

**ANALISIS ASAM LEMAK DALAM PERTUMBUHAN BAKTERI
Salmonella typhi ATCC 13311 DENGAN MENGGUNAKAN
METODE KROMATOGRAFI GAS**



Oleh:

**Teti Insani Karimah
19133865A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

**ANALISIS ASAM LEMAK DALAM PERTUMBUHAN BAKTERI
Salmonella typhi ATCC 13311 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:

**Teti Insani Karimah
19133865A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

PENGESAHAN SKRIPSI

Berjudul

**ANALISIS ASAM LEMAK DALAM PERTUMBUHAN BAKTERI
Salmonella typhi ATCC 13311 DENGAN MENGGUNAKAN
METODE KROMATOGRAFI GAS**

Oleh:

**Teti Insani Karimah
19133865A**

Dipertahankan dihadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal : 8 Juni 2017

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi



Dekan,

Prof. Dr. R. A. ... S.U., M.M., M.Sc., Apt.

Pembimbing,

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

Pembimbing Pendamping,

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

Penguji:

1. Ismi Rahmawati, M.Si., Apt.
2. Hery Muhamad Ansory, S.Pd., M.Sc.
3. Meta Kartika Untari, M.Sc., Apt.
4. Iswandi, S.Si., M.Farm., Apt.

1.

3.

2.

4.

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillahrabbi'l'alamin

Akhirnya aku sampai ke titik ini,

Sepercik keberhasilan yang Engkau hadiahkan padaku ya

Rabb

Tak henti-hentinya aku mengucapkan syukur padaMu ya Rabb

Serta shalawat dan salam kepada idolaku Rasullallah SAW

dan para sahabat yang mulia

Semoga sebuah karya mungil ini menjadi amal shaleh

bagiku dan menjadi kebanggaan bagi keluargaku tercinta

Kupersembahkan karya kecilku ini untuk orang – orang

yang kusayangi :

Bapak, Ibu, Nenek Tercinta

Mereka, yang dalam sujud-sujud panjangnya berdoa untuk

kebaikanku. Betapa diri ini ingin melihat kalian bangga

padaku. Betapa tak ternilai kasih sayang dan pengorbanan

kalian padaku. Maaf, hingga detik ini belum bisa menjadi

anak yang berbakti dan belum bisa membahagiakan kalian.

Aku cinta kalian karena Allah

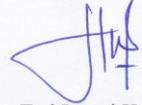
**Sahabat – sahabat perjuanganku di kampus Universitas Setia Budi dan semua teman – teman yang tak mungkin penulis sebutkan satu persatu, yang senantiasa menjadi penyemangat dan menemani disetiap hariku. Mari kita lanjutkan perjuangan kita di luar sana
“Serahkan dan pasrahkan pada sebaik-baik kuasaNya”**

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan 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, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian atau karya ilmiah atau skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, 20 Juni 2017



Teti Insani Karimah

KATA PENGANTAR

Assalla mualaikum Wr. Wb

Alhamdulillahirobbil'allamin. Segala puji dan syukur kehadirat Allah S.W.T, atas berkat dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini untuk memenuhi persyaratan guna mencapai gelar Sarjana Farmasi (S.Farm) dalam ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi. Skripsi ini berjudul **“ANALISIS ASAM LEMAK DALAM PERTUMBUHAN BAKTERI *Salmonella typhi* ATCC 13311 DENGAN MENGGUNAKAN METODE KROMATOGRAFI GAS”** dengan harapan dapat bermanfaat bagi pembaca dan dapat memberikan pengetahuan di bidang farmasi terutama dalam bidang analisis bakteri.

Dalam penyusunan dan penulisan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan, bimbingan serta dukungan semua pihak yang terlibat baik secara langsung maupun tidak langsung dalam penelitian ini, maka pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Yth. Bapak Dr. Ir. Djoni Tarigan, MBA., selaku rektor Universitas Setia Budi.
2. Yth. Ibu Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
3. Yth. Bapak Iswandi, S.Si., M.Farm., Apt., selaku Dosen Pembimbing yang sangat tegas memberikan bantuan berupa bimbingan, petunjuk, nasihat serta saran dalam menyelesaikan skripsi ini.
4. Yth. Bapak D. Andang Arif W, S.P., M.Si., selaku Dosen Pendamping yang sangat arif dan bijaksana yang telah memberikan pengarahan, petunjuk, nasihat, bimbingan dengan meluangkan waktunya hingga skripsi ini tersusun.
5. Segenap dosen Universitas Setia Budi yang telah banyak memberikan ilmu pengetahuan khususnya di bidang farmasi.
6. Kepala Laboratorium beserta asisten yang telah memberikan fasilitas dan bantuan selama penelitian.

7. Bapak Asik Gunawan selaku yang telah sabar dan ikhlas dalam memberikan bantuan selama penelitian.
8. Kedua orang tua tercinta, yang telah memberikan dorongan moril dan materil.
9. Seluruh keluarga yang selalu memberikan dukungan dan semangat.
10. Sahabat seperjuangan yang telah memberikan dukungan serta senyum semangat saat suka maupun duka (teruntuk anak Kost Pink, FKK 3 dan semuanya).
11. Semua pihak yang telah memberikan dukungan dan bantuan sampai skripsi ini selesai.

Semoga Allah SWT memberikan balasan yang berlipat ganda kepada semuanya. Demi perbaikan selanjutnya, saran dan kritik yang membangun akan penulis terima dengan senang hati sebagai langkah untuk meningkatkan kualitas penulis. Sebagai akhir, penulis mengucapkan permohonan maaf atas segala kekurangan, kekhilafandan keterbatasan yang ada.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb

Surakarta, Juni 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PENGESAHAN SKRIPSI	Error! Bookmark not defined.
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
PERNYATAAN	iv
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
INTISARI	xiv
ABSTRACT	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Perumusan masalah	3
C. Tujuan	3
D. Manfaat	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Bakteri <i>Salmonella typhi</i>	5
1. Klasifikasi <i>Salmonella typhi</i>	5
2. Morfologi bakteri <i>Salmonella typhi</i>	5
3. Struktur sel bakteri <i>Salmonella</i>	6
2.1. Lipoprotein	6
2.2. Membran luar	6
2.3. Lipopolisakarida	7
2.4. Fosfolipid	7
2.5. Lipid A	7
4. Struktur Antigen bakteri <i>Salmonella typhi</i>	7
5. Patogenitas <i>Salmonella typhi</i>	8
6. Sifat Fisiologis <i>Salmonella typhi</i>	9
7. Toksin bakteri	10
B. Teknik Penanaman Bakteri	11

1.	Teknik penanaman dari suspensi	11
1.1	Spread Plate (<i>agar tabur ulas</i>)	11
1.2	<i>Pour Plate</i> (<i>agar tuang</i>)	11
2.	Teknik Penanaman dengan Goresan (<i>Streak</i>).....	12
2.1	Goresan Sinambung.....	12
2.2	Goresan T.....	12
2.3	Goresan Kuadran (<i>Streak quadrant</i>).....	12
C.	Kurva Pertumbuhan Bakteri	12
1.	Fase lamban (<i>lag</i>)	13
2.	Fase eksponensial.....	13
3.	Fase stationer puncak	14
4.	Fase penurunan : Fase kematian	14
D.	Media.....	14
1.	Pengertian media.....	14
1.	Macam – macam media.....	15
2.	Klasifikasi media.....	15
E.	Kromatografi Gas.....	16
1.	Prinsip kerja kromatografi gas	17
2.	Komponen alat kromatografi gas	17
2.1	Gas pembawa.....	17
3.	Pengatur aliran tekanan	18
4.	Tempat injeksi cuplikan	18
5.	Kolom	19
6.	Detektor	19
7.	Rekorder	19
F.	Metode Analisis	19
1.	Saponifikasi	19
2.	Metilasi	20
3.	Ekstraksi	20
G.	Landasan Teori	20
H.	Hipotesis	23
BAB III	METODE PENELITIAN.....	24
A.	Populasi Sampel.....	24
1.	Populasi	24
2.	Sampel	24
B.	Variabel Penelitian.....	24
1.	Identifikasi variable utama	24
2.	Variable operasional.....	24
3.	Definisi operasional variable utama.....	25
C.	Bahan dan Alat.....	26
1.	Bahan.....	26
2.	Alat.....	26
D.	Jalanya Penelitian.....	26
1.	Strerilisasi alat.....	26

2.	Pembuatan suspensi bakteri uji <i>Salmonella typhi</i> ATCC 13311	26
3.	Identifikasi bakteri uji	27
3.1	Identifikasi secara goresan	27
3.2	Identifikasi secara biokimia	27
3.3	Identifikasi secara mikroskopis dengan pewarnaan Gram	28
4.	Pembuatan plat agar	28
5.	Kultur bakteri	28
6.	Penyiapan reagen	28
7.	Penyiapan sampel asam lemak bakteri <i>Salmonella typhi</i>	29
8.	Analisis dengan kromatografi gas	30
E.	Skema Jalanya Penelitian	31
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		32
1.	Sterilisasi	32
2.	Hasil pembuatan suspensi bakteri uji <i>Salmonella typhi</i> ATCC 13311	32
3.	Hasil identifikasi bakteri uji <i>Salmonella typhi</i> ATCC 13311	32
3.1.	Hasil identifikasi koloni bakteri <i>Salmonella typhi</i> ATCC 13311 secara makroskopis	32
3.2.	Hasil identifikasi mikroskopis <i>Salmonella typhi</i> ATCC 13311 dengan pewarnaan gram	33
3.3.	Hasil identifikasi uji biokimia bakteri <i>Salmonella typhi</i> ATCC 13311	33
4.	Penyiapan sampel asam lemak metil ester bakteri <i>Salmonella typhi</i> ATCC 13311	36
5.	Pemilihan kondisi kromatografi gas	37
5.1	Pemilihan suhu awal kolom untuk analisis asam lemak bakteri	37
5.2	Pemilihan laju alir	38
6.	Hasil analisis sampel asam lemak metil ester bakteri <i>Salmonella typhi</i> ATCC 13311 menggunakan kromatografi gas	38
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN		42
A.	Kesimpulan	42
B.	Saran	42
DAFTAR PUSTAKA		43
LAMPIRAN		47

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Bakteri <i>Salmonella typhi</i>	5
Gambar 2. Kurva Pertumbuhan Bakteri	13
Gambar 3. Kultur bakteri	28
Gambar 4. Penyiapan Sampel	30
Gambar 5. Skema jalannya penelitian	31
Gambar 6. Hasil identifikasi makroskopis.....	33
Gambar 7. Hasil identifikasi pewarnaan gram.....	33
Gambar 8. Hasil identifikasi uji biokimia.....	35
Gambar 9. Sampel asam lemak metil ester bakteri <i>Salmonella typhi</i> ATCC 13311 dengan waktu inkubasi 6 jam Error! Bookmark not defined.	
Gambar 10. Sampel asam lemak metil ester bakteri <i>Salmonella typhi</i> ATCC 13311 dengan waktu inkubasi 12 jam Error! Bookmark not defined.	
Gambar 11. Sampel asam lemak metil ester bakteri <i>Salmonella typhi</i> ATCC 13311 dengan waktu inkubasi 24 jam Error! Bookmark not defined.	
Gambar 12. Sampel asam lemak metil ester bakteri <i>Salmonella typhi</i> ATCC 13311 dengan waktu inkubasi 36 jam Error! Bookmark not defined.	
Gambar 13. Sampel asam lemak metil ester bakteri <i>Salmonella typhi</i> ATCC 13311 dengan waktu inkubasi 48 jam Error! Bookmark not defined.	

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Hasil identifikasi uji biokimia pada <i>Salmonella typhi</i> ATCC 13311	34
Tabel 2. Hasil identifikasi biokimia pada masing-masing variasi waktu	36
Tabel 3. Hasil kromatogram asam lemak metil ester bakteri <i>Salmonella typhi</i> ATCC 13311.....	39
Tabel 4. Hasil waktu retensi dan luas area	40

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Foto alat.....	48
Lampiran 2. Foto bahan	50
Lampiran 3. Foto suspensi bakteri <i>Salmonella typhi</i> ATCC 13311 dan standart Mc Farland 3.....	52
Lampiran 4. Penyiapan reagen	53
Lampiran 5. Foto kultur bakteri <i>Salmonella typhi</i> ATCC 13311 pada variasi waktu.....	54
Lampiran 6. Hasil uji biokimia pada masing-masing variasi waktu inkubasi ...	55
Lampiran 7. Penyiapan sampel asam lemak bakteri <i>Salmonella typhi</i> ATCC 13311.....	56
Lampiran 8. Hasil kromatogram asam lemak bakteri <i>Salmonella typhi</i> ATCC 13311.....	57
Lampiran 9. Hasil kromatogram pelarut.....	65
Lampiran 10. Hasil kromatogram media BSA.....	69
Lampiran 11. Hasil perhitungan simpangan (RSD).....	69
Lampiran 12. Lampiran formulasi dan pembuatan media	70
Lampiran 13. Lampiran optimasi kondisi suhu kromatografi gas.....	73

INTISARI

TETI, I.K. 2017. ANALISIS ASAM LEMAK DALAM PERTUMBUHAN BAKTERI *Salmonella typhi* ATCC 13311 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. Salah satu agen penyebab infeksi adalah bakteri *Salmonella typhi*. Mendeteksi bakteri penginfeksi pada tubuh manusia dengan metode konvensional biasanya memerlukan waktu 24 jam setelah pemeriksaan mengenai gejala timbulnya infeksi. Pemeriksaan tersebut dinilai kurang efektif. Penelitian ini bertujuan untuk mencari waktu inkubasi paling optimal bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 yang dapat diidentifikasi senyawanya dengan metode kromatografi gas.

Bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 dikultur dalam media BSA dan diinkubasi pada masing-masing variasi waktu yaitu 6 jam, 12 jam, 24 jam, 36 jam dan 48 jam. Derivatisasi asam lemak bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 menggunakan metode esterifikasi yang menghasilkan asam lemak metil ester (*fatty acid methyl ester*). Sampel asam lemak metil ester bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 kemudian dianalisis menggunakan kromatografi gas dengan kondisi suhu awal kolom 120°C.

Kromatografi gas mampu menganalisis sampel asam lemak metil ester bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 pada waktu inkubasi kurang dari 24 jam dan waktu optimal analisis adalah 6 jam. Hasil waktu retensi pada analisis sampel asam lemak metil ester bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 pada inkubasi 6 jam = 3,895, 12 jam = 3,935, 24 jam = 3,737, 36 jam = 3,468, 48 jam = 3,335.

