi yang umum dilakukan meliputi sterilisasi secara fisik yaitu pemanasan basah dan kering, penggunaan sinar bergelombang pendek seperti sinar-X, sinar α , sinar gamma dan sinar UV. Sterilisasi secara kimia yaitu dengan penggunaan desinfektan, larutan alcohol, larutan formalin. Sterilisasi secara mekanik yaitu dengan menggunakan saringan atau filter untuk bahan yang akan mengalami perubahan atau penguraian akibat pemanasan tinggi atau tekanan tinggi (Darmandi 2008). Bahan atau pelarut yang digunakan dalam mikrobiologi harus dalam keadaan steril, artinya pada bahan atau peralatan tersebut tidak didapatkan mikroba yang tidak diharapkan kehadirannya, baik yang akan mengganggu atau merusak media ataupun mengganggu kehidupan dalam proses yang sedang dikerjakan (Suriawiria 2005).

Media yang digunakan disterilisasi terlebih dahulu dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Gelas ukur dan beaker glass disterilkan dengan oven pada suhu 170°C - 180°C selama 2 jam, sedangkan alat – alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung. Sterilisasi inkas menggunakan formalin (Denyer *et al* 2004).

2. Teknik penanaman dari suspensi

Menurut Pradhika (2008), ada beberapa teknik yang dapat digunakan untuk melakukan isolasi mikrobial, yaitu :

Teknik penanaman ini merupakan lanjutan dari pengenceran bertingkat. Pengambilan suspensi dapat diambil dari pengenceran mana saja tapi biasanya

untuk tujuan isolasi (mendapatkan koloni tunggal) diambil beberapa tabung pengenceran terakhir.

2.1. Spread Plate (agar tabur ulas). *Spread plate* adalah teknik menanam dengan menyebarkan suspensi bakteri di permukaan agar, agar diperoleh kultur murni. Prosedur kerjanya adalah suspensi cairan diambil sebanyak 0,1 ml dengan mikropipet kemudian teteskan diatas permukaan agar yang telah memadat. Trigalski kemudian dibakar diatas bunsen dan didinginkan beberapa detik. Kemudian suspensi diratakan dengan menggosokannya pada permukaan agar , penyebaran akan lebih efektif bila cawan ikut diputar.

2.2. Pour Plate (agar tuang). Teknik ini memerlukan agar yang belum padat dan dituang bersama suspensi bakteri ke dalam cawan petri dan dihomogenkan lalu dibiarkan memadat. Hal ini akan menyebabkan sel-sel bakteri tidak hanya terdapat pada permukaan agar saja tapi juga di dalam atau dasar agar sehingga bisa diketahui sel yang dapat tumbuh dipermukaan agar yang kaya O₂ dan di dalam agar yang tidak banyak begitu banyak mengandung O₂. Prosedur kerjanya adalah petridish, tabung pengenceran yang akan ditanam dan media padat yang masih cair disiapkan. Kemudian 1 ml suspensi bakteri diteteskan secara aseptis ke dalam cawan kosong. Lalu medium yang masih cair dituang ke dalam petridish lalu petridish di putar membentuk angka 8 agar suspensi bakteri dan media homogen, kemudian diinkubasi.

Teknik *Spread Plate* bakteri diteteskan sebanyak 0,1 ml dan pada *pour plate* diteteskan sebanyak 1 ml karena *spread plate* bertujuan untuk menumbuhkan dipermukaanya saja, sedangkan *pour plate* membutuhkan ruang yang lebih luas untuk penyebarannya sehingga diberikan lebih banyak dari pada *spread plate*.

3. Teknik Penanaman dengan Goresan (*Streak*)

Teknik goresan bertujuan untuk mengisolasi mikroorganisme dari campurannya atau meremajakan kultur ke dalam medium baru.

3.1. Goresan Sinambung. Prosedur kerja goresan sinambung adalah inokulum loop (ose) disentuhkan pada koloni bakteri dan gores secara kontinyu sampai setengah permukaan agar. Lalu petridish diputar 180° dan dilanjutkan

goresan sampai habis. Goresan sinambung umumnya digunakan bukan untuk mendapatkan koloni tunggal, melainkan untuk peremajaan ke cawan atau medium baru.

3.2. Goresan T. Prosedur kerja goresan T adalah petridish dibagi menjadi 3 bagian menggunakan spidol dan daerah tersebut diinokulasi dengan streak zig-zag. Ose dipanaskan dan didinginkan, lalu distreak zig-zag pada daerah berikutnya.

3.3. Goresan Kuadran (*Streak quadrant*). Hampir sama dengan goresan T, namun berpola goresan yang berbeda yaitu dibagi empat. Daerah 1 merupakan goresan awal sehingga masih mengandung banyak sel mikroorganisma. Goresan selanjutnya dipotongkan atau disilangkan dari goresan pertama sehingga jumlah semakin sedikit dan akhirnya terpisah-pisah menjadi koloni tunggal.

4. Esterifikasi

Reaksi esterifikasi adalah suatu reaksi antara asam karboksilat dan alkohol membentuk ester. Turunan asam karboksilat membentuk ester asam karboksilat. Ester asam karboksilat ialah suatu senyawa yang mengandung gugus $-CO_2 R$ dengan R dapat berupa alkil maupun aril. Esterifikasi dikatalisis asam dan bersifat dapat balik (Fessenden 1981).

Ester dihasilkan apabila asam karboksilat dipanaskan bersama alkohol dengan bantuan katalis asam. Katalis ini biasanya adalah asam sulfat pekat. Terkadang juga digunakan gas hidrogen klorida kering, tetapi katalis-katalis ini cenderung melibatkan ester-ester aromatik (yakni ester yang mengandung sebuah cincin benzen) (Clark 2007).

5. Saponifikasi

5.1. Pengertian Saponifikasi. Saponifikasi adalah reaksi yang terjadi ketika minyak atau lemak dicampur dengan larutan alkali, dengan kata lain saponifikasi adalah proses pembuatan sabun yang berlangsung dengan mereaksikan asam lemak dengan alkali yang menghasilkan sintesa dan air serta garam karbonil (sejenis sabun). Ada dua produk yang dihasilkan dalam proses ini, yaitu sabun dan gliserin. Secara teknik, sabun adalah hasil reaksi kimia antara

fatty acid dan alkali. *Fatty acid* adalah lemak yang diperoleh dari lemak hewan dan nabati (Prawira 2010).

5.2. Prinsip Saponifikasi. Reaksi saponifikasi tidak lain adalah hidrolisis basa suatu ester dengan alkali (NaOH atau KOH). Range atom C di atas mempengaruhi sifat-sifat sabun seperti kelarutan, proses emulsi, dan pembasahan. Sabun murni terdiri dari 95% sabun aktif dan sisanya adalah air, gliserin, garam dan kemurnian lainnya. Semua minyak atau lemak pada dasarnya dapat digunakan untuk membuat sabun. Lemak merupakan campuran ester yang dibuat dari alkohol dan asam karboksilat seperti asam stearat, asam oleat, dan asam palmitat. Lemak padat mengandung ester dari gliserol dan asam palmitat, sedangkan minyak seperti minyak zaitun mengandung ester dari gliserol asam oleat (Fessenden 1982).

6. Metilasi

Metilasi adalah proses penggantian suatu gugus dengan gugus metal (-CH₃) (Gladwin 2008). Pada polisakarida, terjadi substitusi gugus hydrogen dengan gugus metil dalam metilasi (Cui 2005).

Reaksi metilasi mempunyai peran penting pada proses biosintesis beberapa senyawa endogen, seperti norepinefrin, epinefrin, dan histamin serta untuk proses bioinaktivasi obat. Koenzim yang terlibat pada reaksi metilasi adalah S-adenosil-metionin (SAM). Reaksi ini dikatalis oleh enzim metiltransferase yang terdapat dalam sitoplasma dan mikrosom (Siswandono & Soekardjo 2000).

7. Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses penyarian senyawa kimia yang terdapat didalam bahan alam atau berasal dari dalam sel dengan menggunakan pelarut dan metode yang tepat. Sedangkan ekstrak adalah hasil dari proses ekstraksi, bahan yang diekstraksi merupakan bahan alam. (Ditjen POM 1986).

7.1. Pengertian Ekstrak. Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian sehingga memenuhi baku yang telah ditentukan (Ditjen POM 1995).

Pemilihan pelarut yang akan digunakan dalam ekstraksi dari bahan mentah obat tertentu berdasarkan pada daya larut maksimum zat aktif dan seminimum mungkin zat tidak aktif serta zat yang tidak diinginkan juga tergantung pada tipe preparat farmasi yang diperlukan (Ansel 1989). Farmakope Indonesia menetapkan untuk proses penyarian sebagai cairan penyari digunakan air, etanol-air, dan eter. Penyarian pada pembuatan obat tradisional masih terbatas pada penggunaan cairan penyari air, etanol atau etanol-air.

7.2. Pelarut. Pemilihan pelarut yang sesuai merupakan faktor penting dalam proses ekstraksi. Pelarut yang digunakan adalah pelarut yang dapat menyari sebagian besar metabolit sekunder yang diinginkan dalam simplisia (Depkes 2008). Cairan pelarut yang baik adalah murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, selektif yaitu hanya menarik zat berkhasiat yang dikehendaki, tidak mempengaruhi zat berkhasiat (Depkes 1986). Cairan pelarut yang digunakan dapat berupa air, etanol, air etanol, metanol atau pelarut lain. Cairan pelarut dengan menggunakan air diperlukan bahan pengawet yang diberikan pada awal penyarian yang bertujuan untuk mencegah timbulnya kapang (Depkes 1986)

Air digunakan sebagai pelarut polar dan digunakan sebagai cairan penyari karena murah, mudah diperoleh, stabil, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, tidak beracun dan alamiah. Air melarutkan garam alkaloid, minyak menguap, glikosida, tannin, gula, gom, pati, protein, enzim, lilin, lemak, pectin, zat warna dan asam organik (Depkes 1986). Selain itu air dapat melarutkan asam amino dan polifenol (Mardiyaningsih & Resmi 2014).

D. Media

1. Pengertian Media

Media merupakan bahan untuk menumbuhkan mikroorganisme, dimana mikroorganisme dapat diletakkan di atas maupun di dalam media. Media tumbuh bakteri mengandung air, karbon, energi, mineral, faktor tumbuh dan keasaman (pH). Keasaman atau pH pada media tumbuh bakteri sangat penting untuk kerja

enzim dari bakteri tersebut. Bakteri dapat tumbuh baik pada pH 7 (Hardioetomo 1985).

Media yang digunakan dalam mikrobiologi harus memiliki syarat-syarat yaitu harus mengandung unsur-unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan biakan mikroba. Media juga harus mempunyai tekanan osmosis, tegangan permukaan dan pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba, steril, tidak mudah ditumbuhi mikroba lain yang tidak diharapkan dan tidak bersifat toksik (Suriawiria 1986).

2. Macam-macam Media

Menurut konsistensinya media dapat dibedakan menjadi medium cair, medium padat dan medium setengah padat. Pertama, medium cair seperti kaldu nutrient atau kaldu glukosa dapat digunakan untuk berbagai keperluan seperti perbiakan organism dalam jumlah besar, penelaahan fermentasi dan berbagai macam uji. Kedua, medium padat, dapat ditumbuhkan bahan pematat ke dalam medium kaldu. Biasanya digunakan untuk mengamati penampilan atau morfologi koloni dan mengisolasi biakan murni. Ketiga, medium setengah padat, digunakan untuk mneguji ada tidaknya motilitas dan kemampuan fermentasi. Medium setengah padat mengandung gelatin ataupun agar-agar namun konsentrasi lebih kecil daripada medium padat (Hardioetomo 1985).

3. Klasifikasi Media

Klasifikasi media berdasarkan fungsinya dibedakan sebagai berikut : Pertama, media umum, yaitu media yang dapat dipergunakan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan satu atau lebih kelompok mikroba secara umum. Contoh nutrient agar. Kedua, media pengaya (*enriched medium*), yaitu media yang dipergunakan terhadap suatu jenis mikroba untuk tumbuh dan berkembang lebih cepat. Contoh media pengaya adalah *MacConkay*. Ketiga, media selektif (*selective medium*), yaitu media yang hanya dapat ditumbuhi oleh satu atau lebih jenis mikroba tertentu tetapi dapat menghambat atau mematikan untuk jenis-jenis lainnya. Contoh dari media selektif adalah BSA (*Bismuth Sulfite Agar*) digunakan untuk mengisolasi bakteri salmonella typhi dari tinja (Radji 2002). Keempat, media diferensial yaitu media yang dipergunakan untuk pertumbuhan mikroba

tertentu serta penentuan sifat-sifatnya. Media diferensial memudahkan perbedaan koloni bakteri yang diinginkan dari koloni lain yang tumbuh pada lempeng media yang sama. Agar darah adalah media yang mengandung sel darah merah untuk mengidentifikasi species bakteri yang menghancurkan sel darah merah. Kelima, media penguji (*assay medium*), yaitu media yang dipergunakan untuk pengujian senyawa atau benda tertentu dengan bantuan mikroba. Contoh media penguji yaitu Muller Hinton agar. Keenam, media enumerasi, yaitu media yang dipergunakan untuk menghitung jumlah mikroba pada suatu bahan, contoh media penghitung yaitu PCA (Suriawiria 2005).

E. Kromatografi Gas

Kromatografi adalah cara pemisahan campuran yang didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen campuran tersebut diantara dua fase, yaitu fase diam (*stationary*) dan fase bergerak (*mobile*). Fase diam dapat berupa zat padat atau zat cair, sedangkan fase bergerak dapat berupa zat cair atau gas. Dalam kromatografi fase bergerak dapat berupa gas atau zat cair dan fase diam dapat berupa zat padat atau zat cair.

Analisis kromatografi gas telah digunakan dalam berbagai bidang seperti farmasi, industri, minyak, klinik, forensik dan makanan. Kromatografi gas adalah suatu metode pemisahan dinamis dan identifikasi semua senyawa organik yang mudah menguap secara kualitatif dan kuantitatif. Sampel berupa gas dapat langsung diambil dengan penyuntik (*syringe*), sedangkan untuk sampel padat harus diekstraksi atau dilarutkan terlebih dahulu dalam suatu pelarut sehingga dapat diinjeksikan ke dalam sistem kromatografi gas (Gandjar 2007).

1. Prinsip Kromatografi Gas

Prinsip kromatografi gas merupakan teknik pemisahan senyawa yang mudah menguap dan stabil terhadap panas, bermigrasi melalui kolom yang mengandung fase diam dengan kecepatan yang tergantung pada rasio distribusinya.

Solut akan terelusi berdasarkan pada peningkatan titik didihnya. Fase gerak berupa gas yang mengelusi solut dari ujung kolom lalu menghantarkan ke

detektor. Penggunaan suhu yang meningkat (berkisar 50° – 350° C) bertujuan untuk menjamin solut akan menguap dan cepat terelusi. Jenis kromatografi untuk minyak ikan adalah kromatografi gas-cair. Dimana fase diam yang digunakan adalah cairan yang diikatkan pada suatu pendukung sehingga solut akan terlarut dalam fase diam, dengan mekanisme sorpsi-nya adalah partisi. Sedangkan kromatografi gas-padat mekanisme sorpsi-nya adalah adsorpsi (Gandjar 2007).