Kata kunci : Bakteri, *Salmonella typhi* ATCC 13311, kromatografi gas, asam lemak metil ester

ABSTRACT

KARIMAH, T.I. 2017. FATTY ACID ANALYSIS IN BACTERIAL GROWTH OF *Salmonella typhi* ATCC 13311 BY GAS CHROMATOGRAPHY METHOD, SKRIPSI, PHARMACEUTICAL FACULTY, UNIVERSITY OF SETIA BUDI, SURAKARTA.

Infection is a process of invasion and breeding of microorganism that occur in the tissues of the human body. One of the infectious agents is *Salmonella typhi* bacteria. Detecting infectious bacteria in the human body by conventional methods usually takes 24 hours after examination of symptoms infection. The examination was considered less effective. This study aims to find the most optimal incubation time of bacteria *Salmonella typhi* ATCC 13311 which can be identified its compound by gas chromatography method.

Salmonella typhi ATCC 13311 bacteria were cultured in BSA media and incubated at each time variation there were 6 hours, 12 hours, 24 hours, 36 hours and 48 hours. The bacterial fatty acid derivatisation of *Salmonella typhi* ATCC 13311 used esterification method which yields fatty acid methyl ester. Samples of fatty acid methyl ester for bacteria *Salmonella typhi* ATCC 13311 the next analyzed by gas chromatography with the initial temperature conditions of column 120 ° C.

Gas chromatography was able to analyzed the sample of fatty acid methyl ester of bacteria *Salmonella typhi* ATCC 13311 at incubation time less than 24 hours and the optimal time of analysis was 6 hours. Results of retention time on analyzed of fatty acid methyl ester samples of bacteria *Salmonella typhi* ATCC 13311 at incubation 6 hours = 3.895, 12 hours = 3.935, 24 hours = 3.737, 36 hours = 3.468, 48 hours = 3.335.

Keywords : Bacteria, *Salmonella typhi* ATCC 13311, gas chromatography, fatty acid methyl ester

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 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).

Salah satu agen penyebab infeksi adalah bakteri *Salmonella typhi*. *Salmonella typhi* merupakan bakteri Gram negatif yang berbentuk batang yang menyebabkan demam tifus (*Typhoid fever*). Pada umumnya *Salmonella* bersifat patogen terhadap manusia bila masuk melalui mulut, tidak selalu *Salmonella typhi* yang masuk ke dalam saluran pencernaan akan menyebabkan infeksi, untuk menimbulkan infeksi *Salmonella typhi* harus dapat mencapai usus halus (Brooks 2007). Demam tipoid merupakan penyakit infeksi serius serta merupakan penyakit endemis yang menjadi masalah kesehatan global termasuk di Indonesia dan Negara-negara tetangga seperti Malaysia dan Thailand (Punjabi 2004).

Menurut *World Health Organization* (WHO) diperkirakan terjadi 17 juta kasus demam tifoid per tahun dan 600 ribu diantaranya berakhir dengan kematian. Sekitar 70% dari seluruh kasus kematian itu menimpa penderita demam tifoid di Asia. *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) Indonesia melaporkan prevalensi demam tifoid mencapai 358-810/100.000 populasi pada tahun 2007 dengan 64% penyakit ditemukan pada usia 3-19 tahun dan angka mortalitasnya bervariasi antara 3,1-10,4% pada pasien rawat inap (Juwita 2013). Berdasarkan profil Kesehatan Indonesia tahun 2011, demam tifoid atau paratifoid menempati urutan ke-3 dari 10 penyakit terbanyak, pasien rawat inap di rumah sakit tahun 2010 yaitu sebanyak 41.081 kasus, yang meninggal 274 orang dengan *Case*

Fatality Rate sebesar 0,67% (Kemenkes RI 2012). Masalah tifoid di Indonesia disebabkan antara lain karena faktor kebersihan, maupun masalah klinis seperti koinfeksi dengan penyakit lain, resistensi antibiotika, serta belum adanya vaksin yang efektif (Raflizal 2010).

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-gejala timbulnya infeksi. 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, penggunaan antibiotik yang tidak tepat dalam hal indikasi maupun cara pemberian juga dapat merugikan penderita dan dapat memudahkan terjadinya resistensi terhadap antibiotik serta dapat menimbulkan efek samping (Febiana 2012).

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). Menurut Ballesteros (2012) bahwa sensitivitas PCR baik bila dilakukan pada sampel darah daripada feses (84%-95% setelah lima hari infeksi) tetapi tes ini tidak banyak tersedia. Kromatografi gas berpotensi menjadi pilihan utama dalam membantu mengatasi permasalahan dalam dunia bioteknologi, farmasi, klinik dan kehidupan manusia secara umum dengan biaya yang terjangkau.

Kromatografi gas digunakan untuk ekstraksi simultan dan transesterifikasi lipid pada bakteri yang telah diadopsi oleh Peterson, deSchmertzing, dan Abel (1962) penelitian ini menggunakan bakteri *Micrococcus ureae*, *Gaffkya tetragenae*,

Escherichia freundii, *E. coli*, *Aerobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes* (*K. pneumoniae*), *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Pasteurella tularensis*, *Bacillus subtilis* var. *niger*, dan *B. anthracis*. Myron Sasser (2006) dilaporkan sukses mengidentifikasi 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 sample untuk mempersiapkan batch 30 sampel.

Berdasarkan alasan-alasan inilah keluarlah ide Analisis waktu inkubasi dalam identifikasi bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 dengan menggunakan kromatografi gas.

B. Perumusan masalah

Permasalahan dalam penelitian ini adalah pertama, apakah kromatografi gas bisa menganalisis senyawa yang dihasilkan oleh bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 pada waktu pertumbuhan kurang dari 24 jam?

Kedua, apakah ada perbedaan pola kromatogram dari senyawa yang dihasilkan oleh bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 dalam berbagai variasi waktu inkubasi?

C. Tujuan

Pertama, untuk mengetahui kemampuan kromatografi gas dalam menganalisis senyawa yang dihasilkan oleh bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 pada waktu pertumbuhan kurang dari 24 jam.

Kedua, untuk mengetahui perbedaan pola kromatogram dari senyawa yang dihasilkan oleh bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 dalam berbagai variasi waktu inkubasi

D. Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tambahan yang ilmiah dalam ilmu pengetahuan bidang analisis mikrobiologi dan digunakan sebagai masukan bagi tenaga medis dalam upaya memanfaatkan metode kromatografi gas sebagai solusi cepat deteksi bakteri serta memberikan alternatif untuk optimasi waktu inkubasi bakteri.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

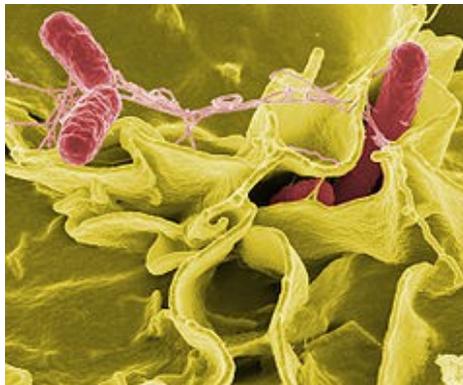
A. Bakteri *Salmonella typhi*

Salmonella typhi merupakan bakteri Gram negatif yang berbentuk batang yang menyebabkan demam tifoid. Pada umumnya *Salmonella* bersifat patogen terhadap manusia bila masuk melalui mulut, tidak selalu *Salmonella typhi* yang masuk ke dalam saluran pencernaan yang akan menyebabkan infeksi, untuk menimbulkan infeksi *Salmonella typhi* harus dapat mencapai usus halus (Brooks 2007).

1. Klasifikasi *Salmonella typhi*

Sistematika *Salmonella typhi* menurut Jawetz *et al.* (2006) :

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Ordo	: Gamma Proteobacteria
Class	: Enterobacteriales
Family	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Salmonella</i>
Spesies	: <i>Salmonella typhi</i>



Gambar 1. Bakteri *Salmonella typhi*

(Sumber : Damianus 2008)

2. Morfologi bakteri *Salmonella typhi*

Salmonella typhi adalah bakteri yang selnya berbentuk batang berukuran 0,7-1,5 μm x 2,0-5,0 μm , bersifat Gram negatif sehingga mempunyai komponen

outer layer (lapisan luar) yang tersusun dari LPS (lipopolisakarida) dan dapat berfungsi sebagai endotoksin, bergerak dengan flagel peritrik, tidak membentuk spora (Darmawati 2009).

3. Struktur sel bakteri *Salmonella*

Struktur sel bakteri *Salmonella* terdiri atas bagian inti (nucleus), sitoplasma dan dinding sel. Dinding sel bakteri ini bersifat Gram negatif, sehingga mempunyai struktur kimia yang berbeda dengan bakteri Gram positif. Dinding sel gram negatif mengandung tiga komponen yang terletak di luar lapisan peptidoglikan : lipoprotein, membran luar dan lipopolisakarida (Jawetz *et al*2012).

Dinding sel *Salmonella typhi* dibentuk 20% oleh lapisan lipoprotein. Sementara itu lapisan fosfolipid dan LPS membentuk 80% dinding sel kuman *Salmonella typhi*. Lipopolisakarida yang terdiri dari lipid A, oligosakarida dan polisakarida yang merupakan bagian terpenting dan utama yang menentukan sifat antigenik dan aktivitas eksotoksin. Lipid A merupakan asam lemak jenuh yang menentukan aktivitas endotoksin dari LPS yang selanjutnya dapat mengakibatkan demam dan reaksi imunologis sang penjamu (Marleni 2012; Olsen 2004)

Outer Membran Protein (OMP) ialah dinding sel terluar membran sitoplasma dan lapisan peptidoglikan yang berfungsi sebagai sawar untuk mengendalikan aktivitas masuknya cairan ke dalam membrane sitoplasma serta berfungsi sebagai reseptor bakteriofag dan bakteriolisin (Marleni 2012).

3.1. Lipoprotein. Lipoprotein mengandung 57 asam amino, menunjukkan ulangan sekuens 15 asam amino, yaitu yang berikatan dengan residu DAP rantai samping tetrapeptida peptidoglikan. Komponen lipid, terdiri dari tioeter digliserida yang berikatan dengan sistein terminal, secara non kovalen disisipkan ke dalam membran luar. Lipoprotein secara numerik merupakan protein yang paling berlimpah pada sel gram negatif (sekitar 700.000 molekul per sel). Fungsinya adalah untuk menstabilkan membran luar dan meletakkanya pada lapisan peptidoglikan (Jawetz *et al.* 2012)

3.2. Membran luar. Membran luar, secara kimia, berbeda dari membran biologis lainnya. Membran ini merupakan struktur dengan dua lapisan; komposisi lembaran dalamnya menyerupai membran sel sedangkan lembaran luarnya

mengandung komponen yang istimewa, suatu lipopolisakarida (LPS). Sebagai akibatnya, lembaran membran ini bersifat asimetris dan sifat dua lapisan ini sangat berbeda dari membran biologis simetris lainnya seperti membrane sel (Jawetz *et al* 2012).

3.3. Lipopolisakarida. Lipopolisakarida (LPS) pada dinding sel Gram negatif terdiri dari glikolipid kompleks, disebut lipid A yang dilekati sebuah polisakarida yang terdiri dari inti dan serangkaian terminal unit berulang. Komponen lipid A tertanam dalam lembaran luar membran yang ditambati LPS. LPS disintesis pada membran sitoplasma dan ditranspor ke posisi akhirnya diluar. Keberadaan LPS dibutuhkan untuk fungsi berbagai protein membran luar (Jawetz *et al* 2012)

3.4. Fosfolipid. Fosfolipid adalah suatu senyawa ampifilik yang mempunyai struktur gliserol, terdiri dari bagian kepala yang polar (gugus fosfat) dan bagian hidrofobik (satu atau dua molekul asam lemak). Senyawa ini bermuatan netral sampai sedikit negatif (Knight C.G. 1981).

3.5. Lipid A. Lipid A terdiri dari unit disakarida glukosamin terfosforilasi yang dilekasi sejumlah asam lemak rantai panjang. β -hydroxymyristic acid, suatu asam lemak C14, selalu ada dan khas untuk lipid ini, asam lemak lainnya, sama seperti kelompok pengganti pada fosfat, bervariasi tergantung pada spesies bakterinya (Jawetz *et al* 2012)

4. Struktur Antigen bakteri *Salmonella typhi*

Salmonella typhi adalah bakteri *enteric* yang bersifat Gram negatif, mempunyai antigen permukaan yang cukup kompleks dan mempunyai peran penting dalam proses terjadinya respon imun pada individu yang terinfeksi. Antigen permukaan tersebut terdiri dari antigen flagel (antigen H), antigen somatik (antigen O) dan antigen kapsul atau antigen K (antigen Vi). (Darmawati 2009).

Antigen O disebut juga sebagai antigen dinding sel karena antigen tersebut adalah bagian *outer layer* dari dinding sel bakteri Gram negatif. Antigen O tersusun dari LPS (lipopolisakaripda) yang berfungsi pula sebagai endotoksin,

resisten terhadap pemanasan 100 °C, alkohol, dan asam, reaksi aglutinasinya berbentuk butir-butir pasir (Joklik *et al* 1990)

Antigen H atau antigen flagel, antigen ini terdiri dari suatu protein yang dikode oleh gen *flg* yang berada pada lokus *fliC*. Antigen H bersifat termolabil dan dapat rusak oleh alkohol, pemanasan pada suhu diatas 60°C dan asam, dimana pada reaksi aglutinasinya berbentuk butir-butir pasir yang hilang bila dikocok. Antigen H terdiri dari 2 fase yaitu antigen H fase 1 (H1) dan antigen H2 (H2) sehingga dapat dijumpai pada *Salmonella typhi* serovar H1 dan *Salmonella typhi* serovar H2. Antigen H1 terdiri dari H1-d dan H1-j sehingga dapat dijumpai pula pada *Salmonella typhi* serovar H1-d yang tersebar luas di seluruh dunia dan *Salmonella typhi* serovar H-j yang hanya dijumpai di Indonesia. Strain bakteri *Salmonella typhi* serovar H-j bersifat kurang motil pada media semi solid agar dan kurang invasif apabila dibandingkan dengan *Salmonella typhi* serovar H-d (Grossman *et al* 1995)

Antigen Vi atau antigen kapsul, yaitu antigen yang terdiri dari polimer polisakarida dan bersifat asam. Antigen Vi yang dimiliki oleh bakteri berfungsi sebagai antiopsonik dan antipagositik, ekspresi antigen tersebut dikode oleh gen *tviA* yang berada di dalam lokus *via* B, tidak semua strain *Salmonella typhi* mengekspresikan antigen Vi (Wain *et al.*, 2005). Antigen ini mudah rusak oleh pemanasan selama 1 jam pada suhu 60°C, selain itu pada penambahan fenol dan asam, dimana pada reaksi aglutinasinya berbentuk awan. (Darmawati 2009)

5. Patogenitas *Salmonella typhi*

Demam typhoid adalah penyakit demam akut yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella typhi*. Penyakit ini khusus menyerang manusia, bakteri ini ditularkan melalui makanan dan minuman yang terkontaminasi oleh kotoran atau tinja dari seseorang pengidap atau penderita demam typhoid. Bakteri *Salmonella typhi* masuk melalui mulut dan hanyut ke saluran pencernaan. Apabila bakteri masuk ke dalam tubuh manusia, tubuh akan berusaha untuk mengeliminasinya. Bila bakteri yang dapat bertahan dan jumlah yang masuk cukup banyak, maka bakteri akan berhasil mencapai usus halus dan berusaha masuk ke dalam tubuh yang akhirnya dapat merangsang sel darah putih untuk menghasilkan interleukin dan merangsang

terjadinya gejala demam, perasaan lemah, sakit kepala, nafsu makan berkurang, sakit perut, gangguan buang air besar serta gejala lainnya (Darmawanti 2009).

Gejala klinik penyakit ini adalah demam tinggi pada minggu ke 2 dan ke 3, biasanya dalam 4 minggu gejala tersebut telah hilang, meskipun kadang-kadang bertambah lebih lama. Gejala yang lain yang sering ditemukan adalah anoreksia, malaise, nyeri otot, sakit kepala, batuk, bradikardia (*slow heart rate*) dan konstipasi. Gejala ini juga dapat dijumpai adanya pembesaran hati dan limpa, bintik rose sekitar umbilicus yang kemudian diikuti terjadinya ulserasi pada *Peyer patches* pada daerah ilium, yang kemudian diikuti terjadinya perdarahan karena terjadinya perforasi. Masa inkubasi demam tipoid umumnya 1-3 minggu, tetapi bisa lebih singkat yaitu 3 hari atau lebih lama sampai dengan 3 bulan, waktu inkubasi sangat tergantung pada kuantitas bakteri dan *host factor* serta karakteristik strain bakteri yang menginfeksi (Maier *et al* 2000; Anonymous 2001).

Dosis infeksi rata-rata bagi manusia cukup 10^6 organisme untuk menimbulkan infeksi klinik dan sub klinik. Pada manusia *Salmonella typhi* dapat menimbulkan demam enterik, bakterimia dengan lesi lokal dan enterokolitis. Diagnosis laboratorium antara lain dengan cara bakteriologik, serologi dan molekuler (Darmawanti 2009).

Menurut Hatta *et al* (2007) *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan satu pasang primer gen flagelin dapat digunakan untuk identifikasi keberadaan *Salmonella typhi* di dalam darah, urin dan feses, adapun sampel untuk identifikasi bakteri dapat berupa darah, urin, feses, sumsum tulang belakang. Menurut Talaro *et al* (2002) bahwa untuk identifikasi strain bakteri anggota familia enterobacteriaceae dapat dilakukan serangkaian uji biokimia IMViC (*indol, methyl red, voges proskauer, citrate*) (Darmawanti 2009).

6. Sifat Fisiologis *Salmonella typhi*

Salmonella typhi memfermentasikan glukosa dan manosa tanpa membentuk gas tetapi tidak memfermentasikan laktosa dan sukrosa. *Salmonella* menghasilkan H₂S (Jawetz *et al* 2006). Isolat *Salmonella* pada media SSA koloni akan terlihat jernih, transparan dan terlihat titik hitam pada di tengah koloni

(Amarantini 2009). Bakteri Salmonella akan mati pada suhu 60°C selama 15-20 menit melalui pasteurisasi, pendidihan dan Klorinasi (Keputusan Menteri Kesehatan RI 2006)

Salmonella typhi adalah bakteri yang berdasarkan kebutuhan oksigen bersifat fakultatif anaerob, membutuhkan suhu optimal 37°C untuk pertumbuhannya, memfermentasikan D-glukosa menghasilkan asam tetapi tidak membentuk gas, oksidase negatif, katalase positif, tidak memproduksi indol karena tidak menghasilkan enzim tryptophanase yang dapat mencegah tryptophan menjadi indol, *methyl red* (MR) positif menunjukkan bahwa fermentasi glukosa menghasilkan sejumlah asam yang terakumulasi di dalam medium sehingga menyebabkan pH medium menjadi asam (pH=4,2), dengan penambahan indikator *methyl red* maka warna medium menjadi merah. *Voges-Proskauer* (VP) negatif, citrat negatif, menghasilkan H₂S yang dapat ditunjukkan pada media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*). Bakteri menghasilkan H₂S yang merupakan produk hasil reduksi dari asam amino yang mengandung sulfur, H₂S yang dihasilkan akan bereaksi dengan garam Fe dalam media yang kemudian menjadi senyawa FeS berwarna hitam yang mengendap dalam media. Urease negatif, nitrat direduksi menjadi nitrit, lysine dan ornithin dekarboksilase positif, laktosa, sukrosa, salisin dan inositol tidak difermentasi. Uji ONPG negatif karena tidak menghasilkan enzim beta galaktosidase sehingga bakteri tidak dapat memfermentasikan laktosa, oleh karena itu strain bakteri tidak dapat memfermentasikan laktosa, oleh karena itu strain bakteri *Salmonella typhi* termasuk anggota familia enterobacteriaceae yang bersifat tidak memfermentasikan laktosa, lipase dan deoksiribonuklease tidak diproduksi (Brenner *et al* 1984; Koneman *et al* 1992; Talaro *et al* 2002).

7. Toksin bakteri

Salmonella typhi merupakan bakteri Gram negatif yang patogen, predominan ditemukan pada lumen usus. Toksisitasnya berhubungan dengan membran permukaan yang mengandung lipopolisakarida (LPS), yang berfungsi juga melindungi bakteri dari lingkungan sekitarnya. LPS tersusun atas antigen-O, inti polisakarida dan lipid A, yang menghubungkannya dengan *outer membrane*.

Lipid A tersusun dari dua *phosphorylated glucosamines* yang terikat dengan asam lemak. Grup fosfat ini menentukan toksisitas bakteri. Beberapa binatang mengeluarkan enzim yang memecah grup fosfat ini sebagai bentuk pertahanan dari patogenitas bakteri tersebut. Antigen-O yang berada pada bagian paling luar dari kompleks LPS bertanggung jawab dalam respon imun penjamu. *Salmonella typhi* memiliki kemampuan mengendalikan antigen-O yang berpengaruh pada perubahan konformasinya, sehingga antibodi lebih sulit mengenali (Marleni 2012)

B. Teknik Penanaman Bakteri

1. Teknik penanaman dari suspensi

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 (Pradika 2008)

1.1 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. Triglaski kemudian dibakar diatas bunsen dan didinginkan beberapa detik. Kemudian suspensi diratakan dengan menggosokkannya pada permukaan agar, penyebaran akan lebih efektif bila cawan ikut diputar.

1.2 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*.

2. Teknik Penanaman dengan Goresan (*Streak*)

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

2.1 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.

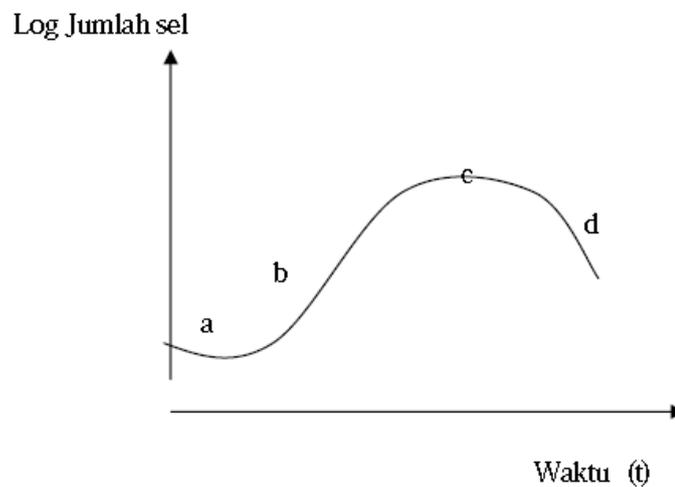
2.2 Goresan T. Prosedur kerja goresan T adalah petridish dibagi menjadi 3 bagian menggunakan spidol dan daerah tersebut diinokulasi dengan streak zig-zag. Ose dipanaskan dan didinginkan, lalu distreak zig-zag pada daerah berikutnya.

2.3 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 mikroorganisme. Goresan selanjutnya dipotongkan atau disilangkan dari goresan pertama sehingga jumlah semakin sedikit dan akhirnya terpisah-pisah menjadi koloni tunggal.

C. Kurva 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).



(Sumber : Brock & Madigan 1991)

Gambar 2. Kurva Pertumbuhan Bakteri

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 genetik 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 lambat 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)

D. Media

1. Pengertian media

Media adalah susunan bahan, baik bentuk alami (seperti toge, kentang, daging, telur, wortel dan sebagainya) ataupun bahan buatan (berbentuk senyawa

kimia, organik ataupun anorganik) yang dipergunakan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan mikroba. Media ada beberapa macam menurut bentuk, sifat, dan susunanya yang ditentukan oleh senyawa penyusun media, presentase campuran, dan tujuan penggunaan (Suriawira 1985).

Bentuk media berdasarkan konsistensinya tergantung dari pembiakan organisme dalam jumlah besar. Media setengah padat biasanya digunakan untuk menguji adanya mortalitas dan kemampuan fermentasi dari bakteri sedangkan media padat digunakan untuk mengamati morfologi koloni serta mengisolasi biakan murni (Hardioetomo 1985).

1. 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 organisme dalam jumlah besar, penelaahan fermentasi dan berbagai macam uji. Kedua, medium padat, dapat ditumbuhkan bahan pematid ke dalam medium kaldu. Biasanya digunakan untuk mengamati penampilan atau morfologi koloni dan mengisolasi biakan murni. Ketiga, medium setengah padat, digunakan untuk menguji ada tidaknya motilitas dan kemampuan fermentasi. Medium setengah padat mengandung gelatin ataupun agar – agar namun konsentrasi lebih kecil daripada medium padat (Hardioetomo 1985).

2. 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 *Mac Conkey*.

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

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 pembedaan 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 spesies 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 gas merupakan metode pemisahan suatu campuran menjadi komponen-komponen berdasarkan interaksi tersebut yaitu fase gerak dan fase diam. Fase gerak berupa gas yang stabil sedangkan fase diam bisa zat padat (GSC = *Gas Solid Chromatography*), atau zat cair (GLC = *Gas Liquid Chromatography*). Cuplikan yang dapat dipisahkan dengan metode ini harus mudah menguap. Metode ini bekerja sangat cepat sehingga dalam waktu beberapa detik dapat memisahkan secara sempurna. Cuplikan dalam bentuk uap dibawa oleh aliran gas ke dalam kolom pemisah, hasil pemisahan dapat dianalisis dari kromatogram. Kromatogram adalah kurva yang diperoleh dari pengukuran kromatografi, dan alat yang digunakan disebut kromatograf (Hendyana 1994).

Menurut Robards *et al* (1994) setiap alat GC mempunyai karakteristik tertentu yang dipengaruhi oleh disain (geometri) alat seperti panjang kolom, diameter kolom dan kondisi operasi seperti kecepatan gas dan suhu oven. Parameter ini sangat menentukan resolusi dari asam lemak dan keakuratan analisa.

1. Prinsip kerja kromatografi gas

Gas pembawa (biasanya digunakan helium, argon atau nitrogen) dengan tekanan tertentu dialirkan secara konstan melalui kolom yang berisi fase diam. Selanjutnya sampel diinjeksikan ke dalam injector (*injection port*) yang suhunya dapat diatur. Komponen-komponen dalam sampel akan segera menjadi uap dan akan dibawa oleh aliran gas pembawa menuju kolom. Komponen-komponen akan terabsorpsi oleh fase diam pada kolom kemudian akan merambat dengan kecepatan berbeda sesuai dengan nilai K_d masing-masing komponen sehingga terjadi pemisahan.

Komponen yang terpisah kemudian akan menuju ke detektor dan akan menghasilkan sinyal listrik yang besarnya proporsional dengan komponen tersebut. Sinyal tersebut lalu diperkuat oleh amplifier dan selanjutnya oleh pencatat (*recorder*) dituliskan sebagai kromatogram berupa puncak (*peak*) (Yazid 2005).

2. Komponen alat kromatografi gas

Adapun komponen alat kromatografi gas antara lain silinder gas pengangkut, pengatur aliran tekanan, tempat injeksi cuplikan, kolom, detektor dan pencatat (rekorder).

2.1. Gas pembawa. Faktor yang menyebabkan suatu senyawa bergerak melalui kolom kromatografi gas adalah keatsirian yang merupakan sifat senyawa itu dan aliran gas melalui kolom. Aliran gas dipaparkan dengan dua peubah, aliran yang diukur dalam ml/menit dan penurunan tekanan antara pangkal dan ujung kolom. Sifat yang pasti biasanya merupakan hal sekunder yang ditinjau dari segi pemisahannya, tetapi mungkin ada pengaruh kecil pada daya pisah, seperti dibahas pada bagian berikut. Pemilihan gas pembawa sampai taraf tertentu bergantung pada detektor yang dipakai, misalnya hantar bahang (TCD), ionisasi nyala, tangkap elektron atau khas terhadap unsur.

Nitrogen, helium, argon, hidrogen dan karbon dioksida adalah gas yang paling sering dipakai sebagai gas pembawa karena mereka tidak reaktif serta dapat dibeli dalam keadaan murni dan kering dalam kemasan tangki bervolume besar dan bertekanan tinggi. Walaupun helium ataupun hidrogen memberikan kepekaan

terbesar kepada DHB (penghantaran tergantung pada massa gas), kedua gas ini lebih jelas daripada nitrogen karena terjadi lebih banyak aliran (ke samping) dan pencampuran dengan gas yang kerapatannya lebih kecil. Sebuah kromatografi gas biasanya dipasang dengan satu gas pembawa. Detektor pengionan tertentu memerlukan argon, gas yang kerapatannya sangat besar dan alirannya lebih lambat (penurunan tekanan lebih besar). Biasanya nitrogen dipakai dalam detektor ionisasi nyala, walaupun gas lain memang dapat dipakai.

Gas pengangkut atau *Carrier gas* ditempatkan dalam silinder bertekanan tinggi. Biasanya tekanan dari silinder sebesar 150 atm. Tetapi tekanan ini sangat besar untuk digunakan secara langsung. 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. 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. 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)

2.1. Pengatur aliran tekanan. Kecepatan mengalir diatur oleh pengatur tekanan. Biasanya berkisar antara 10 – 50 psi (diatas tekanan ruang), yang membuat kecepatan mengalir sampai 150ml/menit.