2. Komponen Alat Kromatografi Gas

Komponen utama kromatografi gas adalah sebagai berikut (Gandjar 2007):

2.1. Fase gerak. Fase gerak dalam kromatografi gas berfungsi membawa solut ke kolom. Syarat gas pembawa yang dapat digunakan adalah tidak reaktif, murni (karena berpengaruh pada detektor) dan dapat disimpan dalam tangki bertekanan tinggi (merah untuk hidrogen, abu untuk nitrogen). Gas pengangkut harus memenuhi persyaratan :

- Harus inert ; tidak mudah bereaksi dengan cuplikan, cuplikan pelarut dan mineral dalam kolom.
- Murni, mudah diperoleh dan murah.
- Sesuai/cocok untuk detector.
- Harus mengurangi difusi gas.

Gas-gas yang sering dipakai adalah : helium atau argon. Gas tersebut sangat baik, tidak mudah terbakar, tetapi sangat mahal. Penggunaan helium efektif untuk mengurangi pelebaran pita. Konduktivitas panas gas-gas tersebut tinggi dan molekulnya kecil. Berdasarkan alasan faktor ekonomi atau harga maka H_2 dan N_2 digunakan sebagai gas pengangkut. H_2 mudah terbakar, sehingga harus berhati-hati dalam pemakaiannya. Hal ini disebabkan kualitas dari gas-gas tersebut berbeda-beda dari Negara satu dengan Negara lain, maka cara yang baik sebelum gas tersebut digunakan harus dikeringkan terlebih dahulu. Pengeringan dilakukan dengan menggunakan *molecular sieve*. Pengeringan gas pengangkut akan menjamin hasil yang dapat diulang (Sastrohamidjojo 1985).

2.2. Ruang suntik sampel. Ruang suntik atau inlet berfungsi sebagai tempat penghantaran sampel ke dalam aliran gas pembawa. Penyuntikan sampel dapat dilakukan secara manual atau secara otomatis tergantung jumlah sampel

yang digunakan. Pelarut sampel yang dipilih adalah memiliki sifat yang berbeda dengan sampel yang digunakan seperti etil eter, alkohol dan keton. Cairan dan zat padat yang mudah menguap dapat langsung disuntikkan namun dilarutkan terlebih dahulu ke dalam pelarut organik. Dalam kasus tertentu penyuntikkan langsung ke dalam kolom dapat dilakukan, teknik ini digunakan untuk senyawa-senyawa yang mudah menguap yang dikhawatirkan jika melalui lubang suntik akan terjadi peruraian senyawa karena suhu tinggi.

2.3. Kolom. Kolom merupakan komponen sentral pada kromatografi gas. Kolom adalah tempat terjadinya pemisahan yang didalamnya terdapat fase diam. Fase diam yang digunakan juga beragam yaitu bersifat non polar, polar atau semi polar. Jenis fase diam menentukan urutan elusi komponen-komponen dalam campuran.

2.4. Detektor. Detektor berfungsi sebagai sensor elektronik pengubah sinyal gas pembawa dan komponen didalamnya menjadi sinyal elektronik untuk menganalisis data secara kualitatif maupun kuantitatif terhadap komponen terpisah diantara fase diam dan fase gerak. Kromatogram merupakan hasil pemisahan fisik komponen-komponen kromatografi gas yang disajikan oleh detektor sebagai deretan puncak luas terhadap waktu. Kromatografi gas yang digabung dengan instrumen seperti GC/FT-IR/MS maka kromatogram akan disajikan dalam bentuk lain. Minyak ikan yang di analisis dengan kromatografi gas yang digabung dengan detektor spektrometer massa mampu memberikan informasi data struktur kimia senyawa yang belum diketahui dan mampu memonitor ion tunggal atau beberapa ion di dalam analit. Sehingga batas batas ion akan ditingkatkan.

F. Analisis

1. Metode analisis Asam lemak bakteri *Escherichia coli*

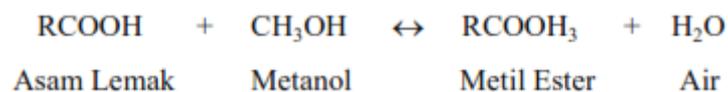
Analisis kromatografi gas untuk Asam lemak dari ekstraksi bakteri *Escherichia coli*.

2. Kondisi analisis :

Analisis dilakukan dengan menggunakan alat kromatografi gas yang dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala. Detektor ionisasi nyala memungkinkan untuk rentang dinamis yang besar dan memberikan sensitivitas yang baik. Analisis dilakukan secara isothermal pada suhu 170°C- 270°C pada 5°C per menit. Analisis berikutnya, peningkatan balistik 300° C yang memungkinkan pembersihan kolom selama 2 menit. Hidrogen merupakan gas pembawa, nitrogen merupakan gas inert, dan udara digunakan sebagai pendukung nyala ionisasi. (Sasser M 2006).

G. Landasan Teori

Escherichia coli merupakan bakteri flora normal pada saluran cerna, yang dapat menyebabkan infeksi atau diare sedang sampai berat pada saluran cerna manusia. Bakteri ini termasuk dalam *family Enterobacteriaceae* yang dapat hidup dalam usus besar manusia dan hewan, dalam tanah dan dalam air (jawetz *et al* 2012). Komponen penyusun bakteri *Escherichia coli* diantaranya adalah air 70, Asam Nukleat (DNA dan RNA), Nukleotida, Protein, Asam Amino, polisakarida 3, Lipid, Ion Anorganik dan penyusun lainnya (Watson JD 1972). Diantara komponen-komponen penyusun bakteri *Escherichia coli* dapat diidentifikasi dengan menggunakan kromatografi gas. Asam lemak pada lipid inilah yang akan diidentifikasi dengan menggunakan kromatografi gas, tetapi asam lemak pada dasarnya zat yang tidak dapat menguap, sedangkan syarat zat agar bisa diidentifikasi dengan kromatografi gas adalah zat tersebut mampu menguap, sehingga perlu dilakukannya derivatisasi pada asam lemak tersebut, sehingga bisa dianalisis dengan menggunakan kromatografi gas.



Gambar 3. Proses Esterfikasi Asam lemak

Pada kurva pertumbuhan bakteri *E.coli* dijelaskan ada 4 fase yang merupakan refleksi kejadian di dalam populasi sel. Pertumbuhan bakteri dalam

biak statik akan mengikuti kurva pertumbuhan. Jika bakteri ditanam dalam suatu larutan biak, maka bakteri akan terus tumbuh sampai salah satu faktor mencapai minimum dan pertumbuhan menjadi terbatas. Pertumbuhan biak bakteri dengan mudah dapat dinyatakan secara grafik dengan logaritma jumlah sel hidup terhadap waktu. Suatu kurva pertumbuhan punya bentuk sigmoid dan dapat dibedakan dalam beberapa tahap pertumbuhan. Tahap *lag* yang mencakup interval waktu antara saat penanaman dan saat tercapainya kecepatan pembelahan maksimum, lamanya tahap *lag* ini terutama tergantung dari biak wal, umur bahan yang ditanam dan juga dari sifat larutan biak. Tahap eksponensial, pada tahap pertumbuhan eksponensial terciri oleh kecepatan pembelahan maksimum yang konstan kecepatan pembelahan diri sepanjang tahap *lag* bersifat spesifik untuk tiap jenis bakteri dan tergantung lingkungan. Tahap stationer dimulai jika sel-sel sudah tidak tumbuh lagi. Kecepatan pertumbuhan tergantung dari kadar substrat, menurunnya kecepatan pertumbuhan sudah terjadi ketika kadar substrat berkurang sebelum substrat habis terpakai. Masa bakteri yang dicapai pada tahap stationer dinamakan hasil atau keuntungan.

Kromatografi adalah cara pemisahan campuran yang didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen campuran tersebut diantara dua fase, yaitu fase diam (*stationary*) dan fase bergerak (*mobile*). Fase diam dapat berupa zat padat atau zat cair, sedangkan fase bergerak dapat berupa zat cair atau gas. Dalam kromatografi fase bergerak dapat berupa gas atau zat cair dan fase diam dapat berupa zat padat atau zat cair.

Analisis kromatografi gas telah digunakan dalam berbagai bidang seperti farmasi, industri, minyak, klinik, forensik dan makanan. Kromatografi gas adalah suatu metode pemisahan dinamis dan identifikasi semua senyawa organik yang mudah menguap secara kualitatif dan kuantitatif. Sampel berupa gas dapat langsung diambil dengan penyuntik (*syringe*), sedangkan untuk sampel padat harus diekstraksi atau dilarutkan terlebih dahulu dalam suatu pelarut sehingga dapat diinjeksikan ke dalam sistem kromatografi gas (Gandjar 2007).

Kromatografi gas ini juga digunakan untuk ekstraksi simultan dan transesterifikasi lipid pada bakteri, bakteri yang digunakan bakteri *Micrococcus*

ureae, *Gaffkya tetragena*, *Escherichia freundii*, *E. coli*, *Aerobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes* (*K. pneumoniae*), *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Pasteurella tularensis*, *Bacillus subtilis* var. *niger*, dan *B. Anthracis* (Abel et al 1963). Alasan-alasan inilah, kromatografi kemudian menjadi pilihan utama dalam membantu mengatasi permasalahan dalam dunia bioteknologi, farmasi, klinik dan kehidupan manusia secara umum.

Metode yang digunakan dalam pengujian adalah dengan menggunakan metode kromatografi gas. Prinsip kerja metode ini adalah membandingkan waktu inkubasi pertumbuhan bakteri *E.coli* dimana terdapat lima waktu (masing-masing 6 jam, 12 jam, 24 jam, 36 jam dan 48 jam), dari masing-masing perbedaan waktu inkubasi bakteri *Eschericia coli*, selanjutnya hasil biakan bakteri ini akan diproses dengan beberapa tahap, Saponifikasi, selanjutnya dilakukan metilasi, kemudian ekstraksi, hasil ekstraksi ini menjadi sampel yang akan di analisis dengan menggunakan kromatografi gas, dan kemudian dilakukan kalibrasi dan pembacaan puncak/peak hasil analisis identifikasi bakteri *E.coli* dari kromatografi gas.

H. Hipotesis

Berdasarkan permasalahan yang ada dapat disusun hipotesis dalam penelitian ini yaitu :

Pertama, kromatografi gas mampu menganalisis senyawa yang dihasilkan oleh bakteri *Eschericia coli* pada waktu pertumbuhan kurang dari 24 jam.

Kedua, diketahui perbedaan pola kromatogram dari senyawa yang dihasilkan oleh bakteri *Eschericia coli* dalam berbagai variasi waktu inkubasi.

Ketiga, kromatografi gas memberikan hasil waktu inkubasi bakteri yang optimal dalam mengidentifikasi pertumbuhan bakteri *Eschericia coli*.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 yang di peroleh dari Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Sampel

Sampel merupakan sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Pemilihan bakteri ini mempertimbangkan komponen penyusun sel pada bakteri, kondisi bakteri yang sangat sering dijumpai pada penyakit yang menginfeksi manusia.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah hasil identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dalam berbagai tingkat optimasi waktu menggunakan kromatografi gas FAME.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini diklasifikasikan menjadi 3, yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkontrol. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dalam berbagai tingkat optimasi waktu inkubasi.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah hasil identifikasi pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dari pola kromatogram yang dihasilkan dalam berbagai tingkat waktu inkubasi.

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah medium, waktu, metode ekstraksi asam lemak bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, kondisi peneliti,

kondisi laboratorium yang digunakan termasuk alat-alat dan bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah bakteri biakan yang diperoleh dari laboratorium Universitas Setia Budi.

Kedua, biakan dari bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah biakan bakteri yang dikultur pada media agar *MacConkey*.

Ketiga, variasi opstimasi waktu adalah waktu yang digunakan dalam kultur bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan variasi waktu 6 jam, 12 jam, 24 jam, 36 jam dan 48 jam pada suhu 35°C.

Keempat, hasil biakan kultur bakteri dari masing-masing variasi waktu tumbuh pada media agar *MacConkey*.

Kelima, hasil biakan yang tumbuh pada masing-masing waktu tumbuh dilakukan pengambilan dari media.

Keenam, proses saponifikasi dari hasil biakan yang yang ditumbuhkan pada waktu tumbuh tertentu yang telah diambil dari media.

Ketujuh, proses metilasi adalah proses metilasi bakteri hasil dari dilakukan proses saponifikasi

Kedelapan, proses ekstraksi adalah proses ekstraksi bakteri *Escherichia coli* dari proses metilasi sebelumnya.

Kesembilan, asam lemak dari bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah asam lemak yang diisolasikan komponen selnya dari proses saponifikasi, metilasi, dan ekstraksi.

Kesepuluh, Pembacaan peak dan kalibrasi adalah pembacaan peak dan kalibrasi hasil dari ekstraksi yang dilakukan pengujian melakukan kromatografi gas. Diteliti kromatogram yang menunjukkan waktu paling efisien.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan utama yang digunakan peneliian ini adalah Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, sedangkan bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah

hidroksida sodium, methanol, asam hidroklorida metil alkohol, heksan, metil tert-butyl eter, dan air.

Media agar yang digunakan pada penelitian ini adalah media agar *MacConkey* yang digunakan untuk mengkultur bakteri *Escherichia coli*.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah tabung reaksi, rak tabung, kapas alkohol, cawan petri, jarum inokulum / jarum ose, pipet tetes, pembakar spiritus dan instrumen kromatografi gas.

D. Jalannya Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut :

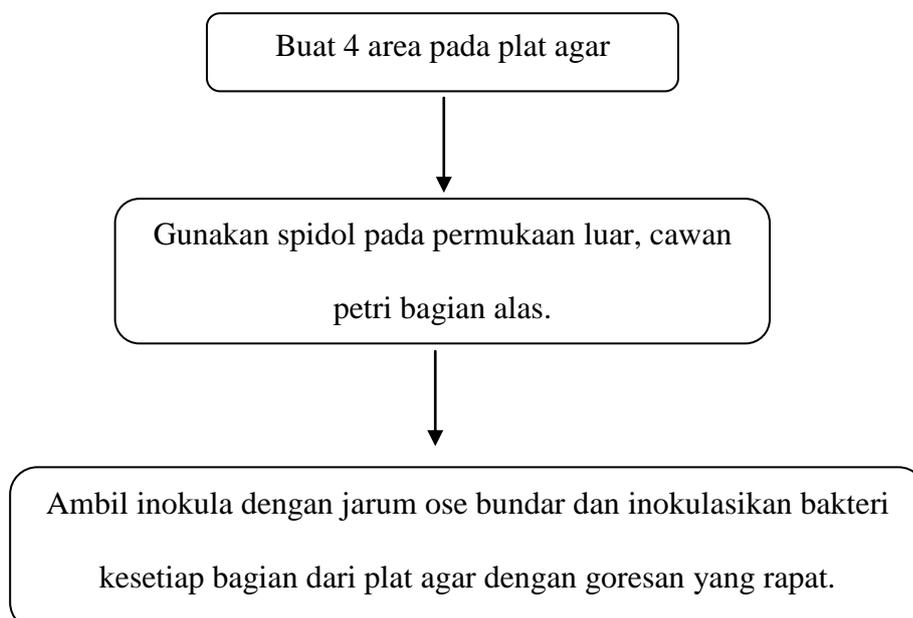
1. Sterilisasi Alat

Alat dan bahan penelitian disterilisasi dan suspensi kuman, agar terhindar dari senyawa atau mikroorganisme lain yang mungkin dapat mempengaruhi hasil penelitian, dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15-20 menit. Alat-alat yang digunakan ditunggu sehingga mencapai suhu kamar dan kering.