2.2. Tempat injeksi cuplikan. Pada umumnya, sampel berupa cairan disuntikkan ke dalam tempat masukan cuplikan permukaan kolom yang suhunya $50^{\circ}C$. Suhu tempat injeksi tidak boleh terlalu tinggi sebab kemungkinan akan terjadi perubahan dari senyawa yang akan dianalisis.

2.4 Kolom. Kolom merupakan tempat berlangsungnya pemisahan komponen campuran. Kolom berupa tabung gelas atau logam (stainless steel, tembaga atau aluminium) dengan panjang 2 – 3 m dengan garis tengah 2 – 4 mm. tabung ini biasanya dibentuk melingkar agar mudah dimasukkan thermostat (pengatur suhu). Proses pemisahan terjadi di kolom.

2.5 Detektor. Detektor akan mendeteksi komponen-komponen yang meninggalkan kolom. Detektor ini didasarkan pada perubahan daya hantar panas aliran gas yang disebabkan oleh adanya molekul analit.

2.6 Rekorder. Alat ini akan mencatat hasil percobaan pada lembaran kertas berupa kumpulan puncak yang disebut kromatogram (Hendyana 1994)

F. Metode Analisis

Metode analisis bakteri menggunakan kromatografi gas dengan reaksi esterifikasi FAME (*Fatty Acid Methyl Esters*) yang terdiri dari serangkaian proses saponifikasi, metilasi, ekstraksi dan pembersihan sampel (Sasser 2006).

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 -CO₂ 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).

1. Saponifikasi

Saponifikasi merupakan salah satu metode pemurnian secara fisik. Saponifikasi dilakukan dengan menambahkan basa pada minyak yang akan dimurnikan. Penambahan basa pada proses saponifikasi akan bereaksi dengan asam lemak bebas membentuk sabun yang mengendap dengan membawa serta lender, kotoran dan sebagian zat warna. Saponifikasi adalah suatu proses untuk

mereaksikan asam lemak bebas dengan basa atau pereaksi lainnya sehingga membentuk sabun (*soap stock*) (Ketaren 1986).

2. Metilasi

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

3. Ekstraksi

Ekstraksi adalah metode pemisahan suatu komponen solute (cair) dari campurannya menggunakan sejumlah massa solven sebagai tenaga pemisah. Proses ekstraksi terdiri dari tiga langkah besar, yaitu proses pencampuran, proses pembentukan fasa setimbang dan proses pemisahan fasa setimbang. Solven merupakan faktor terpenting dalam proses ekstraksi, sehingga pemilihan solven merupakan faktor penting. Solven ini harus saling melarutkan terhadap salah satu komponen murninya, sehingga diperoleh dua fasa rafinat. Proses ekstraksi dapat berjalan dengan baik bila pelarut ideal harus memenuhi syarat-syarat yaitu selektivitasnya tinggi, memiliki perbedaan titik didih dengan solute cukup besar, bersifat inert, perbedaan densiti cukup besar, tidak beracun, tidak bereaksi secara kimia dengan solute maupun diluen, viskositasnya kecil, tidak bersifat korosif, tidak mudah terbakar, murah dan mudah didapat. Beberapa faktor yang berpengaruh dalam proses ekstraksi adalah temperatur, waktu kontak, perbandingan solut, faktor ukuran partikel, pengadukan dan waktu dekantasi (Dian dan Intan 2010).

G. Landasan Teori

Salmonella typhi merupakan bakteri Gram negatif yang berbentuk batang yang menyebabkan demam tifoid. Pada umumnya *Salmonella* bersifat patogen terhadap manusia bila masuk melalui mulut, tidak selalu *Salmonella typhi* yang masuk ke dalam saluran pencernaan yang akan menyebabkan infeksi, untuk menimbulkan infeksi *Salmonella typhi* harus dapat mencapai usus halus (Brooks 2007).

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 menggunakan koloni tersebut. Sering membutuhkan waktu lebih dari 24 jam (Yuwono 2012).

Menurut Jawetz *et al* 2012, kurva pertumbuhan bakteri diuraikan menjadi 4 fase : 1. Fase lamban (*lag*); 2. Fase eksponensial; 3. Fase stationer puncak; 4. Fase penurunan : Fase kematian. Fase lamban (*lag*) merupakan periode beradaptasi terhadap lingkungan barunya. Fase eksponensial adalah saat sel-sel dalam keadaan setimbang. Fase stationer puncak terjadi kehilangan sel yang lamban melalui kematian yang diimbangi oleh pembentukan sel-sel baru melalui pertumbuhan dan pembelahan sel. Fase penurunan/fase kematian, 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.

James dan Martin (1952) pertama kali dilaporkan sukses melakukan pemisahan dengan kromatografi gas - cair, metode ini dikembangkan lebih cepat daripada teknik analisis lainnya. Lebih dari 100 komponen yang berbeda telah dipisahkan menggunakan kromatografi kolom tunggal (Desty *et al* 1961), dan detektor mampu mengidentifikasi sedikitnya 10-13 g komponen telah dikembangkan (Lovelock 1961) dan digunakan secara luas. Campuran kompleks telah dipisahkan dalam beberapa menit, dan campuran sederhana telah dilakukan secara kromatografi dalam detik (Desty *et al* 1961).

Kromatografi gas ini juga digunakan untuk ekstraksi simultan dan transesterifikasi lipid pada bakteri yang telah diadopsi oleh Peterson, deSchmertzing, dan Abel (1962) penelitian ini menggunakan 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*. Berdasarkan alasan – alasan inilah, kromatografi kemudian menjadi pilihan utama dalam

membantu mengatasi permasalahan dalam dunia bioteknologi, farmasi, klinik dan kehidupan manusia secara umum.

Kromatografi gas merupakan metode pemisahan suatu campuran menjadi komponen-komponen berdasarkan interaksi tersebut yaitu fase gerak dan fase diam. Fase gerak berupa gas yang stabil sedangkan fase diam bisa zat padat (GSC = *Gas Solid Chromatography*), atau zat cair (GLC = *Gas Liquid Chromatography*). Cuplikan yang dapat dipisahkan dengan metode ini harus mudah menguap. Metode ini bekerja sangat cepat sehingga dalam waktu beberapa detik dapat memisahkan secara sempurna. Cuplikan dalam bentuk uap dibawa oleh aliran gas ke dalam kolom pemisah, hasil pemisahan dapat dianalisis dari kromatogram. Kromatogram adalah kurva yang diperoleh dari pengukuran kromatografi, dan alat yang digunakan disebut kromatograf (Hendyana 1994).

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).

Metode yang digunakan dalam pengujian ini adalah menggunakan metode kromatografi gas dengan FAME (*Fatty Acid Methyl Esters*). Prinsip kerja metode ini adalah variasi waktu inkubasi pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* dimana terdapat tiga waktu (masing – masing 6, 12, 24, 36 dan 48 jam), dari masing – masing hasil inkubasi tersebut selanjutnya akan diproses dengan beberapa tahap, pertama tahap saponifikasi, selanjutnya dilakukan metilasi, ekstraksi, kemudian dilakukan proses pencucian. Hasil dari proses pencucian ini menjadi sampel yang akan di analisis dengan menggunakan kromatografi gas, dan kemudian analisis puncak/peak hasil identifikasi bakteri *Salmonella typhi*.

H. Hipotesis

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

Pertama, kromatografi gas dapat menganalisis senyawa yang dihasilkan oleh bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 pada waktu pertumbuhan kurang dari 24 jam.

Kedua, ada perbedaan pola kromatogram dari senyawa yang dihasilkan oleh bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 dalam berbagai variasi waktu inkubasi.

Ketiga, kromatografi gas dapat memberikan waktu inkubasi yang optimal dalam pada waktu tertentu dalam mengidentifikasi bakteri *Salmonella typhi*.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah biakan bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 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 suspensi dari biakan bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311. Pemilihan bakteri ini mempertimbangkan kondisi bakteri yang sangat sering dijumpai pada penyakit yang menginfeksi manusia.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variable utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah hasil inkubasi bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 dalam berbagai variasi waktu yang diesterifikasi dengan metode FAME dan dianalisis menggunakan kromatografi gas.

2. Variable operasional

Variabel utama dalam penelitian ini diklasifikasikan menjadi 3, yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkontrol. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 dalam berbagai tingkat variasi waktu. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah hasil inkubasi pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 dan pola kromatogram yang dihasilkan dari berbagai waktu inkubasi. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah waktu penelitian, metode ekstraksi asam lemak bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311, kondisi peneliti, kondisi medium, kondisi laboratorium yang digunakan termasuk alat – alat dan bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian.

3. Definisi operasional variable utama

Pertama, bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 adalah bakteri biakan yang diperoleh dari laboratorium Universitas Setia Budi.

Kedua, suspensi bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 adalah suspensi dari biakan bakteri yang dikultur pada media BHI dan disamakan kekeruhanya dengan standart *Mc.Farland 3*.

Ketiga, variasi waktu adalah waktu yang digunakan dalam inkubasi bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 dengan variasi waktu 6, 12, 24, 36 dan 48 jam pada suhu 37°C.

Keempat, hasil inkubasi bakteri adalah hasil inkubasi bakteri dari masing – masing variasi waktu yang ditumbuhkan pada media agar BSA (*Bismuth Sulfite Agar*).

Kelima, sel bakteri adalah hasil inkubasi bakteri yang ditumbuhkan pada waktu tertentu dan dilakukan pengambilan dari media.

Keenam, proses saponifikasi adalah proses saponifikasi yang dilakukan dari sel bakteri yang diambil dari media pada waktu inkubasi tertentu. Proses saponifikasi (penyabunan) digunakan untuk memisahkan asam lemak dari bakteri.

Ketujuh, proses metilasi adalah proses metilasi bakteri hasil dari dilakukan proses saponifikasi. Proses ini berfungsi untuk mengubah asam lemak menjadi asam lemak metil ester.

Kedelapan, proses ekstraksi adalah proses ekstraksi yang dilakukan dari hasil proses metilasi sebelumnya. Proses ini digunakan untuk memisahkan asam lemak metil ester dari senyawa lain yang masih ada dalam hasil proses metilasi.

Kesembilan, proses pencucian adalah proses pencucian yang dilakukan dari hasil ekstraksi asam lemak metil ester. Proses ini bertujuan untuk membersihkan hasil asam lemak metil ester dari senyawa pengotor.

Kesepuluh, asam lemak dari bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 adalah asam lemak hasil proses esterifikasi (saponifikasi, metilasi, ekstraksi dan pencucian).

Kesebelas, pembacaan kromatogram adalah pembacaan puncak kromatogram dari sampel asam lemak bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 hasil dari proses esterifikasi yang dianalisis dengan kromatografi gas.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan utama yang digunakan penelitian ini adalah Bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311, sedangkan pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah sodium hidroksida, metanol, asam hidroklorik, metil alkohol, heksan, metil tert-butyl eter dan aqua destilasi.

Media agar yang digunakan pada penelitian ini adalah BHI (*Brain Heart Infusion*), KIA, SIM, LIA dan Citrat untuk uji biokimia bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311, media agar BSA (*Bismuth Sulfite Agar*) yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri *Salmonella typhi*.

2. Alat

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

D. Jalanya Penelitian

1. Sterilisasi alat

Sterilisasi inkas menggunakan formalin, media agar yang digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Alat-alat dari gelas yang ada ukurannya disterilkan dengan menggunakan oven dan yang tidak ada ukurannya disterilkan dengan oven pada suhu 170-180⁰C selama 2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung (Suriawira 1986).

2. Pembuatan suspensi bakteri uji *Salmonella typhi* ATCC 13311

Pembuatan bakteri uji *Salmonella typhi* ATCC 13311 dalam biakan murni diambil 1 ose steril kemudian dimasukkan secara aseptis kedalam tabung reaksi steril yang sudah berisi 5 ml BHI (*Brain Heart Infusion*) distandarkan dengan

standart *Mc Farland 3* (jumlah bakteri 9.0×10^8) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, selanjutnya digunakan untuk identifikasi (Bonang & Koeswardono 1982).

3. Identifikasi bakteri uji

3.4 Identifikasi secara goresan. Bakteri uji *Salmonella typhi* ATCC 13311 diinokulasikan pada medium efektif BSA (*Bismut Sulfid Agar*) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C , maka penampakan koloninya berwarna hitam di kelilingnya terdapat warna kuning (Bonang & Koeswardono 1982).

3.5 Identifikasi secara biokimia. Uji biokimia dilakukan pada media SIM, KIA, LIA dan Sitrat. Uji pada media SIM biakan murni bakteri diinokulasi pada permukaan media dengan cara tusukan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Identifikasi ini bertujuan untuk menguji adanya sulfid, indol dan motilitas. Uji sulfida positif jika media berwarna hitam. Uji indol positif jika terbentuk warna merah setelah ditambahkan reagen *Ehrlich*. Uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan pada seluruh media.

Uji pada KIA, biakan bakteri diinokulasikan dengan cara tusukan dan goresan kemudian di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui fermentasi karbohidrat, ada tidaknya gas dan sulfida. Jika bagian lereng berwarna merah maka ditulis K, bagian dasarnya berwarna kuning ditulis A, adanya gas ditandai dengan pecahnya atau terangkatnya medium keatas ditulis G(+) dan jika terbentuk warna hitam pada media maka ditulis S(+).

Uji pada media LIA. Inokulasi bakteri dilakukan dengan cara tusukan dan goresan, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya deaminasi lisin dan sulfida. Bagian lereng berwarna merah coklat maka ditulis R, jika berwarna ungu maka ditulis K, jika berwarna kuning maka ditulis A. Medium berwarna hitam maka ditulis S(+) dan jika tidak membentuk warna hitam maka ditulis S(-).