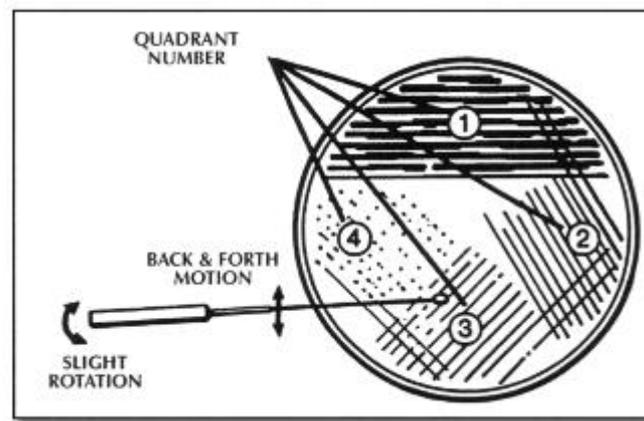
2. Pembuatan plat agar

Media *MacConkey* cair 50°C sebanyak 20ml dituangkan kedalam cawan petri dan biarkan memadat.

3. Kultur Bakteri



Inkubasikan semua media yang telah di inokulasi kedalam inkubator 35°C dan selama waktu masing- masing 6 jam, 12 jam, 24 jam, 36 jam dan 48 jam.



(Sumber : Sasser M 2006)

Gambar 4. Proses Kultur Bakteri dengan metode *quadrant streak*

4. Uji identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

4.1. Identifikasi koloni *E.coli* secara makroskopis. Suspensi bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922 diinokulasikan pada media selektif Endo agar (EA) dengan cara gores, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif jika penampakan koloni yang terjadi berwarna seperti kilat logam (Kartika dkk. 2014).

4.2. Identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Gram. Suspensi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 diambil dari media biakan menggunakan jarum ose yang telah dipijarkan, lalu diratakan diatas *object glass*. Larutan zat warna kristal violet diteteskan sebanyak 2 sampai 3 tetes dan didiamkan selama 3 menit. Preparat diberi aquadest mengalir dan dikeringkan. Larutan lugol

diteteskan dan dibiarkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Larutan alkohol diberikan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Larutan safranin diberikan selama 3 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Minyak imersi diberikan diatas kaca preparat bakteri. Kaca preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10x100 kali. Hasil positif dari *Escherichia coli* bila sel bakteri bewarna merah dan berbentuk batang.

4.3. Identifikasi bakteri uji secara biokimia. Identifikasi uji biokimia menggunakan media SIM, KIA, LIA, dan Sitrat.

Pertama, media SIM (*Sulfida Indol Motility*). Biakan murni diinokulasi pada permukaan media dengan cara diinokulasi tusukan kemudia diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini berfungsi untuk mengetahui terbentuknya sulfide, indol, dan motilitas bakteri. Uji sulfide positif bila media berwarna hitam, uji indol positif bila terbentuk warna merah setelah ditambah dengan reagen Erlich A dan B, uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media. Hal ini menunjukkan adanya pergerakan dari bakteri yang diinokulasikan, yang berarti bahwa bakteri ini memiliki flagella (Anonim. 2008). Maka pada bakteri *Escherichia coli* akan didapatkan hasil sulfida negatif, indol positif, dan motilitas positif, dengan hasil -++.

Kedua, media KIA (*Kliger's Iron Agar*) merupakan media yang berbentuk padat, keadaan miring, warna merah, dan berfungsi untuk uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa) serta *sulfide*. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara diinokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. pengamatan dilakukan pada bagian lereng, dasar, ada tidaknya gas dan terbentuk warna hitam pada media. Pada bagian miring, jika bakteri dapat memfermentasi laktosa dan sakarosa, warna media berubah menjadi kuning (Raihana, 2011). Maka pada bakteri *Escherichia coli* akan didapatkan hasil warna akan berubah menjadi kuning dan tidak ada terbentuknya sulfide, dengan hasil A/A S-.

Ketiga, media LIA (*Lysin Iron Agar*) merupakan media yang mengandung glukosa, asam amino lisin, dan brom kresol ungu sebagai pH indikator, serta

natrium tiosulfat. Media ini digunakan untuk menguji deaminasi lisin yang dilakukan dengan cara inokulasi biakan bakteri secara tusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. pengamatan dilakukan pada bagian lereng serta terbentuknya warna hitam pada media menunjukkan uji sulfida positif (Haryani 2012). Maka pada bakteri *Escherichia coli* akan didapatkan hasil warna akan berubah menjadi ungu dan tidak terbentuknya sulfide, dengan hasil K/K S-.

Keempat, media *Citrate*. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Media *citrate* merupakan media yang digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan *citrate* sebagai sumber karbon tunggal (Jawetz *et al* 1986). Bakteri yang memanfaatkan sitrat sebagai sumber akan menghasilkan natrium karbonat yang bersifat alkali, sehingga dengan adanya indikator *brom thymol blue* menyebabkan warna biru pada media (Suyati 2010). Maka pada bakteri *Escherichia coli* akan didapatkan hasil warna tetap hijau yang berarti negatif.

5. Pembuatan suspensi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

Bakteri uji *Escherichia coli* yang telah biakan pada media diambil satu ose kemudian dimasukkan tabung yang diisi media BHI (*Brain Heart Infusion*) cair, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, selanjutnya diencerkan dengan aquadest steril sampai didapat kekeruhan yang sama dengan standart 0,5 Mc. *Farland* (Bonang & Koeswardono 1982).

6. Penyiapan Reagen

Terdapat beberapa reagen yang digunakan untuk memisahkan asam lemak dari lemak / lipid bakteri:

Reagen 1 : Tahap Saponifikasi, 45 g sodium hidroksida, 150 metanol dan 150 ml air suling.

Reagen 2 : Tahap Metilasi, 325 ml Natrium Metanolat. Menetapkan pH solusi 1,5 dan sebagai metilasi asam lemak. Asam lemak metil ester dengan kelarutan rendah.

Reagen 3 : Ekstraksi, 200 ml heksan dan 200 ml metil tert-butyl eter. Ini akan digunakan untuk mengekstrak asam lemak bakteri menjadi fase organik untuk di lakukan analisis dengan kromatografi gas.

Reagen 4 : Pembersihan Sampel, 10,8 g sodium hidroksida dilarutkan dalam 900ml air suling. Prosedur ini untuk mengurangi kontaminasi pada injeksi port liner, kolom dan detektor.

7. Penyiapan Sampel Ekstraksi

Terdapat lima tahap penyiapan ekstrak untuk dilakukan uji kromatografi gas, diantaranya :

Pengambilan bakteri : jarum inokulum digunakan untuk mengambil kurang lebih 40 mg sel bakteri dari kuadran ke tiga, sel bakteri tersebut ditempatkan pada tabung kultur yang bersih

Saponifikasi : 1,0 ml reagen 1 ditambahkan pada tabung yang terdapat sel bakteri. Tutup secara aman tabung tersebut, di vortex sebentar dan panaskan pada water bath selama 5 menit, pada sesekali waktu vortex tabung secara cepat sekitar 5-10 detik dan kembalikan dalam waterbath hingga selesai selama 30 menit pemanasan.

Metilasi : tambahkan 2 ml reagen ke dua. Digojog sebentar kembali tabung, setelah itu panaskan kurang lebih 10 menit pada suhu 80°C.

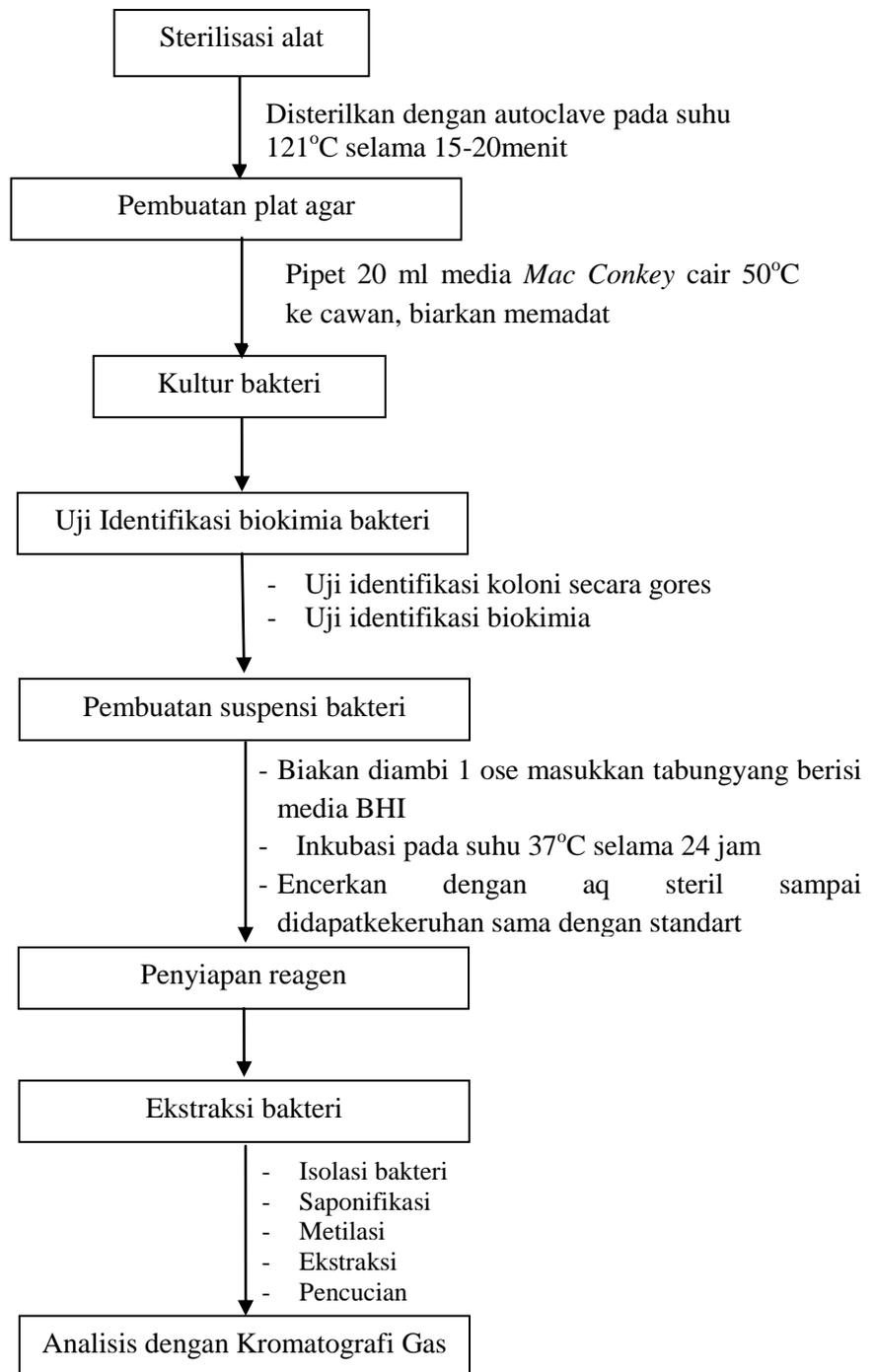
Ekstraksi : tambahkan 1,25 ml reagen ke tiga pada tabung yang telah dingin dan ditutup kembali dan sesekali dihomgenkan selama 10 menit, ambil fase bawah nya dan biarkan fase bagian atasnya.

Pencucian : sekitar 3 ml reagen 4 ditambahkan ke fase organik pada tabung, dan tabung di putar putar selama 5 menit, diikuti pembukaan tabung dan pipet 2 / 3 fase organik, dan sisanya di pindahkan pada tabung vial GC dan tutup, dan ekstrak sel bakteri siap dianalisis

8. Analisis dengan Kromatografi Gas

Analisis dilakukan dengan menggunakan alat kromatografi gas yang dilengkapi dengan detector ionisasi nyala. detektor ionisasi nyala memungkinkan untuk rentang dinamis yang besar dan memberikan sensitivitas yang baik. Analisis dilakukan secara isothermal pada suhu 170°C- 270°C pada 5°C per menit.

Analisis berikutnya, peningkatan balistik 300°C yang memungkinkan pembersihan kolom selama 2 menit. Hidrogen merupakan gas pembawa, nitrogen merupakan gas inert, dan udara digunakan sebagai pendukung nyala ionisasi. Ekstrak yang telah disiapkan di analisis dengan menggunakan kromatografi gas, dan dilakukan identifikasi bakteri Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.



Gambar 5. Skema Jalannya Penelitian

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Sterilisasi

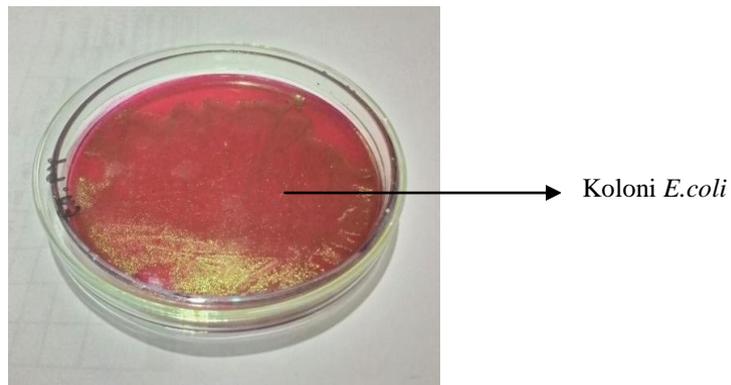
Sterilisasi digunakan untuk mensterilkan bahan atau peralatan yang digunakan dari mikroba. Cawan petri, pipet, tabung reaksi, labu erlenmeyer, beaker glass, dan gelas ukur disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 170-180°C selama 1-2 jam. Alat penanam bakteri (ose/sengkelit) disterilkan dengan pembakaran, yaitu dengan membakarnya sampai pijar dengan lampu spiritus. Media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15-30 menit.

2. Pembuatan plat agar

Media *MacConkey* cair sebanyak 120 ml dituangkan pada 6 cawan petri masing-masing 20 ml dan dibiarkan memadat, serta disimpan dalam lemari es.

3. Hasil identifikasi bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922

3.1. Identifikasi koloni bakteri uji secara makroskopis. Identifikasi bakteri *E. coli* secara makroskopis dilakukan dengan menginokulasikan biakan murni pada media *Endo Agar* (EA) yang kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil pengamatan menunjukkan koloni berwarna merah dengan kilat logam hal ini disebabkan laktosadimetabolisme oleh *E. coli* sehingga menghasilkan aldehid dan asam. Aldehid akan melepaskan fuksin dari senyawa fuksin-sulfat kemudian akan mewarnai koloni merah dan akan terlihat berwarna seperti kilatan logam (Kartika dkk. 2014). Identifikasi koloni pada *E. coli* ATCC 25922 dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 6. Makroskopis *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media EA.

3.2. Identifikasi mikroskopis bakteri uji dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri uji *E. coli* tersebut termasuk golongan Gram negatif. Bakteri uji *E. coli* diperoleh hasil dengan sel bakteri berwarna merah dengan bentuk bacilli. Kristal violet (Gram A) ditetaskan sehingga menyebabkan Kristal violet akan mewarnai seluruh permukaan sel bakteri Gram positif dan Gram negatif. Mordant (lugol iodine/Gram B) ditetaskan sehingga menyebabkan terbentuknya ikatan dengan iodine yang akan meningkatkan afinitas zat warna oleh sel bakteri, seluruh bakteri akan berwarna biru. Gram C (alkohol) ditetaskan sehingga menyebabkan terbentuknya pori-pori pada Gram negatif yang memiliki banyak lapisan lemak (lipid larut dalam etanol), sehingga kompleks Kristal violet-iodine tidak menempel pada dinding sel bakteri, hal ini menyebabkan sel Gram negatif akan kehilangan warna birunya. Pewarna safranin (Gram D) ditetaskan sehingga sel Gram negatif yang awalnya kehilangan warna akan memiliki warna yang kontras yaitu merah. Identifikasi mikroskopis *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan pengecatan Gram dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 7. Mikroskopis *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media EA.

3.3. Identifikasi bakteri uji secara biokimia. Uji biokimia bakteri merupakan suatu cara untuk mengidentifikasi suatu biakan murni bakteri hasil inokulasi melalui sifat-sifat fisiologisnya. Identifikasi uji biokimia pada bakteri *E. coli* menggunakan medium yang terdiri dari, *Sulfida Indol Motility* (SIM), *Kliger's Iron Agar* (KIA), *Lysin Iron Agar* (LIA), dan citrate. Hasil identifikasi uji biokimia pada bakteri *E. coli* ATCC 25922 dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel1. Identifikasi uji biokimia pada *Escherichia coli* ATCC 25922

Pengujian	Hasil	Pustaka
SIM	---	---
KIA	A/AG S(-)	A/AG S(-)
LIA	K/K S(-)	K/K S(-)
CITRAT	-	-

Keterangan:

SIM : Sulfida Indol Motilitas

KIA : Kliger Iron Agar

LIA : Lysine Iron Agar

A : Reaksi Asam

K : Reaksi Basa

G : Terbentuk gas

S : Terbentuk Sulfida (warna hitam)

Medium *Sulfida Indol Motilitas* (SIM) untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas. Pengujian SIM menunjukkan hasil sulfida negatif, artinya *E. coli* tidak dapat mereduksi thiosulfate sehingga tidak menghasilkan

hidrogen sulfida. Uji indol positif disebabkan bakteri *E. coli* membentuk indol dari tryptopan sebagai sumber karbon. Uji indol menunjukkan hasil positif setelah ditambahkan tiga tetes reagen erlich A dan B. Reagen erlich A dan B mengandung dimetilaminobenzaldehid dan akan menghasilkan cincin merah pada permukaan media karena indol akan bereaksi dengan dimetilaminobenzaldehid sehingga membentuk rosindol yang berwarna merah. Uji motilitas diperoleh hasil positif, ditunjukkan dengan adanya penyebaran pertumbuhan bakteri *E. coli* pada media SIM.

Medium *Kliger Iron Agar* (KIA) untuk mengetahui terjadinya fermentasi karbohidrat, ada tidaknya gas dan pembentukan sulfida. Hasil yang diperoleh yaitu A/AGS(-), A/A artinya pada lereng dan dasar media berwarna kuning, hal ini menunjukkan bahwa *E. coli* mampu memfermentasi glukosa dan laktosa. Medium *Kliger Iron Agar* (KIA) mengandung laktosa 1% dan glukosa 0,1% dan *phenol red* (dalam suasana asam). *Kliger Iron Agar* (KIA) juga mengandung sodium thiosulfate yaitu suatu substrat penghasil H₂S. Huruf G artinya terdapat gas sehingga menyebabkan media terangkat, S(-) artinya uji hidrogen sulfida negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media KIA, endapan hitam ini terbentuk dari hydrogen sulfida yang akan bereaksi Fe⁺⁺. Hidrogen sulfida terbentuk karena bakteri mampu mendesulfurasi asam amino dan methion.

Medium *Lysin Iron Agar* (LIA) untuk mengetahui deaminasi lisin dan sulfida. Pengujian dengan LIA menunjukkan hasil K/KS (-), K/K artinya pada lereng dan dasar media berwarna ungu, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin tetapi mendekarboksilasi lisin yang menyebabkan reaksi basa (warna ungu) di seluruh media, S(-) artinya uji H₂S negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media *Lysin Iron Agar* (LIA)

Medium Citrat untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Pengujian citrat menunjukkan hasil negatif. Hal ini menunjukkan bahwa *E. coli* tidak menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal, dalam medium Citrat terdapat indikator BTB (*Bromo Thymol Blue*) yang merupakan indikator pH, jika mikroba mampu menggunakan citrat, maka asam akan dihilangkan dari medium dari hijau menjadi biru. Berdasarkan hasil

pengamatan yang dilakukan menunjukkan hasil bahwa bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *E. coli* ATCC 25922. Hasil uji biokimia dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 8. Uji biokimia *Escherichia coli* ATCC 25922

Berdasarkan dari hasil pengujian identifikasi yang telah dilakukan menunjukkan bahwa bakteri yang diamati adalah *Escherichia coli* ATCC 25922.

Penelitian ini juga membandingkan pertumbuhan bakteri pada uji biokimia pada berbagai variasi waktu 6 jam; 12 jam; 24 jam; 36 jam dan 48 jam. Perbandingan hasil uji biokimia bakteri *E.coli* dapat dilihat pada Tabel 3 dibawah ini.

Tabel2. Perbandingan hasilidentifikasi uji biokimia pada *Escherichia coli*ATCC 25922

Pengujian	Hasil				
	6 jam	12 jam	24 jam	36 jam	48 jam
SIM	---	---	+++	+++	+++
KIA	A/AG(-) S(-)	A/AG S(-)	A/AG S(-)	A/AG S(-)	A/AG S(-)
LIA	K/K S(-)	K/K S(-)	K/K S(-)	K/K S(-)	K/K S(-)
CITRAT	-	-	-	-	-

4. Hasil pembuatan suspensi bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922

Pembuatan suspensi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 pada penelitian ini yaitu dengan mengambil 3 ose bakteri uji pada media agar dengan menggunakan kawat ose yang steril kemudian disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 5 ml medium *Brain Heart infusion* (BHI) dan di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Suspensi yang telah terbentuk disamakan tingkat kekeruhannya dengan standar *Mc Farland 3* (BaCl₂ 1,175% 0,3 ml dilarutkan H₂SO₄ 1% 9,7 ml).

5. Pelarut

Pelarut pada penelitian ini digunakan untuk proses pengambilan asam lemak bakteri sehingga dapat dilakukan analisis pada kromatografi gas, proses yang dilakukan diantaranya adalah proses saponifikasi, metilasi, ekstraksi, dan pencucian sampel. Pelarut pada proses saponifikasi berfungsi untuk membebaskan alkali gliserol yang terdapat pada sampel bakteri *E.coli* ATCC 25922. Pelarut proses metilasi berisi natrium metanolat yang memiliki pH solusi dibawah 1,5 agar dapat memetilasi asam lemak. Pelarut pada proses ekstraksi bertujuan untuk mengekstrak asam lemak bakteri menjadi fase organik sehingga dapat dilakukan analisis menggunakan kromatografi gas, dan pelarut pada prosedur pencucian sampel dimaksudkan untuk mengurangi kontaminasi pada injektor, kolom, dan detektor.

6. Penyiapan sampel asam lemak metil ester (*FAME*) bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922

Langkah pertama yang dilakukan pada penelitian ini adalah pengambilan/isolasi bakteri *E. coli* ATCC 25922 dengan menggunakan jarum inokulum untuk mengambil sel bakteri pada kuadran ke tiga, sel bakteri tersebut ditempatkan pada tabung kultur yang bersih, yang selanjutnya dilakukan proses saponifikasi dengan melakukan pemanasan menggunakan waterbath dengan suhu 100°C.

Metilasi merupakan proses yang dilakukan selanjutnya dengan melakukan pemanasan pada suhu 80° C, yang dilanjutkan proses ekstraksi dengan pemisahan fase bawah dari sampel yang terpisah, sedangkan fase atas didiamkan untuk dilakukan proses pencucian sampel yang bertujuan agar sampel yang diambil telah bersih dari senyawa lainnya, fase yang diambil adalah fase atas yang di pindahkan pada tabung vial GC, dan ekstrak sel bakteri siap dianalisis.

Proses penelitian dari pemisahan sampel diatas merupakan proses derivatisasi asam lemak bakteri *E.coli* menjadi asam lemak metil ester (*FAME*) dilakukan dengan cara esterifikasi. Tujuan dari metode esterifikasi ini adalah untuk meningkatkan batas deteksi dan meningkatkan daya uap sampel. Esterifikasi

pada penelitian ini dilakukan dengan mereaksikan Natrium hidroksida dengan metanol.

7. Hasil analisis asam lemak metil ester (*FAME*) bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan kromatografi gas

7.1. Pemilihan kondisi analisis asam lemak metil ester (*FAME*) bakteri pada kromatografi gas

7.1.1. Pemilihan suhu awal kolom untuk analisis asam lemak bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Pemilihan kondisi analisis perlu dilakukan untuk mendapatkan kondisi analisis asam lemak yang memiliki ketepatan, ketelitian dan pemisahan yang baik. Untuk identifikasi asam lemak bakteri sesuai dengan metode yang digunakan, kondisi analisis yang diadaptasi dari jurnal perlu dilakukan pengujian kembali karena kolom serta tipe alat yang digunakan berbeda. Perbedaan kolom akan mengakibatkan kondisi analisis berubah (Gandjar & Rohman 2007).

Kondisi analisis yang diharapkan adalah kondisi analisis yang dapat menghasilkan waktu retensi yang singkat serta pemisahan yang baik. Parameter yang digunakan untuk memilih kondisi analisis optimum adalah waktu retensi (t_R) area.

Suhu injektor dan suhu detektor pada metode analisis asam lemak bakteri ditetapkan 200°C dan 250°C. Penetapan suhu injektor harus diatur lebih tinggi daripada suhu kolom maksimum sehingga seluruh sampel dapat menguap segera setelah sampel disuntikkan. suhu detektor untuk detektor ionisasi nyala, suhu detektor harus diatas 100°C bertujuan untuk mencegah terjadinya kondensasi uap air sehingga mengakibatkan pengkaratan pada detektor ionisasi nyala atau penghilangan (penurunan) sensitivitasnya (Gandjar & Rohman 2007).

Proses pemilihan suhu awal kolom ini divariasikan 120, 140, 150, dan 170, dari keempat macam suhu ini kemudian ditetapkan suhu optimum untuk analisis, yaitu suhu awal kolom yang menghasilkan kromatogram dengan hasil pemisahan yang baik. Dari hasil percobaan, diperoleh kondisi analisis optimum untuk identifikasi asam lemak bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah suhu awal kolom 120°C.

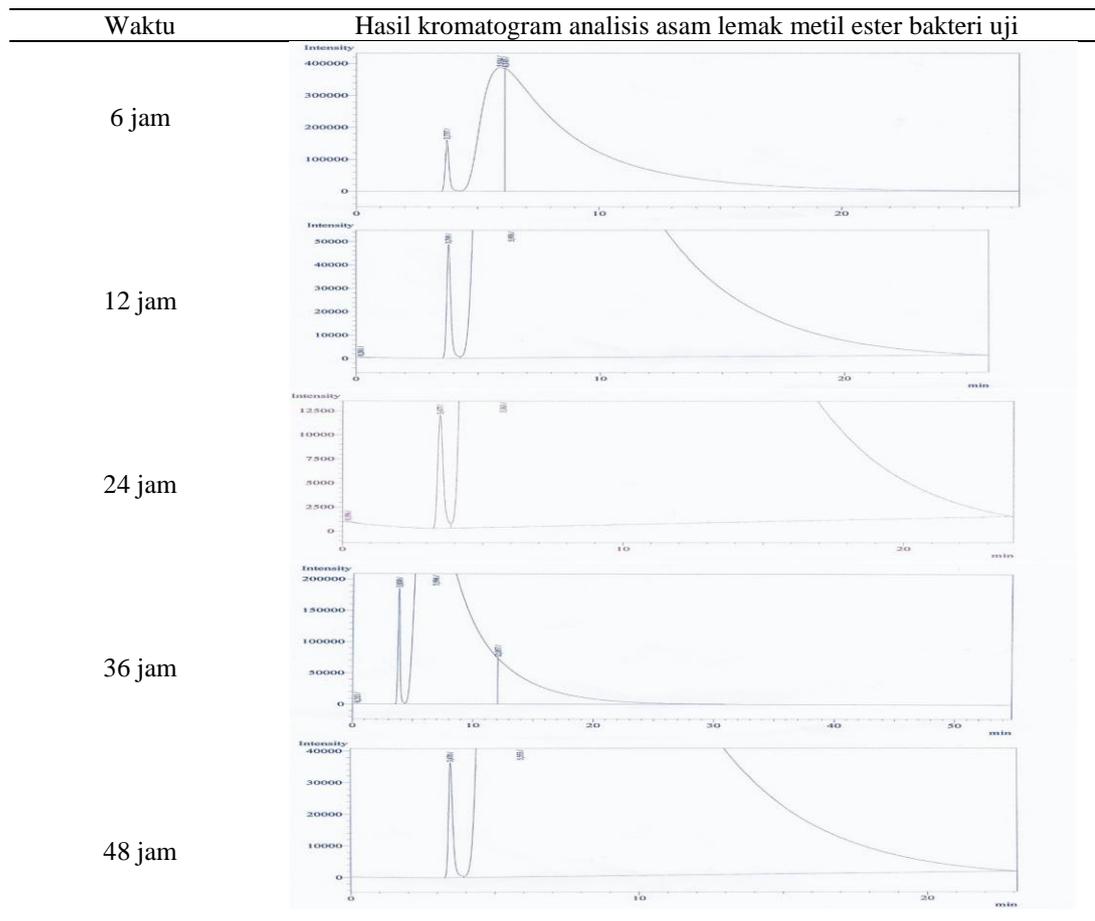
Berdasarkan percobaan memvariasikan suhu kolom terlihat bahwa semakin tinggi suhu kolom, maka waktu retensi asam lemak semakin cepat. hal ini disebabkan semakin tinggi suhu kolom, maka komponen sampel akan lebih cepat menguap dan terbawa oleh gas pembawa sehingga waktu kontak sampel dengan fase diam menjadi lebih cepat.

7.1.2. Pemilihan laju alir gas pembawa analisis asam lemak bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Proses analisis diperlukan juga pemilihan laju alir gas pembawa. Laju alir gas pembawa (N) divariasikan 100 ml/menit dan 140 ml/menit, pada percobaan memvariasikan laju alir gas pembawa terlihat bahwa semakin cepat laju alir gas, maka waktu retensi asam lemak semakin singkat. hal tersebut dapat dilihat dengan semakin cepat asam lemak keluar pada kromatogram.