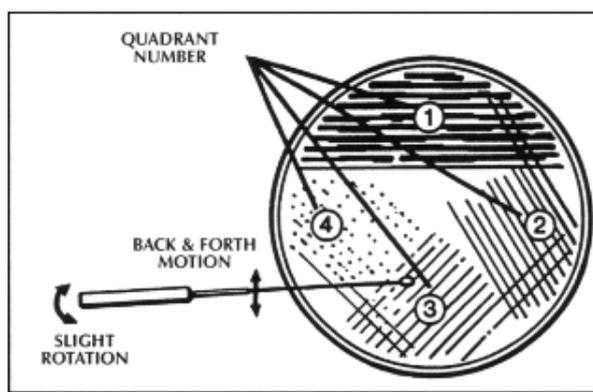
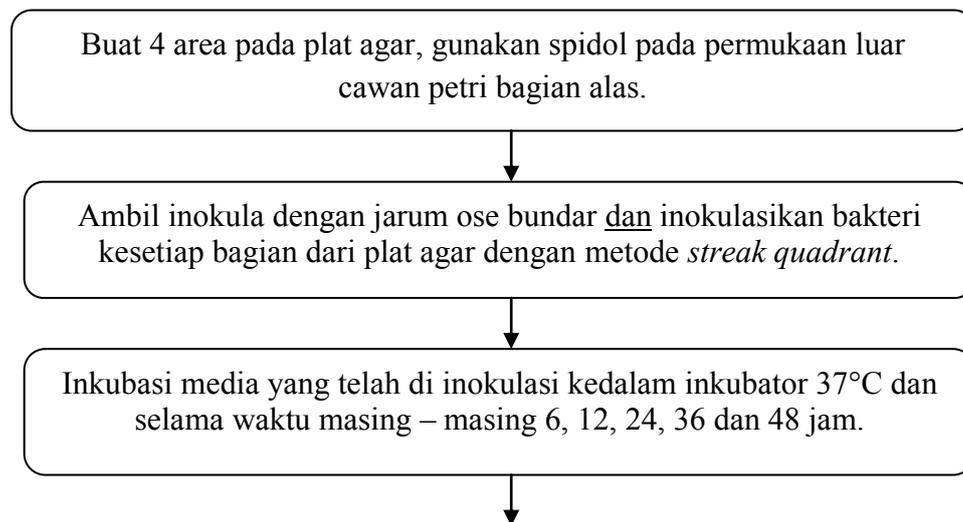
Uji pada media Citrat, bakteri diinokulasikan dengan cara goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan Citrat sebagai sumber karbon utama. Uji ini positif bila media iniberwarna biru (Bridson 1998).

3.3 Identifikasi secara mikroskopis dengan pewarnaan Gram.

4. Pembuatan plat agar

Dipipet 20ml media SSA cair 50°C kedalam cawan petri dan biarkan memadat.

5. Kultur bakteri



Gambar 3. Kultur bakteri

(Sumber : Sasser 2006)

6. Penyiapan reagen

Terdapat beberapa reagen yang digunakan untuk memisahkan asam lemak dari bakteri *Salmonella typhi*:

Reagen 1 : Tahap saponifikasi, 45 g natrium hidroksida, 150 metanol dan 150 ml air suling.

Reagen 2 : Tahap metilasi, 325 ml natrium metanolat dan 275 ml metil alkohol. Menetapkan pH solusi 1,5 dan sebagai metilasi asam lemak. Asam lemak metil ester rendah soluble

Reagen 3 : Ekstraksi, 200 ml heksan dan 200 ml metil tert-butyl eter. Digunakan untuk mengekstrak asam lemak bakteri menjadi fase organik untuk dilakukan 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 asam lemak bakteri *Salmonella typhi*

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

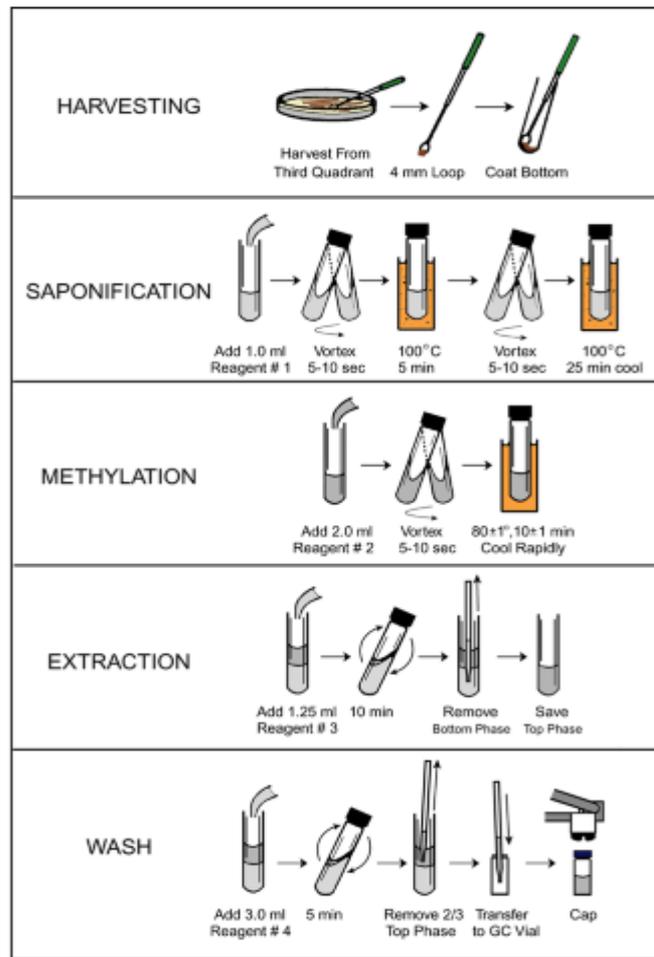
Pertama, Pengambilan bakteri : jarum inokulum digunakan untuk mengambil kurang lebih 40 mg sel bakteri dari kuadran ke tiga, sel bakteri tersebut ditempatkan pada tabung kultur yang bersih

Kedua, 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, lalu vortex tabung secara cepat sekitar 5-10 detik dan kembalikan dalam waterbath panaskan lagi selama 30 menit.

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

Keempat, 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.

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



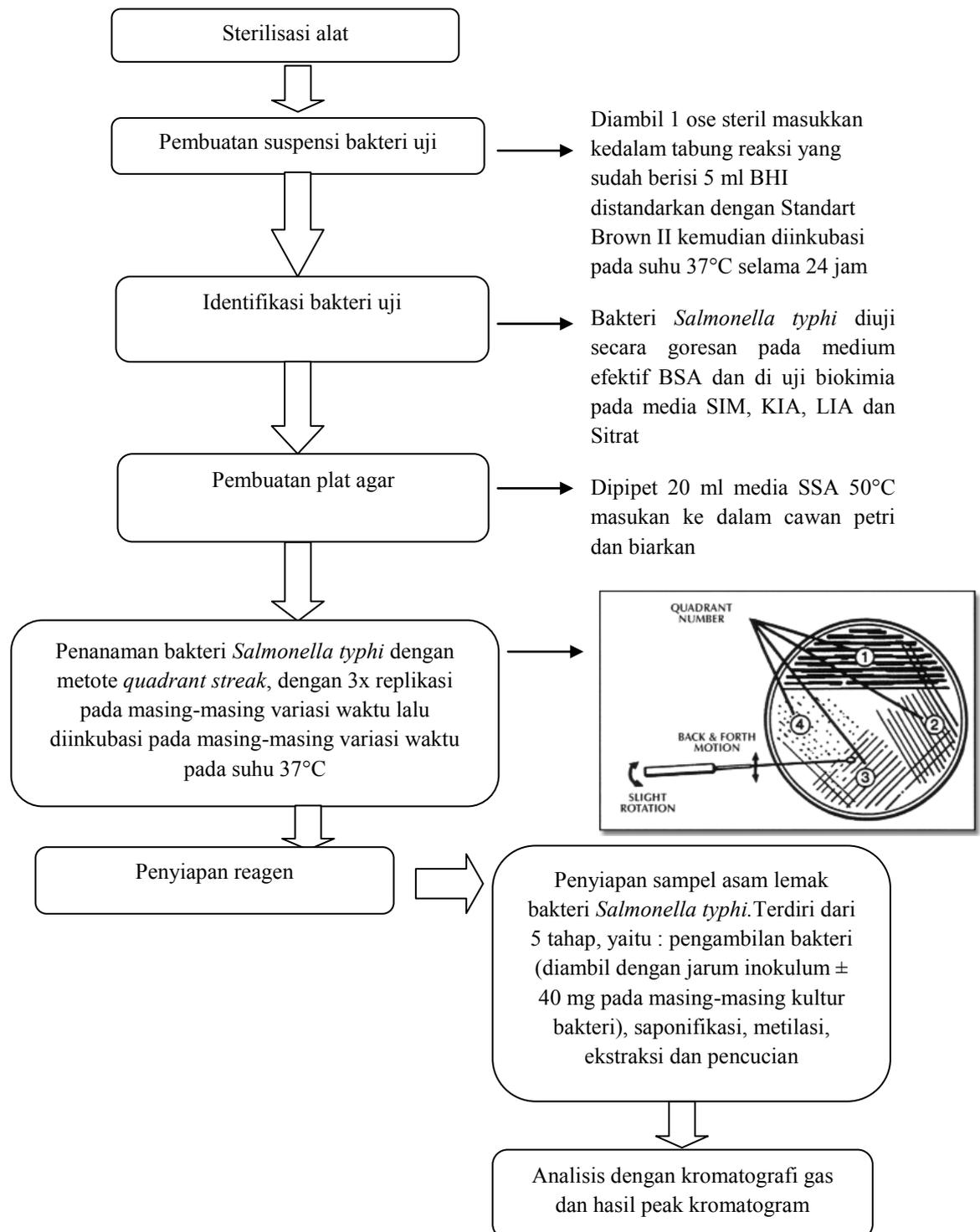
(Sumber : Sasser 2006)

Gambar 4. Penyiapan Sampel

8. Analisis dengan kromatografi gas

Ekstrak asam lemak dari bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 di analisis dengan menggunakan kromatografi gas dan dilakukan identifikasi puncak dari Bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311.

E. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 5. Skema jalannya penelitian

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Sterilisasi

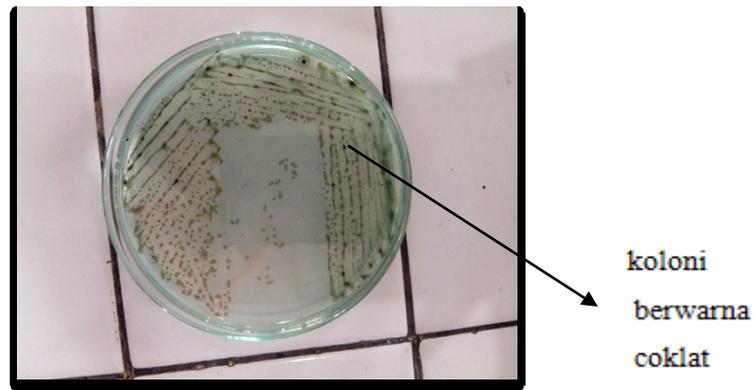
Sterilisasi digunakan untuk mensterilkan alat-alat dari kontaminasi mikroorganisme lain. Alat-alat yang berbahan kaca seperti cawan petri, pipet ukur, tabung reaksi, beaker glass disterilkan dengan oven pada suhu 170-180°C selama 2 jam, sedangkan alat seperti ose disterilkan dengan pemanas api langsung dan inkas disterilkan dengan menggunakan formalin (Suriawira 1985). Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media *Bismuth Sulfit Agar* (BSA) yang dalam pembuatannya tidak memerlukan sterilisasi.

2. Hasil pembuatan suspensi bakteri uji *Salmonella typhi* ATCC 13311

Pembiakan bakteri uji *Salmonella typhi* ATCC 13311 dilakukan dengan mengambil 3 ose bakteri biakan murni dengan menggunakan ose steril kemudian disuspensikan ke dalam 5 ml media *Brain Heart Infussion* (BHI) kemudian diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24 jam, suspensi yang telah terbentuk disamakan tingkat kekeruhanya dengan standart *Mc Farland 3* ($\text{BaCl}_2 - 2\text{H}_2\text{O}$ (1.175%) 3.0 + H_2SO_2 (1%) 97.0).

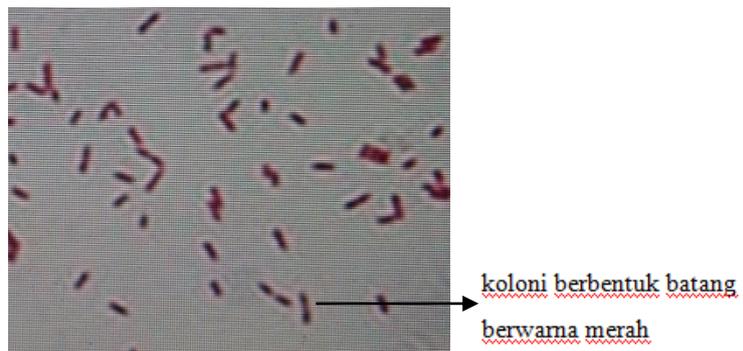
3. Hasil identifikasi bakteri uji *Salmonella typhi* ATCC 13311

3.1. Hasil identifikasi koloni bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 secara makroskopis. Identifikasi bakteri *Salmonella typhi* secara makroskopis dilakukan dengan menginokulasikan suspensi bakteri pada media BSA kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengamatan menunjukkan penampakan koloninya berwarna hitam di kelilingnya terdapat warna kuning (Bonang & Koeswardono 1982). Hasil identifikasi koloni *Salmonella typhi* ATCC 13311 dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 6. Hasil identifikasi makroskopis

3.2. Hasil identifikasi mikroskopis *Salmonella typhi* ATCC 13311 dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan pada Gram menunjukkan adanya koloni berbentuk batang, berwarna merah, sehingga menunjukkan hasil positif untuk bakteri Gram negatif *Salmonella typhi* ATCC 13311. Sel berwarna merah karena pada pengecatan gram tersebut kehilangan ungu kristal ketika dicuci dengan alkohol, dan sewaktu diberi pewarna safranin, tampak berwarna merah. Hasil pewarnaan dapat dilihat pada gambar 7.



Gambar 7. Hasil identifikasi pewarnaan Gram

3.3. Hasil identifikasi uji biokimia bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311. Hasil identifikasi uji biokimia bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil identifikasi uji biokimia pada *Salmonella typhi* ATCC 13311

Pengujian	Hasil	Pustaka (Koneman <i>et al</i> 1983)
SIM	+ - +	+ - +
KIA	K/AG	K/AG
LIA	K/K	K/K
Citrat	+	+

Keterangan :

SIM : Sulfida Indol Motilitas

KIA : Kliger Iron Agar

LIA : Lysine Iron Agar

+ : Reaksi positif

- : Reaksi negatif

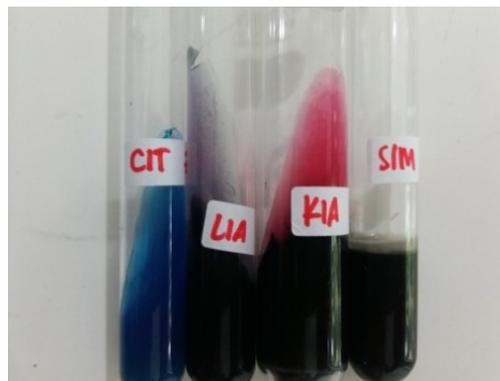
Medium *Sulfida Indol Motilitas* (SIM) untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas. Pengujian dengan media *Sulfida Indol Motilitas* (SIM) setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C menunjukkan hasil + - +, artinya uji H₂S positif ditandai terbentuknya warna hitam pada media *Sulfida Indol Motilitas* (SIM), pada penambahan 3 tetes reagen *erlich* A dan B permukaan media tidak berwarna merah ini berarti uji indol negatif, uji motilitas positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan bakteri di media *Sulfida Indol Motilitas* (SIM) (Koneman *et al* 1983).