Hasil percobaan laju alir gas yang digunakan untuk menghasilkan kondisi analisis optimum untuk analisis asam lemak bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah 100 ml/menit, maka kondisi analisis optimum untuk analisis asam lemak bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 ditetapkan pada suhu awal kolom 120°C. Suhu injektor dan detektor diatur pada suhu 200°C dan 230°C.

7.2. Hasil analisis sampel asam lemak metil ester bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan kromatografi gas. Analisis pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya asam lemak pada sampel. Uji pada penelitian ini dilakukan replikasi sebanyak tiga kali. Sampel dari bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 yang telah diesterifikasi dilakukan analisis pada kondisi analisis optimum, yaitu pada suhu awal kolom 120°C, kenaikan 10°C/menit hingga 240°C dan dipertahankan selama 20 menit, suhu injektor 200°C, suhu detektor 230°C, dan laju alir gas pembawa (N) 100 ml/menit.

Percobaan ini menghasilkan kromatogram dengan waktu retensi yang bervariasi. Analisis dilakukan dengan membandingkan hasil waktu retensi tiap variasi waktu inkubasi. Berdasarkan analisis didapatkan hasil uji waktu retensi dan luas area puncak diantaranya



**Gambar 9. Hasil Kromatogram analisis asam lemak metil ester
E.coli ATCC 25922**

Hasil kromatogram analisis variasi waktu inkubasi dengan masing-masing waktu 6 jam, 12 jam, 24 jam, 36, dan 48 jam menunjukkan waktu retensi yang berbeda-beda, didapatkan rata-rata dari masing-masing waktu inkubasi diantaranya 3,727 menit; 3,739 menit; 3,448 menit; 3,821; dan 3,457 menit. Tabel hasil waktu retensi dan area puncak kromatogram dapat di lihat pada gambar

Tabel3. Hasil waktu retensi dan luas area

No	Waktu Inkubasi jam ke-	Waktu Retensi	Area
1	6 jam	3,727	1742958.333
2	12 jam	3,739	456818.333
3	24 jam	3,448	2998405.000
4	36 jam	3,821	17080912.333
5	48 jam	3,457	771730.000

Perbedaan waktu retensi yang dihasilkan dipengaruhi oleh kurva pertumbuhan bakteri, dimana terdapat waktu optimal yang menyebabkan perbedaan jumlah hasil metabolit pada setiap fase yang dialami oleh pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 tersebut. Penguapan dari kandungan zat pada sampel juga diduga menjadi penyebab perbedaan waktu retensi dan luas area puncak dari hasil kromatogram.

Hasil identifikasi bakteri uji didapatkan dengan membandingkan dari beberapa uji identifikasi, diantaranya uji secara makroskopis/gores, mikroskopis, biokimia, dan menggunakan metode kromatografi gas. Dapat diketahui bahwa pada waktu 6 jam selain menggunakan metode kromatografi gas bakteri uji *E.coli* belum dapat diidentifikasi, sedangkan dengan metode kromatografi gas dapat diidentifikasi dengan ditandai munculnya puncak kromatogram.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengamatan dapat disimpulkan bahwa :

Pertama, Kromatografi gas mampu menganalisis asam lemak yang dihasilkan oleh bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 pada waktu inkubasi kurang dari 24 jam yaitu dalam waktu inkubasi 6 jam dan 12 jam.

Kedua, terdapat perbedaan pola kromatogram dari asam lemak yang dihasilkan oleh bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dalam berbagai variasi waktu inkubasi yang ditunjukkan dari hasil waktu retensi (t_R) dan luas area.

Ketiga, waktu inkubasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 yang paling optimal untuk dapat diidentifikasi asam lemaknya menggunakan kromatografi gas adalah waktu inkubasi 6 jam.

B. Saran

Perlunya dilakukan penelitian lebih lanjut dalam menganalisis asam lemak spesifik dari bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 menggunakan kromatografi gas-spektra massa /GC-MS.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts, Bruce. 2007. *Biologi Molekuler dari Walteyour*. NCBI.
- Abel, K., Deschmertzing, H.& Peterson, J.I. 1963. Classification of micro-organisms by analysis of chemical composition. I. feasibility of utilizing gas chromatography. *Journal of Bacteriology* 85,1039.
- Anief, Moh. 1995. *Perjalanan Dan Nasib Obat Dalam Badan*, Gadjah Mada Univ Press
- Ansel, C. H. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Edisi keempat. UI. Pres
- Ballesteros, I.M. 2012. *Intra- and inter Laboratory Evaluation of An Improfe Multiple- PCR Method for Detection and Typing of Salmonella*, Available from : <http://www.jidc.org/index.php/journal/article/viewFile/2445/728> [Accessed 7 Oktober 2016]
- Bonang Gerhard, S. Enggar dan Koeswardono. 1982. *Mikrobiologi Kedokteran*, P.T Gramedia, Jakarta.
- Campbell, Neil. A. 2008. *Biologi Edisi 8 Jilid I*. Jakarta: Erlangga.
- Campbell, Neil. A. 2010. *Biologi*. Jakarta: Erlangga
- Campbell, Reece and Mithcel. 1999. *Biology*. New York : Addison-Wesley Longman, inc.
- Creswell, J., Plano Clark, V. 2007. *Designing and Conducting Mixed Methods Research*. Thousand Oaks, CA: Sage
- Cui, S.W. 2005. *Structural Analysis of Polysaccharides*. Taylor & Francis Group, LLC.
- Darmadi. 2008. *Infeksi Nosokomial : Problematika Dan Pengendaliannya*. Jakarta: Penerbit Salemba Medika
- Dit jen POM.1986. *Sediaan Galenik*. Jilid II. Departemen Kesehatan RI.
- Dit jen POM.1995. *Farmakope Indonesia*. Edisi IV. Departemen Kesehatan RI. Jakarta.
- Depkes RI. 2008. *Profil Kesehatan Indonesia*. Jakarta.
- Dorland, Newman. 2002. *Kamus Kedokteran Dorland*. Edisi 29, Jakarta : EGC,1765
- Dwidjoseputro, D. 1987. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djambatan. Malang

- Entjang, Indan., 2003. *Mikrobiologi Dan Parasitologi Untuk Akademi Perawat Dan Sekolah Tenaga Kesehatan yang Sederajat*. PT. CITRA ADITIA BAKTI. Bandung.
- Fessenden dan Fessenden. 1982. *Kimia Organik* Jilid 1. Jakarta : Erlangga
- Gandjar, I.G., dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gillespie, Stephen dan Kathleen Bamford. 2008. *At a Glance Mikrobiologi Medis Dan Infeksi* Edisi Ketiga. Jakarta: Erlangga.
- Gladwin, R. 2008. Methylation. In *Encyclopedia of Cancer and Society*, Sage Publications. <http://www.rahulgladwin.com/docs/methylation.pdf>. Tanggal akses: 10 September 2016.
- Hadioetaomo, R.S. 1985. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek Teknik Dan Praktek Dasar Laboratorium*. PT Gramedia, Jakarta.
- Harold M. McNair, James M. Miller. 2002. *Basic Gas Chromatography*. John Wiley & Sons, INC
- Haryani, A. 2012. *Uji Efektifitas Daun Pepaya (Carica papaya) untuk pengobatan Infeksi Bakteri Aeromonas hydrophila Pada Ikan Mas Koki (Carassius auratus)*. Skripsi. Program Program Studi Sarjana Perikanan. Universitas Padjadjaran,
- Hiltunen R. 2002. *Review: Analysis Fatty Acid by Gas Chromatography, and Its Relevance to Research on Health and Nutrition*. Analytical Chimica Acta.
- Izydorczyk, M., Cui, S.W. 2005. *Polysaccharide Gums: Structures, Functional Properties, and Applications. Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications (Cui S.W., Ed.)*. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, pp. 263-307.
- Jawetz, E, J. Melnick. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: EGC
- Jawetz, E., Melbick, J.L., Adelberg, F.A., 2008. *Mikrobiologi Kedokteran*, Ed ke-25, Penerjemah; Nugroho AW, dkk, editor Adityaputri A, dkk. Jakarta: EGC. Terjemahan dari : Medical Microbiology.
- Jawetz, Melnick, Adelberg., 2012. *Jawetz, Melnick, And Adelberg 's medical Microbiology* Edisi 25. A. Adityaputri et al., eds., Jakarta
- Jutono, J. 1980. *Pedoman Praktikum Mikroiologi Umum Untuk Perguruan Tinggi*. Penerbit Departemen Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.

- Karsinah, Moehari LH. 1994. *Batang Negatif Gram. Di dalam Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran* Edisi Revisi oleh staf Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta: Binarupa Aksara.
- K. Abel, H. DeSchmertzing, J.I. Peterson. 1962. *Classification of Microorganisms By Analysis Of Chemical Composition. Feasibility Of Utilizing Gas Chromatography*. Division, MelPar, Inc., Falls Church, Virginia.
- Lambert, R.J.W., Hanlon, G.W., and Denyer, S.P. 2044. *The synergistic effect of EDTA/anti-microbial combinations on Pseudomonas aeruginosa*. J. Appl. Mic., 96. 244-253.
- Mackey B.M, Miles C.A, Parsons S.E, Seymour D.A. 1991. *Thermal denaturation of whole cells and cell components of Escherichia coli examined by differential scanning calorime*. Journal Of General Microbiology. AFRC Institute of Food Research, Bristol laboratory 137: 2361-2374.
- Mardyaningsih, Ana, Resmi Aini. 2014. *Pengembangan Potensi Ekstrak Daun Pandan Wangi(Pandanus amarillyfolius Roxb) Sebagai Agen Antibakteri*, Farmasi Poltekkes Bhakti Setya Indonesia. Yogyakarta.
- Melliawati, R. 2009. *E. coli dalam kehidupan manusia*. Biotrends/Vol.4/No.1/Th.2009
- Ngili, Y. 2009. *Biokimia: Struktur dan Fungsi Biomolekul*. Graha Ilmu, Yogyakarta.
- Palomo A., M.W. Grutzeck, M.T. Blanco. 1999. "Alkali-activated Fly Ashes Cement for the Future". Cement And Concrete Research, 29 (8): 1323-1329.
- Pankaj K.A., Hanhong B. 2014. *Identification of New Metabolites of Bacterial Transformation of Indole by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and High Performance Liquid Chromatography*. Hindawi 2014: 5 hlm.
- Pelczar, M.J. and E.C.S. Chan., 1998. *Dasar-dasar Mikrobiologi II*. Universitas Indonesia Press. Jakarta. 192 hal.
- Poedjadi, Anna. 2005. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia
- Poedjadi, Anna.1994. *Dasar – Dasar Biokimiawi*. Jakarta : penerbit UI
- Poedjadi, Anna.,F.M.Supriyanti. 2005. *Dasar-dasar Biokimia*. Bandung:UI-Press
- Pradhika, E. I. 2008. *Isolasi Mikroorganisme*. <http://ekmonsaurus.blogspot.com/2008/11/bab-4-isolasi-mikroorganisme.html/9> September 2016.

- Prawira. 2010. *Reaksi Saponifikasi Pada Proses Pembuatan Sabun*. Penebar Swadaya.Jakarta.
- Radji, Maksum.2010. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Jakarta:EGC
- Radji,M. 2011. *Mikrobiologi. Buku Kedokteran*. ECG. Jakarta.
- Raihana, Nadia. 2011. *Profil Kultur dan Uji Sensitifitas Bakteri Aerob dari Infeksi Luka Operasi Laparatomi di Bangsal Bedah RSUP Dr. M. Djamil Padang*. (Artikel). Universitas Andalas.
- Riccardo Villa, Marina Lotti, Pietro G.L. 2009. *Components of the E. coli envelope are affected by and can react to protein over-production in the cytoplasm*. Microbial cell factories. Biomed Central.
- Saenger , Wolfram. 2007. *Prinsip Struktur Asam Nukleat*. Springer-Verlag: New York.
- Sasser, M. 2006. *Bacterial identification by gas chromato-graphic analysis of fatty acids methyl esters (GC-FAME)*—MIDI technical note #101. MIDI, Inc., Newar.
- Sastrohamidjojo, Hardjono, Dr., 1985. *Analisis Kromatografi*. ITB. Yogyakarta.
- Siswandono dan B Soekardjo. 2000. *Kimia Medisinal*, edisi 2. Airlangga University Press : Surabaya.
- Sloane, Ethel. 2004. *Anatomi dan Fisiologi Untuk Pemula*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Suhara. 2008. *Dasar-Dasar Biokimia*. Bandung: Prisma Press
- Sumardjo, Damin. 2009. *Pengantar Kimia*. Jakarta : Penerbit Bku Kedokteran EGC
- Supardi, dan Sukamto. 1999. *Mikrobiologi Dalam Pengolahan Dan Keamanan Produk Pangan*. Bandung : Penerbit Alumni.
- Suriawiria, U., 2005. *Mikrobiologi Dasar*. Papas Sinar Sinanti, Jakarta.
- Suriawiria U. 1986. *Pengantar Biologi Umum*. Bandung: Angkasa.
- Suyanti R.D. 2010. *Strategi Pembelajaran Kimia*. Yogyakarta: Graha Ilmu
- Tatiana G, Igor S, Boris G. 2013. *Terahertz vibration spectroscopy of E. coli and molecular constituents: Computational modeling and experiment*.
- Watson, J.D. 1972. *Molecular biology of the gene*, 2nd ed., Philadelphia, PA : Saunders.

- Watson, James D. Tooze, John. Kurtz, David T. 1988. *DNA Rekombinan*. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Winarno, F. G. (1997). *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: Penerbit Gramedia.
- Yoshioka M, Kitamura M, Tamura Z. 1969. *Rapid Gas Chromatographic Analysis of Microbial Volatile Metabolites*. Japan, J, Microbial 13: 87-93.
- Yuwono. 2012. *Staphylococcus aureus dan Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. Palembang: Departemen Mikrobiologi FK Unsri.
- Zachary D Blount. 2015. *The unexhausted potential of E. coli*. eLIFE

LAMPIRAN

Lampiran 1. Foto Alat



A



B



C



D



E



F



G



H



I

Keterangan : A = Inkubator

B = Timbangan analitik

C = Autoklaf

D = Inkas

E = Vortex

F = Oven

G = Instrumen Kromatografi Gas

H = Spuit Kromatografi Gas

I = Sentrifuge

Lampiran 2. Foto Bahan



A

B

C



D

E

Keterangan : A = Media *MacConkey*

B = Metil Tert-butyl Eter

C = Metanol

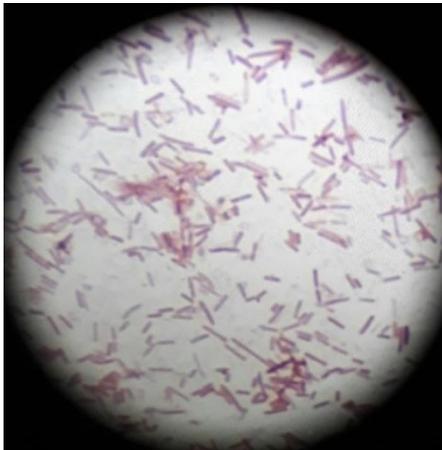
D = n-Hexan

E = Suspensi Bakteri *E.coli*

Lampiran 3. Hasil identifikasi bakteri *E. coli* ATCC 25922 secara makroskopis



Lampiran 4. Hasil identifikasi bakteri *E. coli* ATCC 25922 secara mikroskopis secara pewarnaan gram



Lampiran 5. Hasil identifikasi bakteri *E. coli* ATCC 25922 secara uji biokimia



Pertumbuhan 6 Jam



Pertumbuhan 12 jam



Pertumbuhan 24 Jam

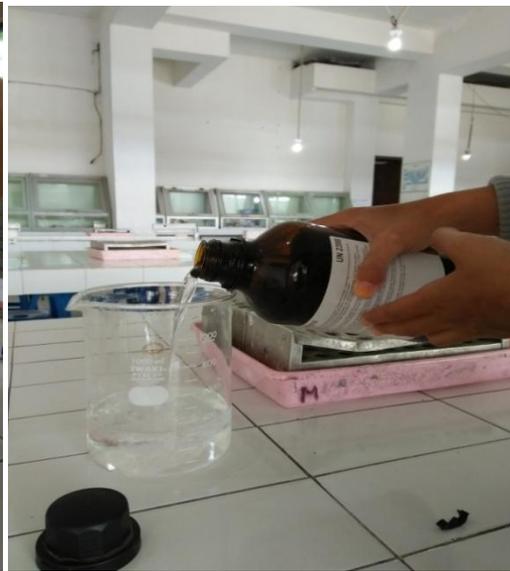


Pertumbuhan 36 jam



Pertumbuhan 48 Jam

Lampiran 6. Penyiapan reagen

**A****B****C****D**

**E**

Keterangan : A = Penyiapan Reagen Saponifikasi

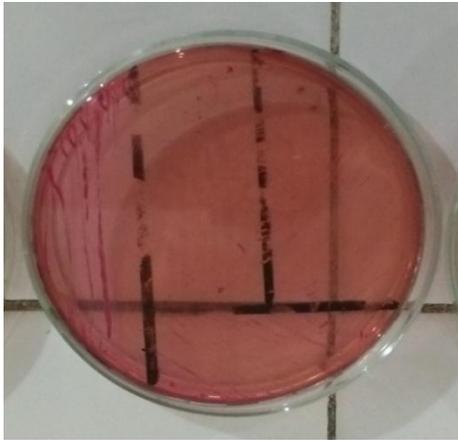
B = Penyiapan Reagen Metilasi

C = Penyiapan Reagen Ekstraksi

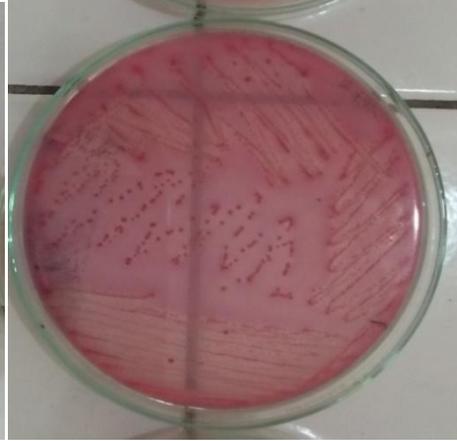
D = Penyiapan Reagen Pencucian

E = Reagen Saponifikasi, Metilasi, Ekstraksi, dan Pencucian

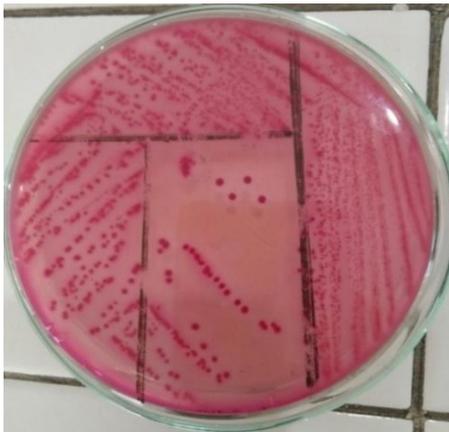
Lampiran 7. Kultur bakteri *E. coli* ATCC 25922 pada variasi waktu inkubasi



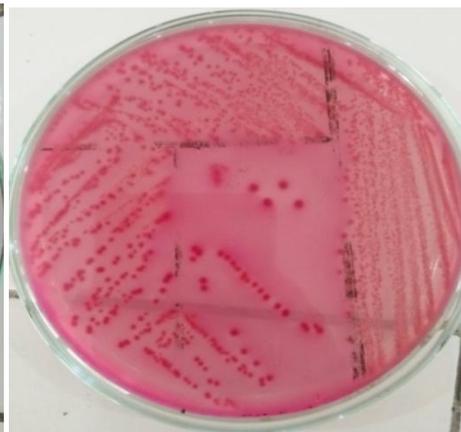
(waktu inkubasi 6 jam)



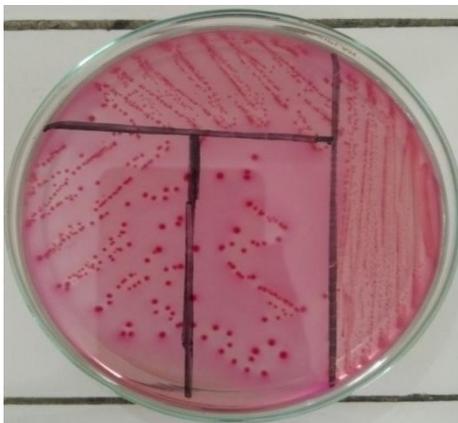
(waktu inkubasi 12 jam)



(waktu inkubasi 24 jam)

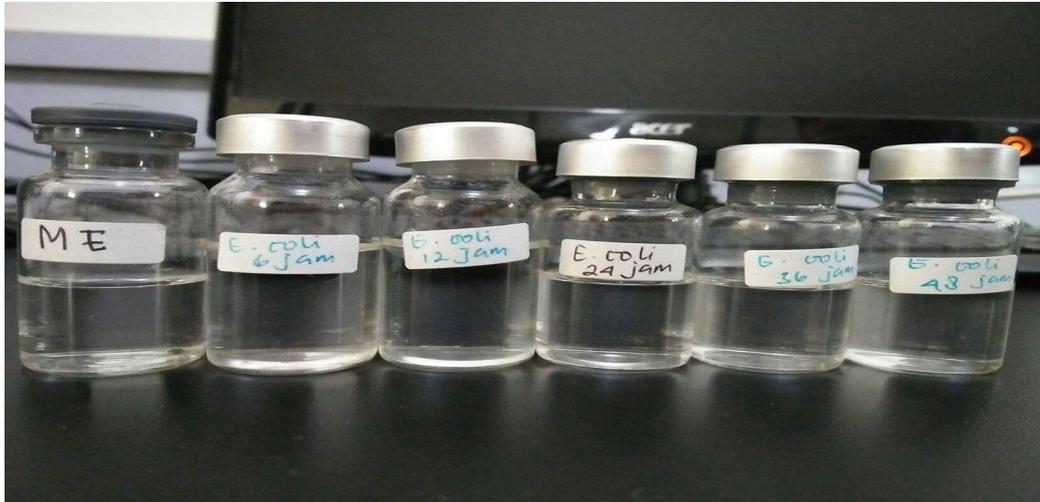


(waktu inkubasi 36 jam)



(waktu inkubasi 48 jam)

Lampiran 8. Sampel asam lemak metil ester bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922



Lampiran 9. Formulasi dan pembuatan media

1. *MacConkey Agar*

Pepton from casein	17,0 gram
Pepton from meat	3,0 gram
Laktosa	10,0 gram
Bile salts mixture	1,5 gram
Sodium chloride	5,0 gram
Neutral red	0,03 gram
Crystal violet	0,001 gram
Agar-agar	13,5 gram

Bahan-bahan diatas dialurtkan dalam Aquadest 1000 ml dan dilarutkan selama 15 menit, lalu dipanaskan hingga larut sempurna. Kemudian disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Media siap digunakan pada pH 7,1 ± 0,1 pada suhu 37°C (J. Hyg 1905).

2. *Brain Heart Infusion* (BHI)

Brain infusion	12,5 gram
Heart infusion	5,0 gram
Proteose peptone	10,0 gram
Glucose	2,0 gram
Sodium chloride	5,0 gram
di-sodium hydrogen phosphate	2,5 gram
Aquadest 1000 ml	

Reagen – reagen diatas dilarutkan dalam Aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian di sterilkan dengan autoclaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri pH 7,4 (Bridson 1998)

3. Formulasi dan pembuatan Endo Agar

Pepton from meat	10,0 gram
Di potassium hydrogen fosfat	3,5 gram
Laktosa	10,0 gram
Sodium sulfit	2,5 gram
FuchSION	0,4 gram
Agar – agar	12,5 gram
pH 7,4	

Reagen – reagen diatas dilarutkan dalam Aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian di sterilkan dengan autoclaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri.

4. *Sulfide indol motility* (SIM)

Pepton from casein	20 gram
Pepton from meat	6 gram
Ammonium Iron (II) citrate	0,2 gram
Sodium thiosulfate	0,2 gram

Agar – agar 0,2 gram

Aquadest ad 1000 ml, pH = 7,4

Bahan - bahan diatas dilarutkan dalam Aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian di sterilkan dengan autoclaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri (Bridson 1998).

5. *Klinger Iron Agar (KIA)*

Pepton from casein 15 gram

Pepton from meat 5 gram

Ammonium Iron (II) citrate 0,5 gram

Meat extract 3 gram

Yeast extract 3 gram

Sodium chloride 5 gram

Laktosa 10 gram

Glukosa 1 gram

Sodium thiosulfate 0,5 gram

Phenol red 0,024 gram

Agar – agar 12 gram

Aquadest ad 1000 ml, pH 7,4

Bahan - bahan diatas dilarutkan dalam Aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian di sterilkan dengan autoclaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri (Bridson 1998).

6. *Lysine Iron Agar (LIA)*

Pepton from casein 5 gram

Yeast extract 3 gram

Glukosa 1 gram

Lysine monohidrchloride 10 gram

Sodium thiosulfate 0,04 gram

Ammonium Iron (II) citrate	0,5 gram
Bromo cresol purple	0,02 gram
Agar – agar	12,5 gram
Aquadest ad 1000 ml, pH = 7,4	

Bahan - bahan diatas dilarutkan dalam Aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian di sterilkan dengan autoclaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri (Bridson 1998).

7. *Citrate Agar*

Ammonium hydrogen fosfat	1 gram
DI – potassium hydrogen fosfat	1 gram
Sodium chloride	5 gram
Magnesium sulfat	0,2 gram
Bromo thymol blue	0,08 gram
Agar – agar	12,5 gram
Aquadest ad 1000 ml, pH = 7,4	

Bahan - bahan diatas dilarutkan dalam Aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian di sterilkan dengan autoclaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri (Bridson 1998).

Lampiran 10. Perhitungan SD dan RSD

Rata-rata Waktu Inkubasi 6 Jam

No	Waktu Retensi	Area
1.000	3.613	1138913.000
2.000	3.737	1865876.000
3.000	3.830	2224086.000
Rata-rata	3.727	1742958.333

Rata-rata Waktu inkubasi 12 jam

No	Waktu Retensi	Area
1.000	3.527	701267.000
2.000	3.795	596296.000
3.000	3.895	72892.000
Rata-rata	3.739	456818.333

Rata-rata Waktu inkubasi 24 jam

No	Waktu Retensi	Area
1.000	3.400	6730058.000
2.000	3.468	2101175.000
3.000	3.477	163982.000
Rata-rata	3.448	2998405.000

Rata-rata Waktu inkubasi 36 jam

No	Waktu Retensi	Area
1.000	3.795	596296.000
2.000	3.830	2224086.000
3.000	3.839	48422355.000
Rata-rata	3.821	17080912.333

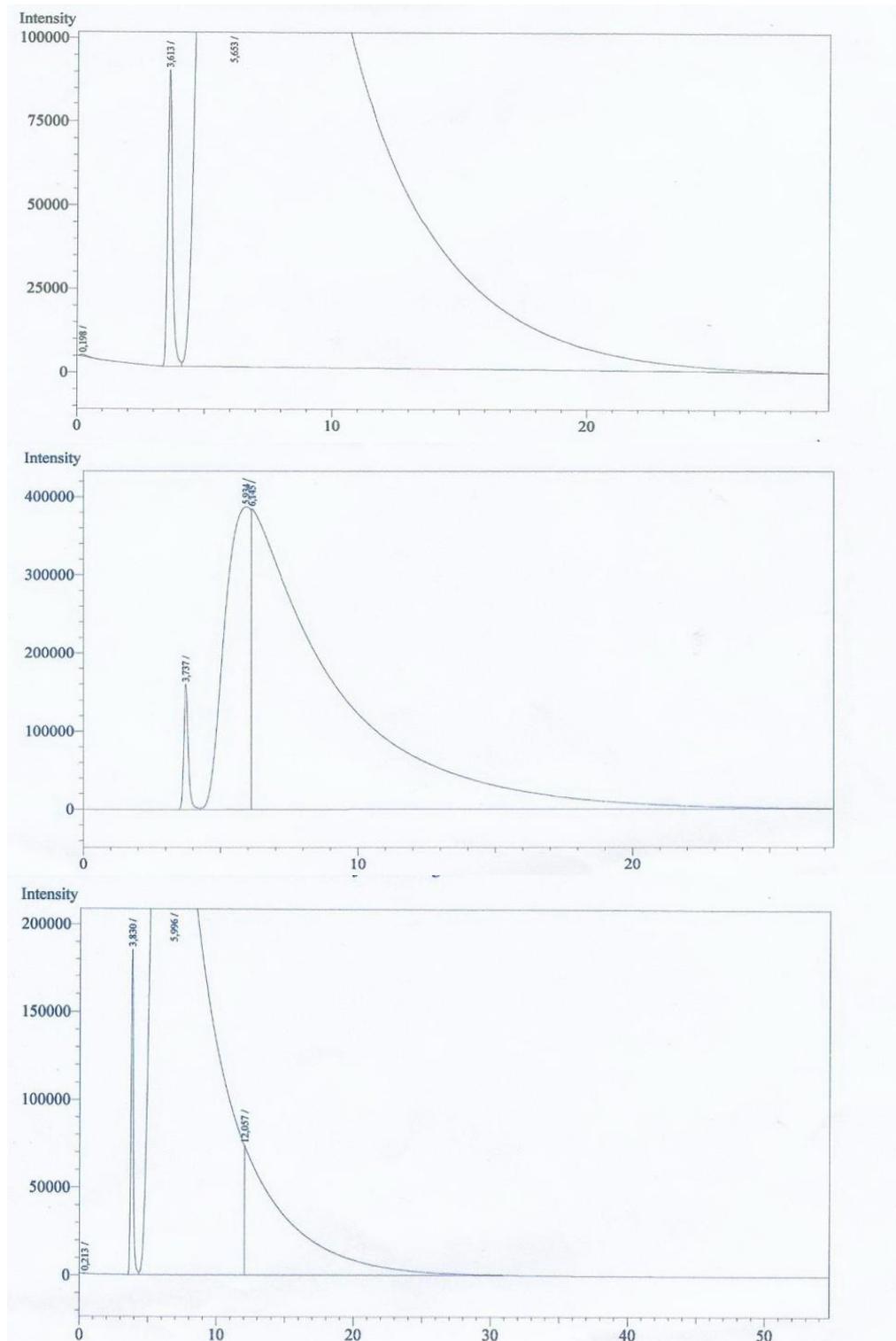
Rata-rata Waktu inkubasi 48 jam

No	Waktu Retensi	Area
1.000	3.438	1140441.000
2.000	3.462	775795.000
3.000	3.470	398954.000
Rata-rata	3.457	771730.000