Medium *Kliger Iron Agar* (KIA) untuk mengetahui terjadinya fermentasi glukosa dan laktosa, pembentukan gas dari glukosa dan produksi sulfida. Pengujian dengan menggunakan media *Kliger Iron Agar* (KIA) setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C menunjukkan hasil K/AG, Jika hanya glukosa yang difermentasi, lereng dan dasar medium pada awalnya berubah menjadi kuning karena asam yang dihasilkan sedikit, dan seiring dioksidasinya produk fermentasi menjadi CO₂ dan H₂O lalu dilepaskannya dari lereng, serta berlanjutnya dekarboksilasi oksidatif protein dengan pembentukan amina, lereng berubah menjadi basa (merah). *Salmonella* secara khas menghasilkan lereng yang alkalis dan dasar yang asam. G artinya terbentuk gas yang ditandai dengan pecahnya media S⁺ artinya H₂S positif ditunjukkan dengan adanya warna hitam pada media *Kliger Iron Agar* (KIA) (Jawetz *et al* 2012).

Medium *lysine Iron Agar* (LIA) untuk mengetahui deaminasi lisin dan sulfide. Pengujian dengan media *lysine Iron Agar* (LIA) setelah diinkubasi selama

24 jam pada suhu 37°C menunjukkan hasil K/K²⁽⁺⁾, K artinya pada media berwarna ungu, K pada dasar media berwarna ungu, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin, S⁽⁺⁾ artinya uji H₂S positif ditunjukkan dengan adanya warna hitam pada media *lysine Iron Agar* (LIA). Bakteri yang mengalami dekarboksilasi lisin menyebabkan reaksi basa (warna ungu) diseluruh media produksi hidrogen sulfida menyebabkan menghitam di media karena untuk pembentukan sulfida besi (Koneman *et al* 1983).

Medium citrat untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat seagai sumber karbon. Pengujian pada media citrat setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C menunjukkan hasil positif ditandai dengan adanya warna biru pada media. Hal ini menghasilkan perubahan warna media dari hijau ke biru .hal ini menunjukkan bahwa *Salmonella typhi* menggunakan citrat sebagai sumber karbon (koneman *et al* 1983). Hasil identifikasi uji biokimia *Salmonella typhi* 13311 dapat dilihat pada gambar 7.



Gambar 8.Hasil identifikasi uji biokimia

Berdasarkan dari hasil pengujian identifikasi biokimia yang telah dilakukan kemudian dibandingkan dengan ciri-ciri diatas menunjukkan bahwa bakteri yang diamati adalah *Salmonella typhi* ATCC 1311.

Pengujian identifikasi biokimia juga dilakukan pada masing-masing variasi waktu, yaitu 6 jam, 12 jam, 24 jam 36 jam dan 48 jam, hasilnya dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil identifikasi biokimia pada masing-masing variasi waktu

Pengujian	Hasil				
	6 jam	12 jam	24 jam	36 jam	48 jam
SIM	-	+ - +	+ - +	+ - +	+ - +
KIA	-	K/--	K/AG	K/AG	K/AG
LIA	-	K/K	K/K	K/K	K/K
Citrat	-	-	+	+	+

4. Penyiapan sampel asam lemak metil ester bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311

Analisis asam lemak metil ester bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 dengan kromatografi gas dilakukan dengan mengamati asam lemaknya yang diderivatisasi sebagai metil esternya. Salah satu syarat pemisahan campuran dengan kromatografi gas adalah sampel harus mudah menguap. Asam lemak dalam lemak/minyak sukar menguap sehingga perlu diderivatisasi agar dapat dipisahkan secara kromatografi gas.

Derivatisasi asam lemak supaya dihasilkan metil ester asam lemak (*fatty acid methyl ester*) dilakukan sebagai berikut : kultur bakteri yang dilakukan dengan metode *streak quadrant* kemudian diinkubasi pada masing-masing variasi waktu yaitu 6 jam, 12 jam, 24 jam, 36 jam dan 48 jam. Pengambilan koloni bakteri dilakukan dengan jarum inokulum pada quadran ke 3, koloni tersebut ditempatkan pada tabung kultur yang bersih dan steril. Reagen saponifikasi ditambahkan ke dalam tabung yang berisi koloni bakteri, tutup tabung secara aman, vortex sebentar 5-10 detik dan dipanaskan pada waterbath selama 5 menit pada suhu 100°C, vortex kembali 5-10 detik, dan dipanaskan kembali selama 25 menit pada suhu 100°C.

Reagen metilasi ditambahkan ke dalam hasil proses saponifikasi yang telah dingin, divortex 5-10 detik dan dipanaskan pada waterbath selama 10 menit pada suhu 80°C, kemudian penambahan reagen ekstraksi ke dalam hasil proses metilasi yang telah dingin, disentrifuge selama 10 menit, kemudian ambil fase

bawah dari hasil sentrifuge dan biarkan fase atasnya. Proses ini digunakan untuk mengekstrak asam lemak bakteri menjadi fase organik agar dapat dilakukan analisis dengan menggunakan kromatografi gas.

Reagen pencucian ditambahkan ke dalam tabung yang berisi fase atas hasil proses ekstraksi, disentrifuge selama 5 menit, kemudian pipet 2/3 fase atasnya dan dipindahkan ke dalam tabung vial. Prosedur ini dimaksudkan untuk mengurangi kontaminasi pada injektor, kolom dan detektor. Asam lemak metil ester bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 siap dianalisis menggunakan kromatografi gas.

5. Pemilihan kondisi kromatografi gas

5.1 Pemilihan suhu awal kolom untuk analisis asam lemak bakteri.

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, luas area, *High Equivalent to a Theoretical Plate* (HETP), jumlah pelat teoritis (N), pemisahan (resolusi). Jumlah pelat teoritis dan HETP merupakan parameter untuk mengukur efisiensi kolom, dimana bila suatu metode memiliki nilai efisiensi kolom yang tinggi maka pemisahan yang terjadi juga akan baik. Suatu metode memiliki efisiensi kolom yang baik bila nilai N tinggi atau HETP kecil.

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 di atas 100°C bertujuan untuk mencegah terjadinya kondensasi uap

air sehingga mengakibatkan pengkaratan pada detector ionisasi nyala atau penghilangan (penurunan) sensitivitasnya (Gandjar & Rohman, 2007).

Optimasi suhu awal kolom divariasikan dengan suhu 120, 140, 150 dan 170°C (Lampiran 13). Dari ke empat variasi suhu kolom ini diperoleh kondisi analisis optimum untuk menganalisis sampel asam lemak bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 adalah pada suhu kolom 120°C.

Berdasarkan percobaan memvariasikan suhu kolom terlihat bahwa semakin tinggi suhu kolom, maka waktu retensi sampel asam lemak metil ester bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 semakin cepat. Hal ini disebabkan semakin tinggi suhu kolom, maka komponen sampel akan lebih cepat menguap terbawa oleh gas pembawa sehingga waktu kontak dengan sampel dengan fase diam menjadi lebih singkat.

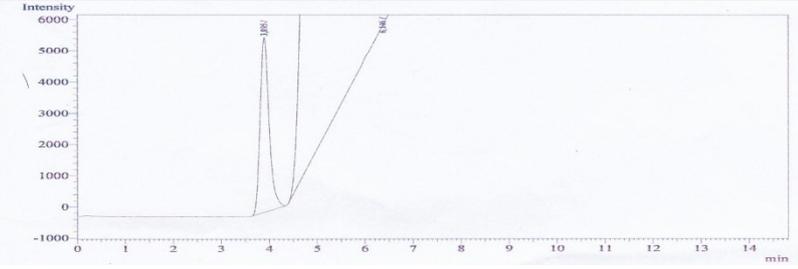
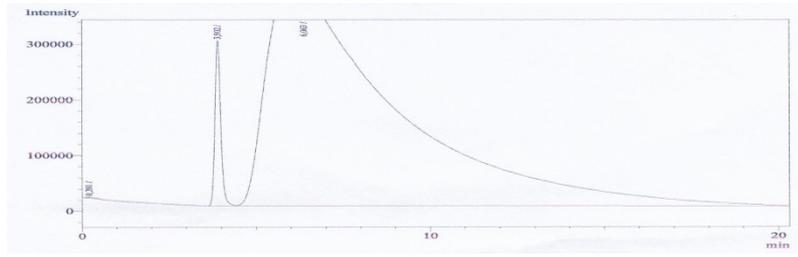
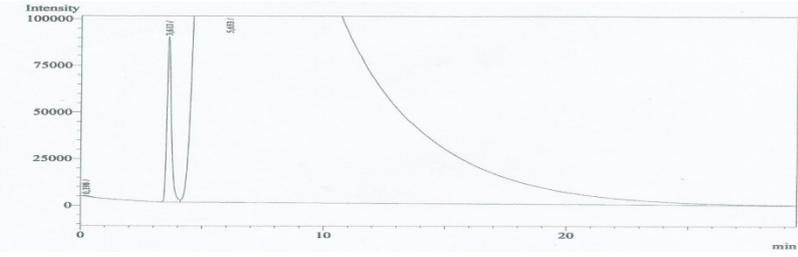
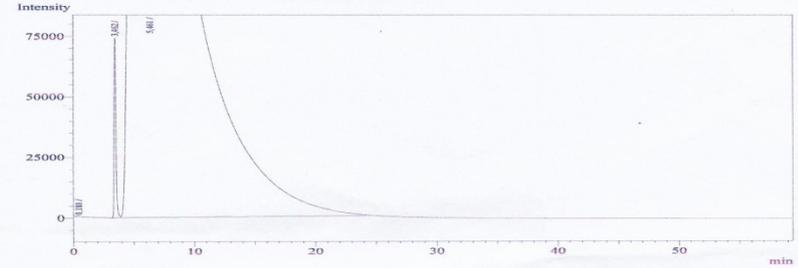
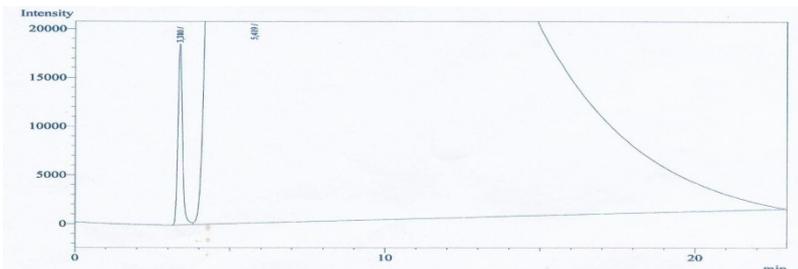
5.2 Pemilihan laju alir. Laju alir gas pembawa N₂ dibuat bervariasi yaitu 100 dan 140 ml/menit, pada percobaan memvariasikan laju alir gas pembawa terlihat bahwa semakin cepat laju alir gas, maka waktu retensi asam lemak metil ester bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 semakin singkat. Terlihat pada kromatogram, puncak asam lemak metil ester bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 keluar lebih cepat. Berdasarkan hasil percobaan laju alir menghasilkan kondisi analisis optimum pada penelitian ini adalah 100 ml/menit.

6. Hasil analisis sampel asam lemak metil ester bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 menggunakan kromatografi gas.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya asam lemak metil ester pada sampel yang dianalisis menggunakan kromatografi gas, dengan suhu analisis optimum, yaitu suhu awal kolom 120°C dinaikan sampai 240°C dengan kenaikan 10°/menit lalu di pertahankan selama 20 menit, suhu injektor 200°C, suhu detektor 230°C dan laju alir gas 100 ml/menit.

Berdasarkan penelitian didapatkan hasil analisis asam lemak metil ester bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 sebagai berikut :

Tabel 3. Hasil kromatogram asam lemak metil ester bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311

Waktu inkubasi	Hasil kromatogram
6 jam	 <p>Chromatogram showing intensity versus time (min) for 6 hours incubation. The y-axis ranges from -1000 to 6000. Two peaks are visible, labeled with retention times 4.201 and 6.501.</p>
12 jam	 <p>Chromatogram showing intensity versus time (min) for 12 hours incubation. The y-axis ranges from 0 to 300000. Two peaks are visible, labeled with retention times 4.201 and 6.501.</p>
24 jam	 <p>Chromatogram showing intensity versus time (min) for 24 hours incubation. The y-axis ranges from 0 to 100000. Two peaks are visible, labeled with retention times 4.201 and 6.501.</p>
36 jam	 <p>Chromatogram showing intensity versus time (min) for 36 hours incubation. The y-axis ranges from 0 to 75000. Two peaks are visible, labeled with retention times 4.201 and 6.501.</p>
48 jam	 <p>Chromatogram showing intensity versus time (min) for 48 hours incubation. The y-axis ranges from 0 to 20000. Two peaks are visible, labeled with retention times 4.201 and 6.501.</p>

Berdasarkan hasil kromatogram sampel asam lemak metil ester bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 yang dibandingkan dengan hasil kromatogram pelarut dan media (Lampiran 9 dan lampiran 10) diketahui adanya perbedaan puncak pada sampel dengan pelarut dan media. Puncak yang berbeda tersebut diyakini adalah asam lemak metil ester dari bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311. Hasil waktu retensi pada analisis sampel asam lemak metil ester bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 pada inkubasi 6 jam = 3,895, 12 jam = 3,935, 24 jam = 3,737, 36 jam = 3,468, 48 jam = 3,335. Hasil waktu retensi dan luas area dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil waktu retensi dan luas area

Inkubasi pada Jam ke -	Hasil waktu retensi dan luas area identifikasi sampel asam lemak bakteri <i>Salmonella typhi</i> 13311	
	Waktu retensi	Luas area
6	3,895	72892
12	3,935	35379312
24	3,737	1865876
36	3,468	2101175
48	3,335	366790

Berdasarkan hasil analisis dengan kromatografi gas yang dibandingkan dengan hasil uji biokimia (Lampiran 6) dan hasil kultur bakteri (Lampiran 5) menunjukkan bahwa pada waktu inkubasi 6 jam bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 secara uji biokimia dan kultur bakteri belum dapat diidentifikasi, sedangkan dengan menggunakan kromatografi gas bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 sudah dapat diidentifikasi asam lemak metil esternya.

Perbedaan waktu retensi pada setiap variasi waktu inkubasi tersebut kemungkinan dipengaruhi oleh kurva pertumbuhan bakteri, dimana pada setiap fase pertumbuhan bakteri menghasilkan metabolisme yang berbeda-beda. Penguapan zat yang terkandung dalam sampel pada proses penyiapan sampel juga diduga menjadi penyebab perbedaan waktu retensi dan luas area.