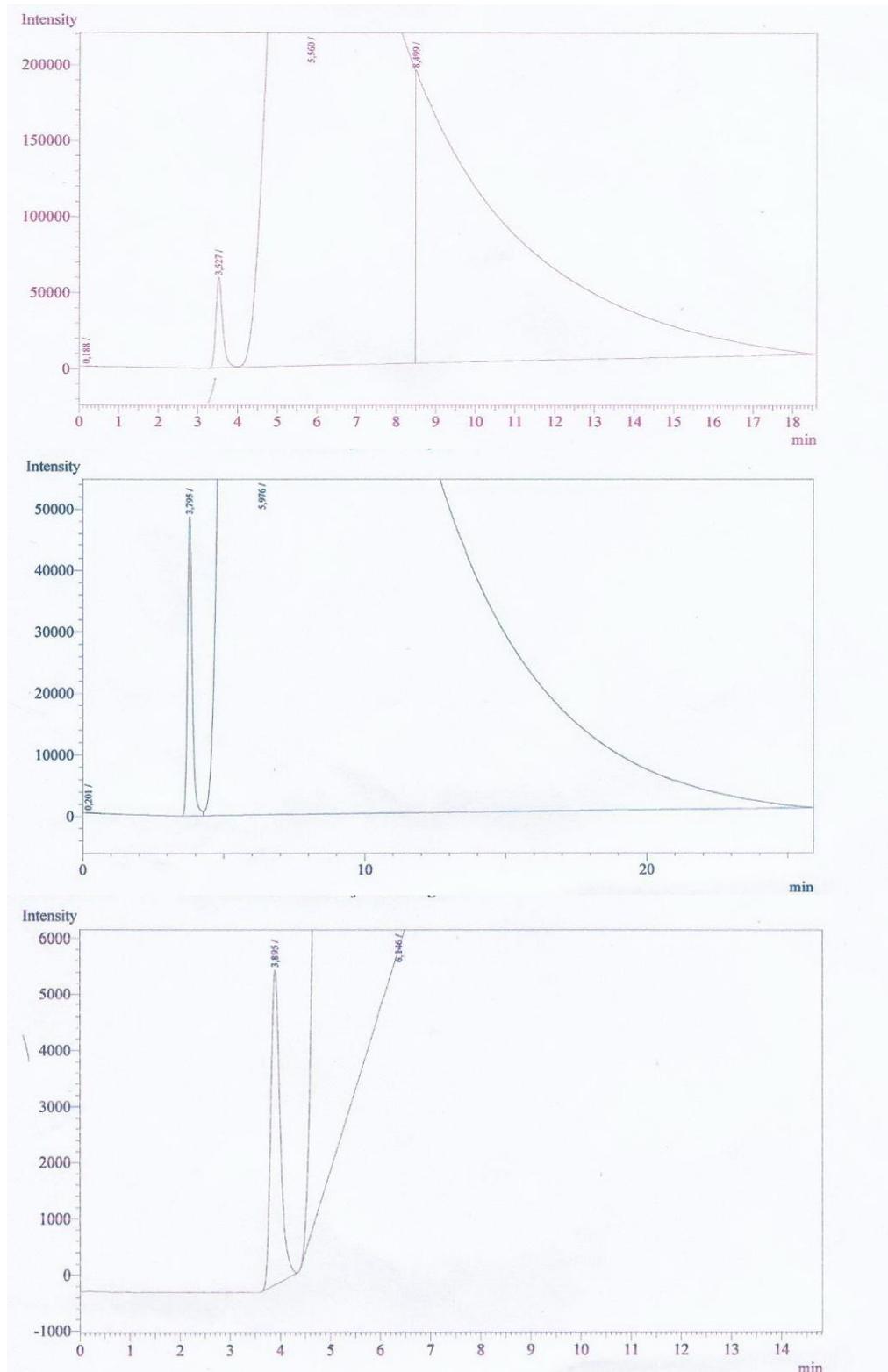
waktu inkubasi	SD	RSD
6 jam	0.10887	2.921335119
12 jam	0.19028	5.089168181
24 jam	0.0421	1.220853247
36 jam	0.02325	0.608297396
48 jam	0.02325	0.672470718

Lampiran 11. Hasil kromatogram asam lemak metal ester bakteri *E.coli* ATCC 25922 pada kromatografi gas