Menurut hasil penelitian yang dilakukan oleh Florence Dubois-Brissonnet *et al* (2010), komposisi asam lemak *Salmonella Typhi* mengandung sembilan

asam lemak utama yang dikelompokkan dalam empat kelas : asam lemak jenuh, asam lemak tak jenuh, asam lemak hidroksilasi, dan asam lemak siklopropana. Mereka masing-masing mengacu pada (i) asam laurat (C12), asam miristat (C14), asam palmitat (C16), dan asam stearat (C18) proporsi, (ii) asam palmitoleat (cis9 C16: 1) dan cis-vena asam (cis11 C18: 1) proporsi, (iii) asam 3-hidroksi-myristic (3-OH C14), dan (iv) asam cis-9,10-metilen-heksadekanat (Δ C17) dan asam laktobasilat (Δ C19) proporsi.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

Pertama, kromatografi gas mampu menganalisis senyawa yang dihasilkan oleh bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 pada waktu inkubasi kurang dari 24 jam yaitu pada waktu inkubasi 6 jam dan 12 jam

Kedua, terdapat perbedaan pola kromatogram dari asam lemak yang dihasilkan oleh bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 dalam berbagai variasi waktu inkubasi yang ditunjukkan dari hasil waktu retensi dan luas area

B. Saran

Pertama, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menganalisis senyawa yang ada di dalam asam lemak bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 menggunakan kromatografi gas spektrometri massa (GC-MS).

Kedua, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dalam mengidentifikasi asam lemak metil ester dalam bakteri sampel dari manusia (urin/feses)

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous. 2001. *Salmonella typhi – Material Safety Data Sheet-Infectious Substances*. Public health Agency of Canada.
- Benner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. 1984. *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*. Second edition. Baltomor London. 416-429.
- Brooks, G.F., Butel, J.S., Morse, S.A. *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick & Adelberg*. Ed-23, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta. 2007.
- Brock, TD.& Mandigan, MT. 1991. *Biology of Microorganisms*. Sixth ed. Pretince Hall International, Inc
- Bonang Gerhard, S. Enggar dan Koeswardono. 1982. *Mikrobiologi Kedokteran*. P.T Gramedia, Jakarta.
- Ballesteros, I., M., et al. 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> [diakses 7 Oktober 2016]
- Charis A, et al. 2009. *Seleksi Bakteri Salmonella typhi Dari Kultur Penderita Demam Tifoid*. Universitas Negeri Yogyakarta.
- Cui, S.W. 2005. *Structural Analysis of Polysaccharides*. Taylor & Francis Group, LLC.
- Damianus L, Edhi S. 2008. *Mikrobiologi Farmasi Indonesia*. Universitas Sanata Dharma Yogyakarta
- Darmawanti, S. Dan Haribi, R. 2005. *Analisis Profil Protein Pilli Salmonella typhi Isolat Rumah Sakit Karyadi Semarang*. Jurnal Litbang Universitas Muhammadiyah Semarang, 3(2).
- Djoko, H.K. 1987. *Beberapa catatan tentang bakteri Salmonella*. Oseanna, Volume XII, Nomor 4 : 79 – 90.
- Dorland, Newman. 2002. *Kamus Kedokteran Dorland*. Edisi 29, Jakarta : EGC, 1765
- Febiana, T. 2012. *Kajian Rasionalitas Penggunaan Antibiotik di Bangsal Anak RSUP dr. Karyadi Semarang Periode Agustus-Desember 2011*. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang
- Fessenden dan Fessenden. 1982. *Kimia Organik Jilid 1*. Jakarta : Erlangga

- Florence Dubois-Brissonnet, Murielle Naïtali, Akier Assanta Mafu, Romain Briandet. 2010. *Induction of Fatty Acid Composition Modifications and Tolerance to Biocides in Salmonella enterica Serovar Typhimurium by Plant-Derived Terpenes*. Applied and environmental microbiologi. American society for microbiologi.
- Gladwin, R. 2008. *Methylation*. In *Encyclopedia of Cancer and Society*, Sage Publications.
- Grossman, D A (DA); Witham, N D (ND); Burr, D H (DH); Lesmana, M (M); Rubin, F A (FA); Schoolnik, G K (GK); Parsonner, J (J). 1995. *Flagellar serotypes of Salmonella typhi in Indonesia: relationships among motility, invasiveness, and clinical illness*. The Journal of infectious diseases (J Infect Dis). United States. (171):212-216.
- Gandjar, I.G., dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Hatta, M., Smits, Henk, L. 2007. *Detection of Salmonella typhi by nested polymerase chain reaction in blood, urine, and stool samples*. The American journal of tropical medicine and hygiene (Am J Trop Med Hyg), published in Uneted States.
- Hedyana, S., A. Kodarohman, A.A. Sumarna, dan A. Supriana. 1994. *Kimia Analitik Instrumen*. IKIP Semarang press, Semarang.
- Hardioetomo, R.S. 1985. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek*. PT. Gramedia. Jakarta.
- Juwita S, Hartoyo E, Budiarti LY. 2013. *Pola Sensitivitas In Vitro Salmonella typhi Terhadap Antibiotik Kloramfenikol, Amoksisilin, dan Kotrimoksazol*. *Berkala Kedokteran*. 9(1):21-29.
- Jawetz., et al. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta : Rajawali Press.
- Jawetz, E, J. melnick, et al., 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
- Joklik WK, Willet HD, Amos DB, Wilfert CM. *Zinsser microbiology*. 19thed. New York: Prentice Hall International; 1993.

- 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.
- Knight, C.G. 1981. *Liposomes : from Physical Structure to Therapeutic Applications*. Bab 3, Szoka F., Papahadjopaulus D., Elsevier, North Holland, 51-69.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. *Profil Data Kesehatan Indonesia Tahun 2011*. Jakarta. Kemenkes RI. 2012
- Ketaren, S. 1986. *Pengantar Teknologo Minyak dan Lemak Pangan*. Jakarta : Universitas Indonesia. Jakarta
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Win, Jr. 1992. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Fourth edition. J.B. Lippincott Company. Philadelphia.
- Maier, RM., Pepper, IL., Gerba, CO. 2000. *Environmental Microbiology. Printed in the United States of Amerika*.
- Marleni M. 2012. *Ketepatan Uji Tubex TF dibandingkan Nested-PCR dalam Mendiagnosis Demam Tifoid pada Anak pada Demam hari ke-4*. Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya. Palembang.
- Muchtadi, D. 2005. *Oligosaakarida yang menyehatkan*. Departemen of Food Science and Technology IPB. Bogor.
- Sasser, M. 2006. *Bacterial Identification by Gas Chromatographic Analysis of Fatty Acid Methyl Esters (GC-FAME)*. 125 Sandy Drive Newark, DE 19713. www.midi-inc.com [Diakses 10 Oktober 2016]
- Oslen S.J et al. 2004. *Evaluation of rapid diagnostic tests for typhoid fever*. Journal of Clinical Microbiology. 1885-1889.
- 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.
- Punjabi, N.H. 2004. *Demam Tifoid dan Imunisasi Terhadap Penyakit ini*. U.S.NAMRU-2, Jakarta. [http://www.papdi.Or.id/Imunisasi/demam typhoid dan imunisasi terh.htm](http://www.papdi.Or.id/Imunisasi/demam_typhoid_dan_imunisasi_terh.htm) [Diakses 2 November 2016]
- Pradhika, E. I. 2008. *Isolasi Mikroorganisme*. <http://ekmon-saurus.blogspot.com/2008/11/bab-4-isolasi-mikroorganisme.html/>. Diakses :9 September 2016.
- Radji, M. 2011. *Mikrobiologi. Buku Kedokteran*. ECG. Jakarta.

- Raflizal dan Herawati MH. *Hubungan Faktor Determinan dengan Kejadian Tifoid di Pulau Jawa*. Jurnal Ekologi Kesehatan. 2010;9(4):1357-1365.
- Robards, K., Haddad, P.R., and Jackson, P. 1994. *Principles and practice of modern chromatography methods*. Academic press, Australia.
- Roswiem AP. 2006. Karbohidrat. Dalam Roswiem et al., editor. *Biokimia Umum Jilid 1*. Bogor : Departemen Biokimia FMIPA IPB. 142 hlm
- Syahrurachman Agus dkk. 1994. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta : Binarupa Aksara.
- Suriawiria, U., 1985. *Mikrobiologi dasar dalam praktek*. Gramedia. Jakarta.
- Sastrohamidjojo, Hardjono, Dr., 1985. *Analisis Kromatografi*. ITB. Yogyakarta.
- Talaro, K.P. and Talaro A. 2002. *Foundantion in Microbiologi. Fourth edition*. Mc Graw Hill. 612-617.
- Tia Febiana. 2012. *Kajian Rasionalitas Penggunaan Antibiotik Di Bangsal Anak RSUP Dr. Kariadi Semarang Periode Agustus-Desember 2011*. Universitas Diponegoro
- Wain J., Diept TS., Bay OV., Wals AL. Vinh H., Duong NM. 2008. *Speciments and cultute media for the laboratory diagnosis of typhoid fever*. J Infect Dew Ctries.
- Yazid, Estien. 2005. *Kimia Fisika untuk Paramedis*. Yogyakarta: Andi.
- Yuwono. *Staphylococcus aureus dan Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. Palembang : Departemen Mikrobiologi FK Unsri : 2012

L

A

M

P

I

R

A

N

Lampiran 1. Foto alat



a



b



c



d



e



f



g



h

Keterangan :

- a : Inkubator
- b : Timbangan analitik
- c : Autoklaf
- d : Inkas
- e : Oven
- f : Sentrifuge
- g : Spuid Injektor
- h : Sentrifuge

Lampiran 2. Foto bahan



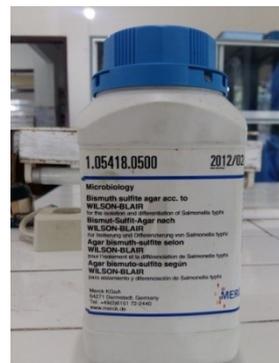
a



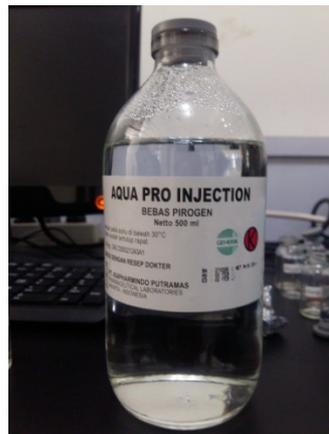
b



c



d



e

- a : Methyl tert butyl ether
- b : Methanol
- c : n-Heksan
- d : Media BSA
- e : Aqua bidest

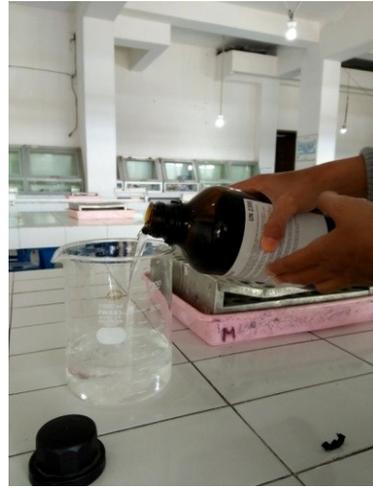
Lampiran 3. Foto suspensi bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 dan standart Mc Farland 3.



Lampiran 4. Penyiapan reagen



a. Penyiapan reagen saponifikasi



b. Penyiapan reagen ekstrak



c. Penyiapan reagen metilasi

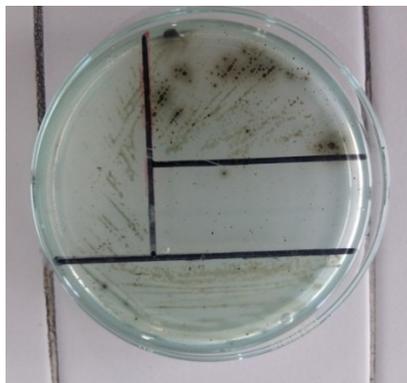


d. Penyiapan reagen pencucian

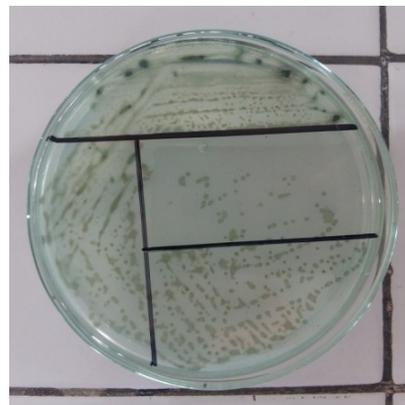
Lampiran 5. Foto kultur bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 pada variasi waktu.



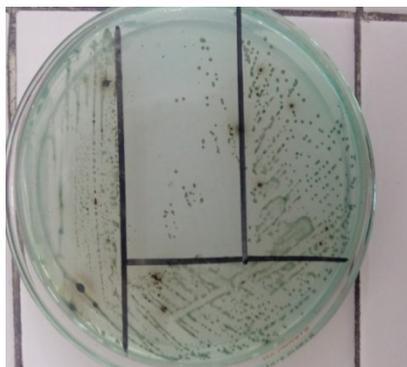
a. Kultur bakteri selama 6 jam



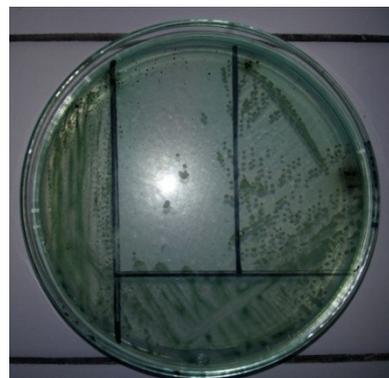
b. Kultur bakteri selama 12 jam



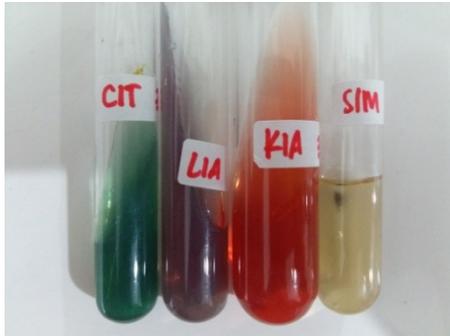
c. Kultur bakteri selama 24 jam



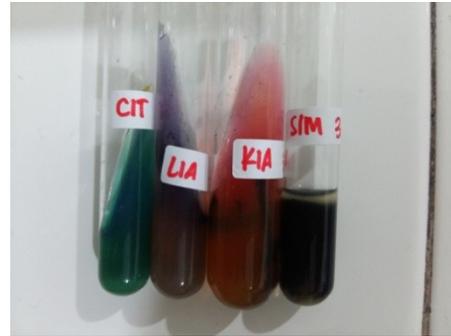
d. Kultur bakteri selama 36 jam



e. Kultur bakteri selama 48 jam

Lampiran 6. Hasil uji biokimia pada masing-masing variasi waktu inkubasi

1. Uji biokimia 6 jam



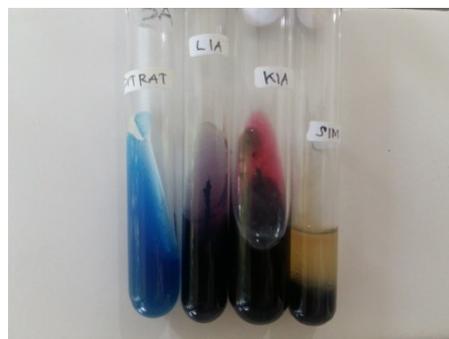
2. Uji biokimia 12 jam



3. Uji biokimia 24 jam



4. Uji biokimia 36 jam



5. Uji biokimia 48 jam

Lampiran 7. Penyiapan sampel asam lemak bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311.