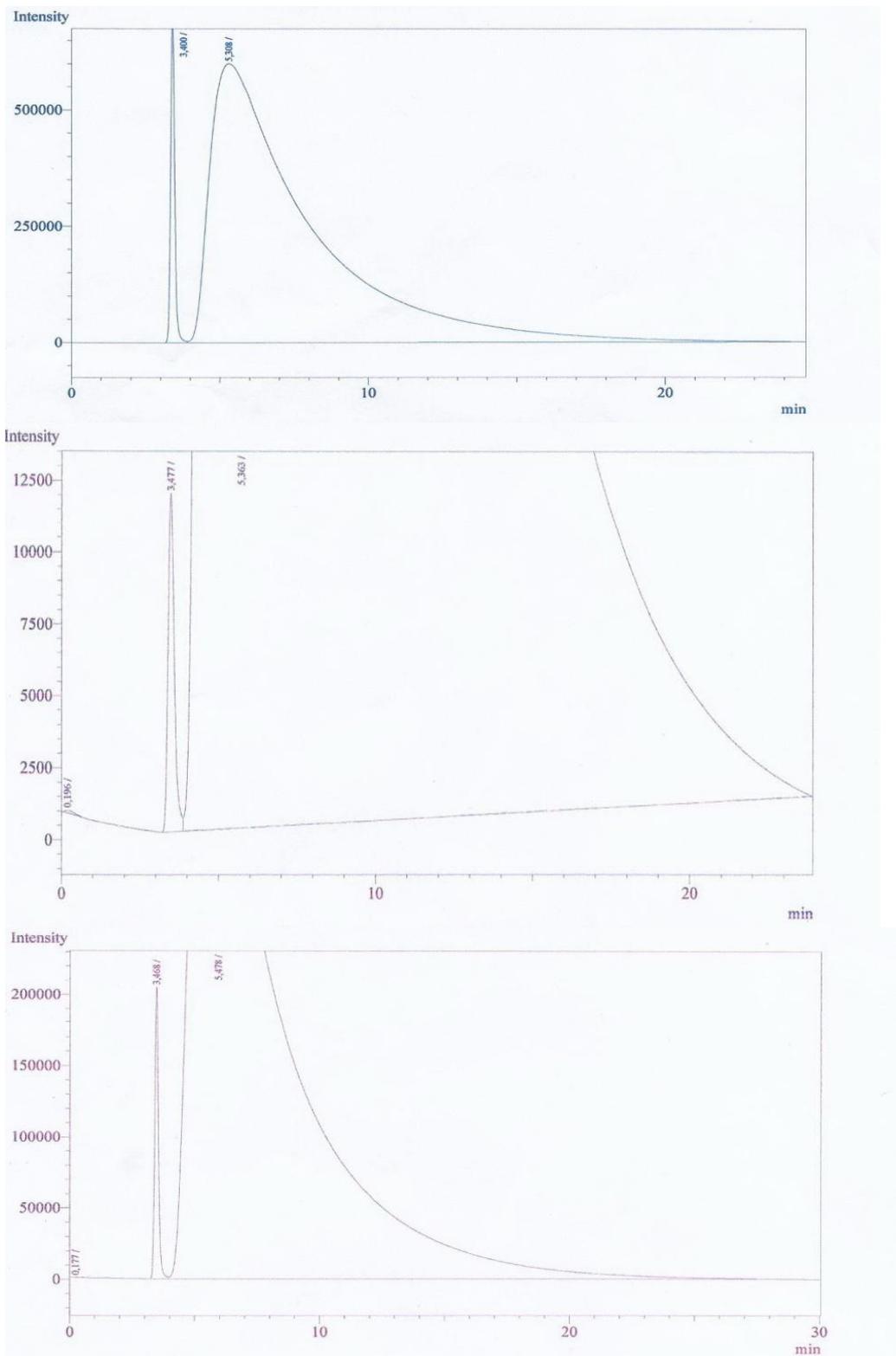
1. Waktu inkubasi 6 jam



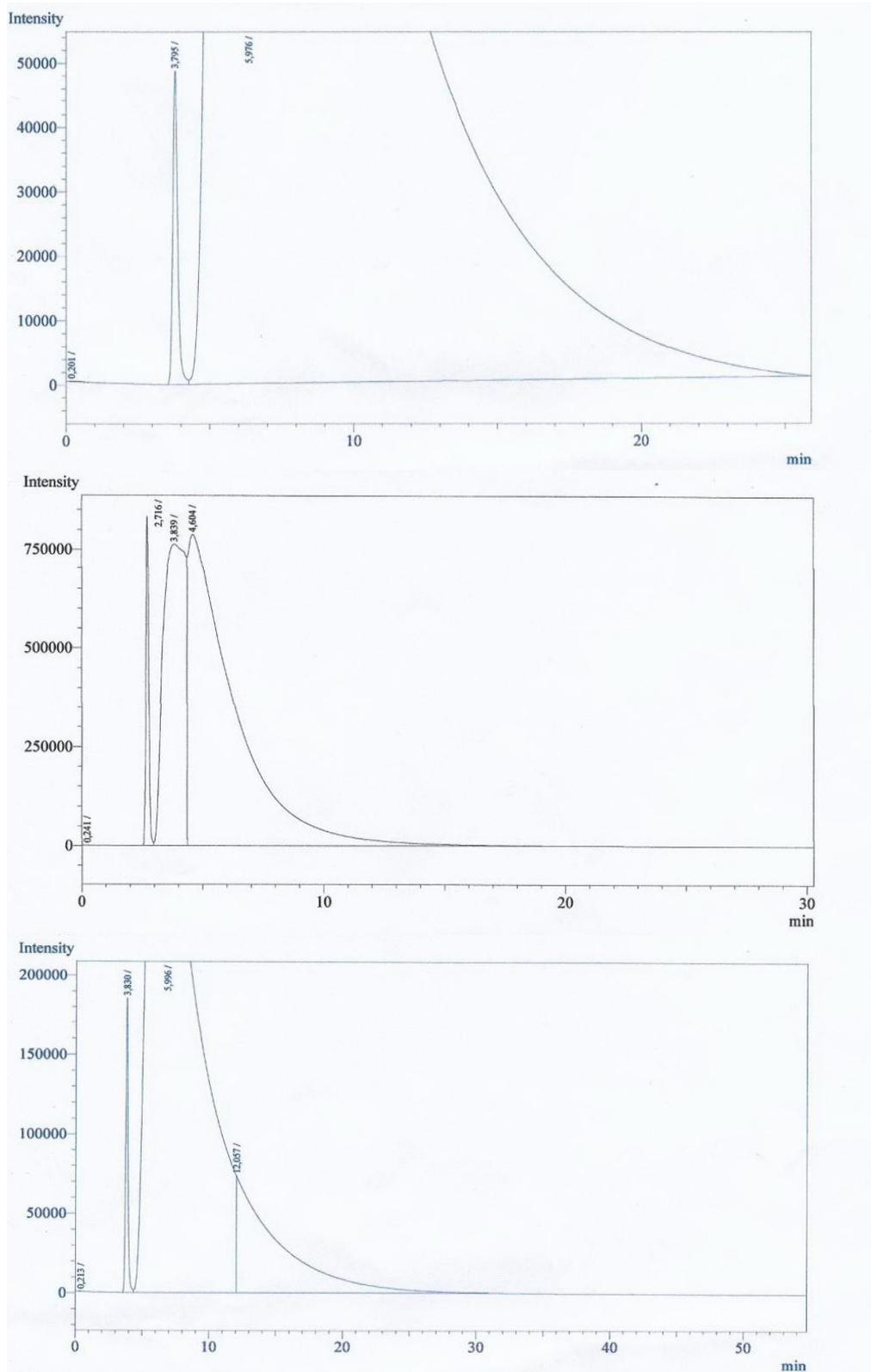
2. Waktu ink ubasi 12 jam



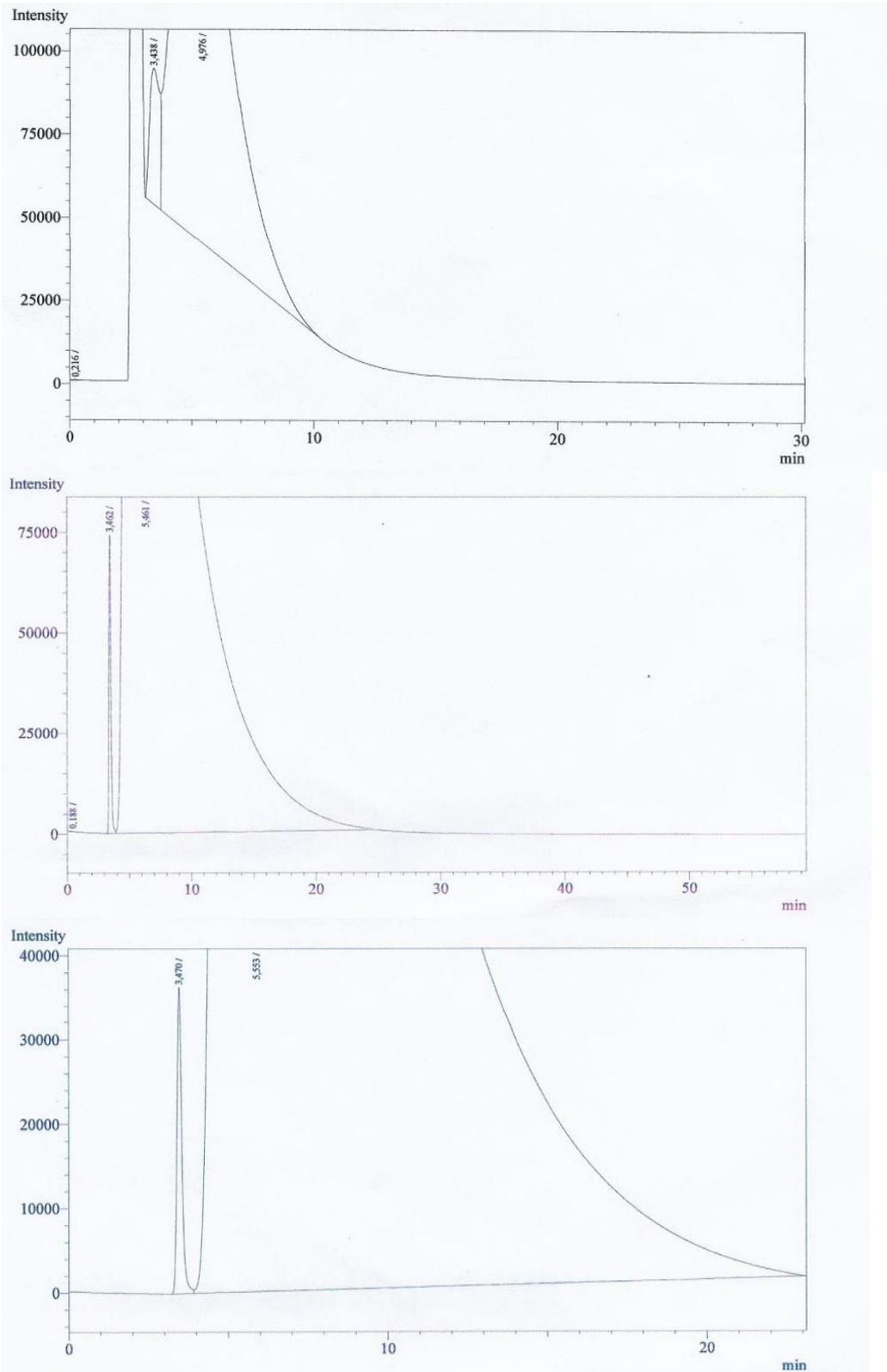
3. Waktu inkubasi 24 jam



4. Waktu inkubasi 36 jam

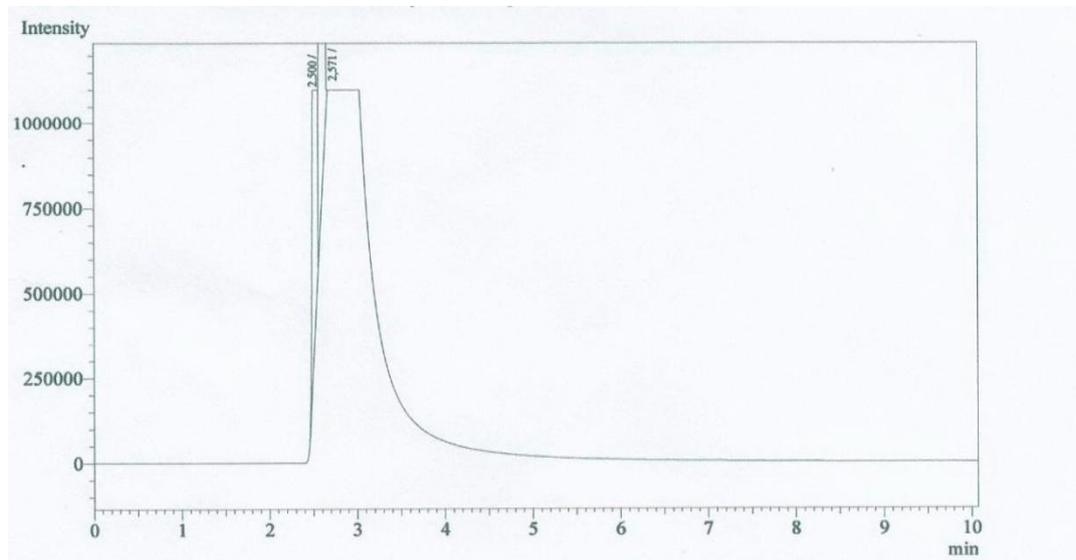


5. Waktu in kubasi 48 jam

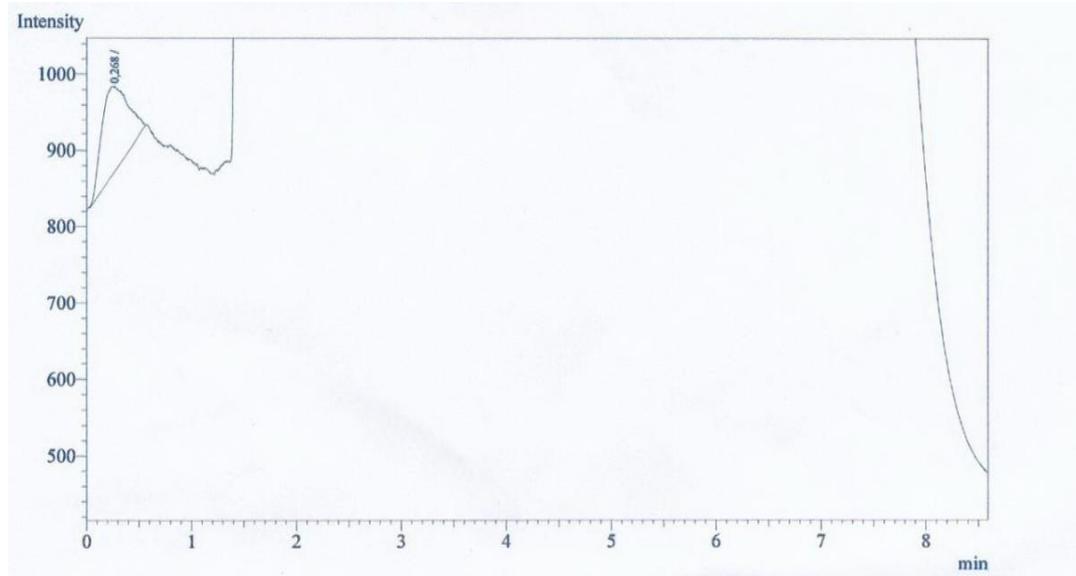


Lampiran 12. Hasil Kromatogram Pelarut

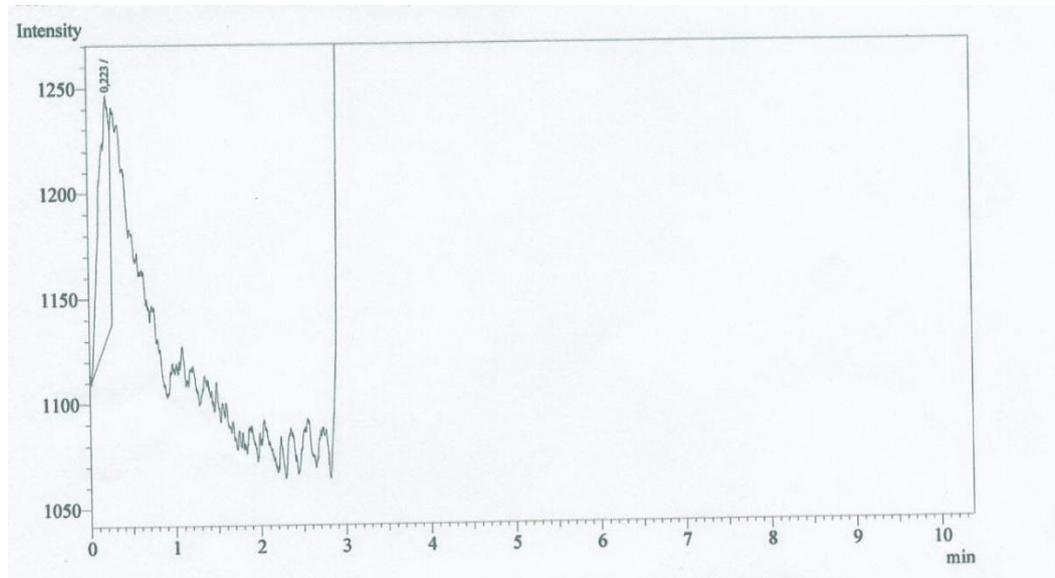
1. Hexan



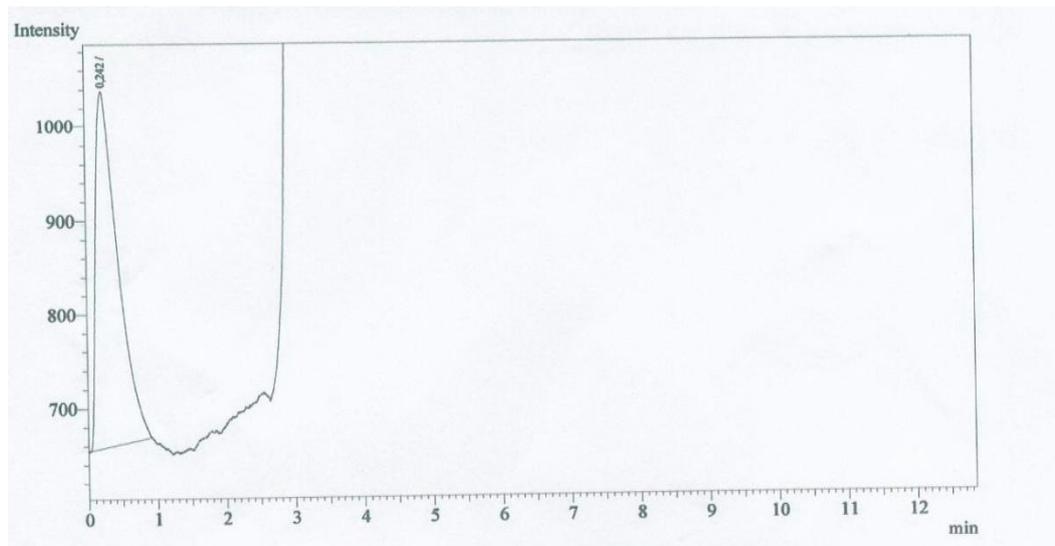
2. Metanol



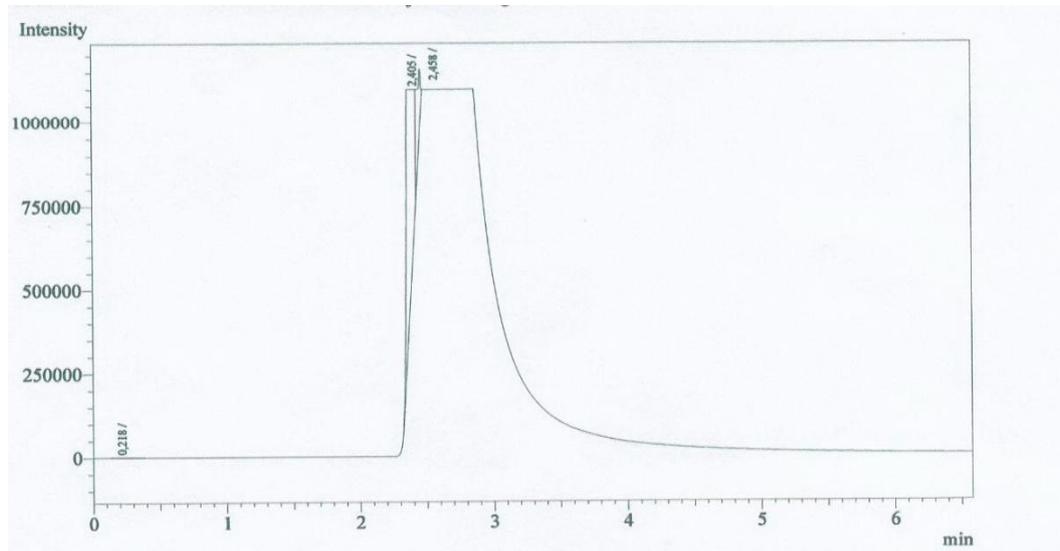
3. Metil Tert-buti eter



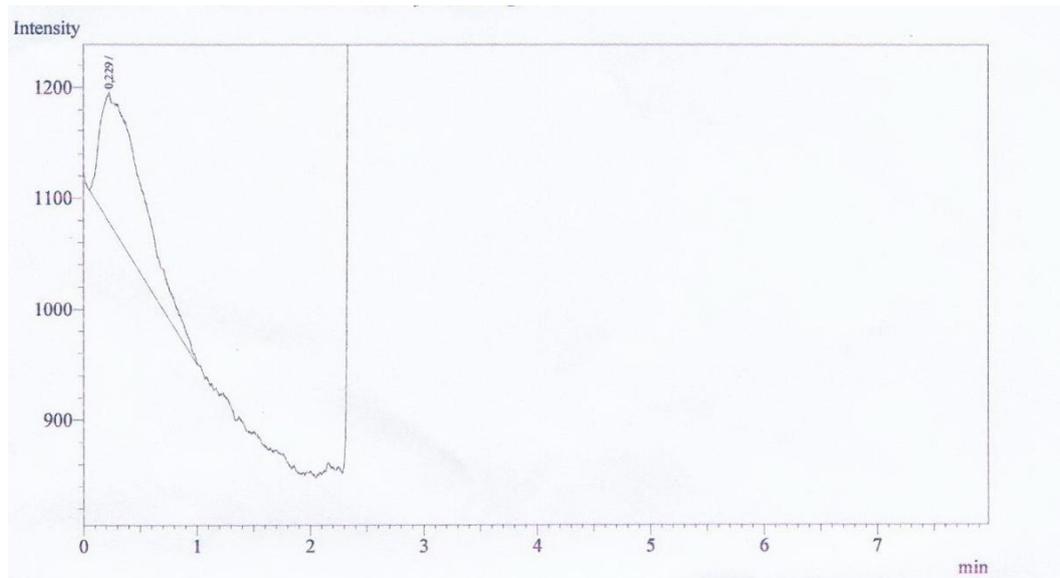
4. Pelarut Saponifikasi



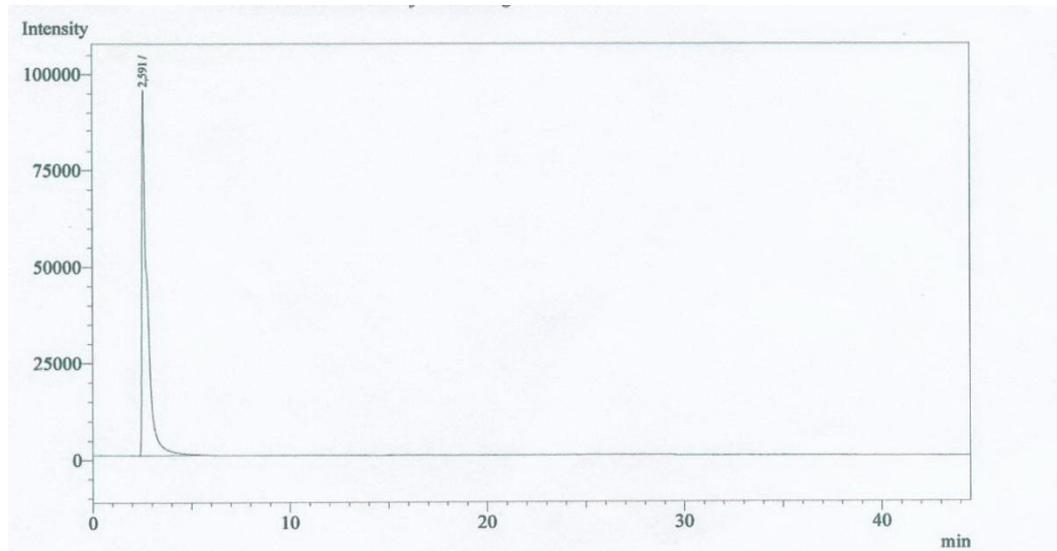
5. Pelarut Ekstraksi



6. Pelarut Metilasi



7. PelarutPencucian

**Lampiran 13. Hasil Kromatogram Media *MacConkey***