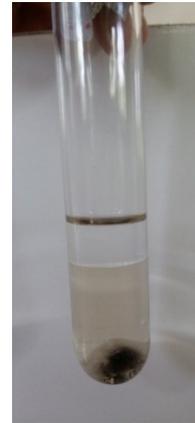
a. Hasil proses saponifikasi



b. Hasil proses metilasi



c. Hasil proses ekstraksi



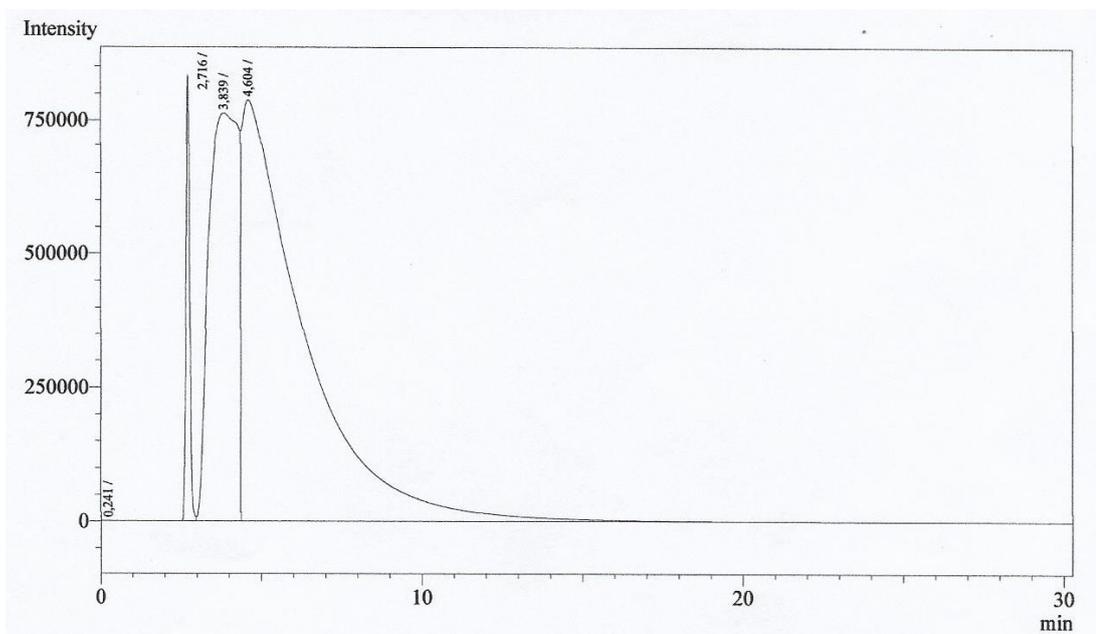
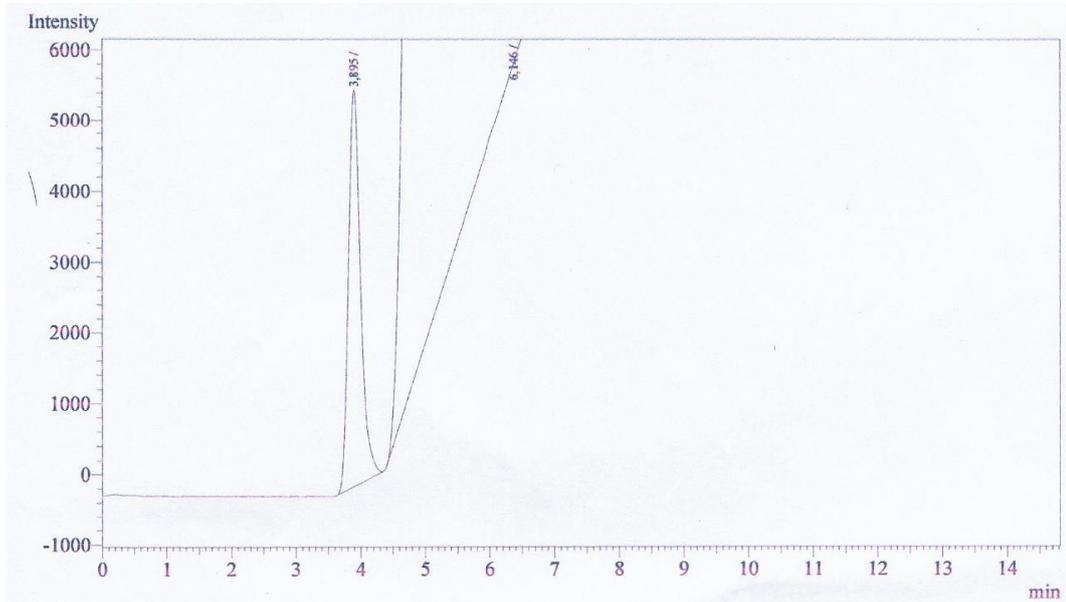
d. Hasil proses pencucian

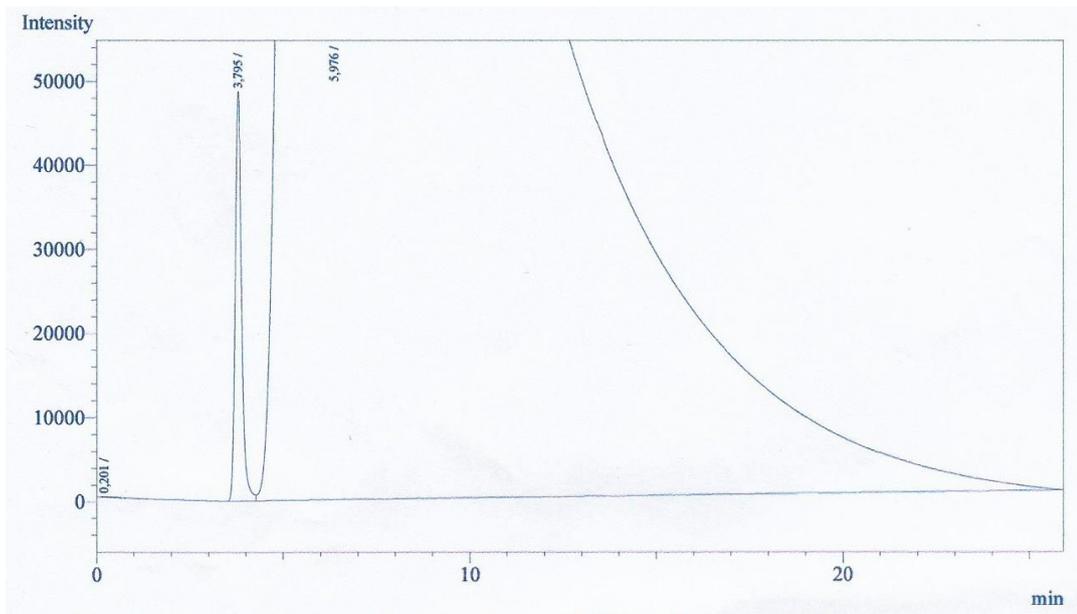


e. Hasil sampel

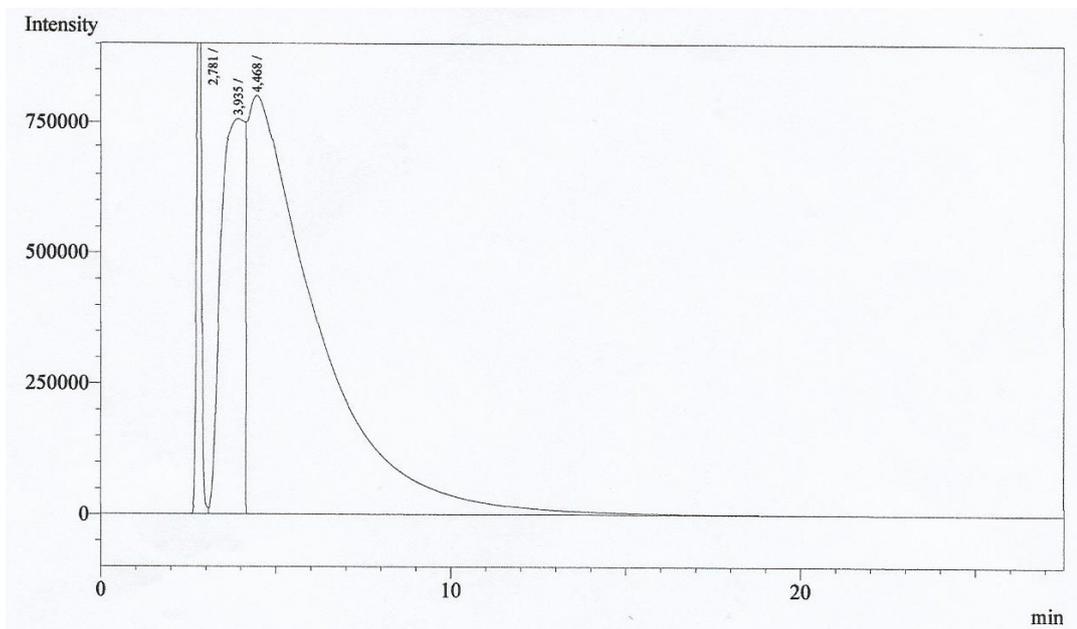
Lampiran 8. Hasil kromatogram asam lemak bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311.

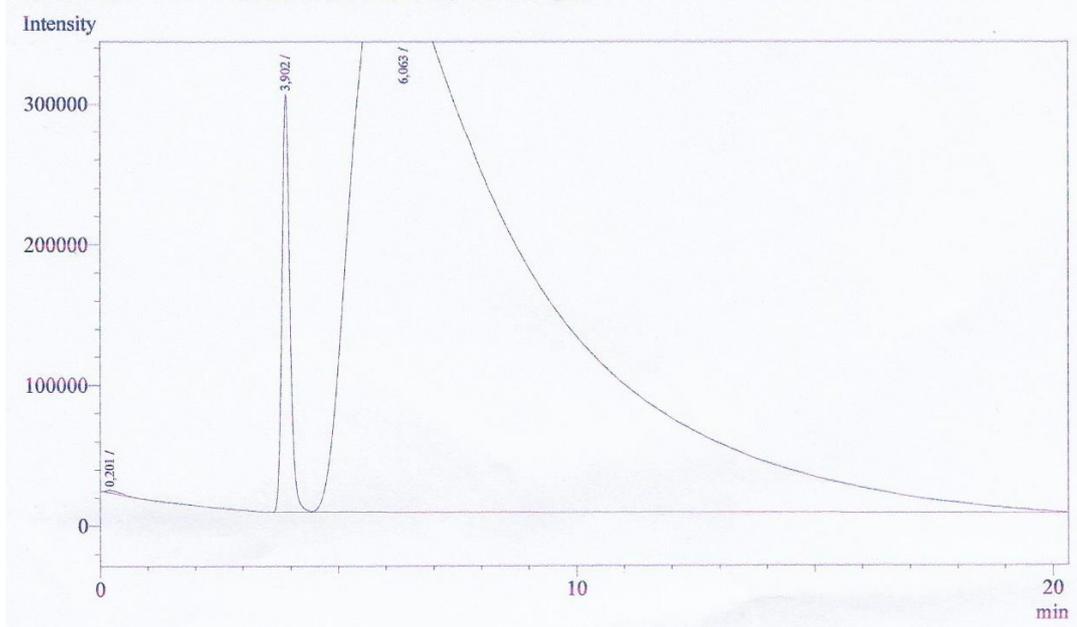
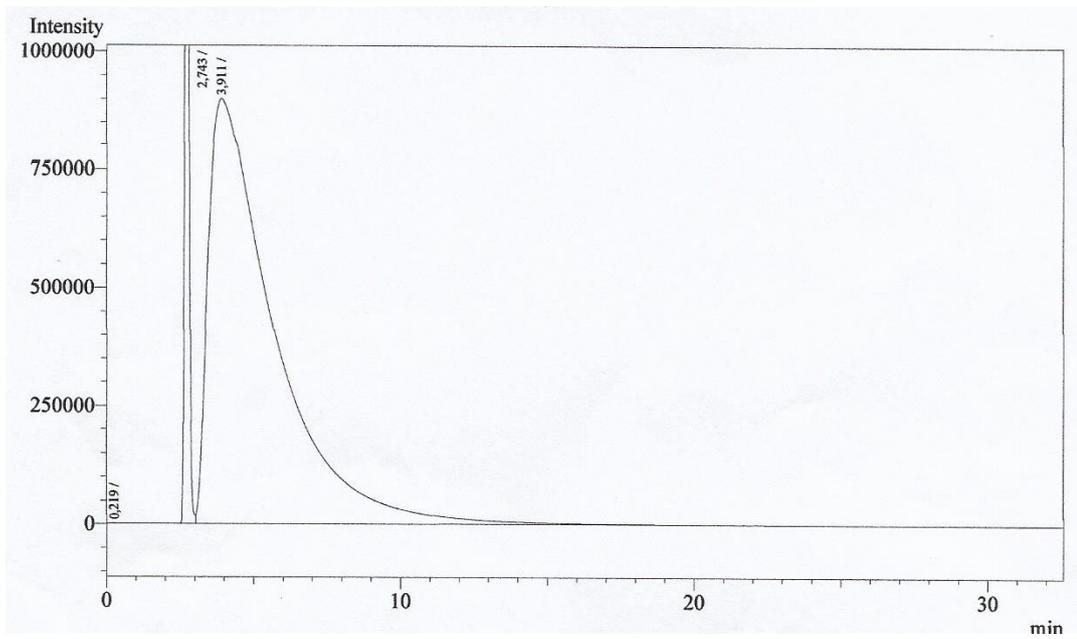
1. *Salmonella typhi* 6 jam



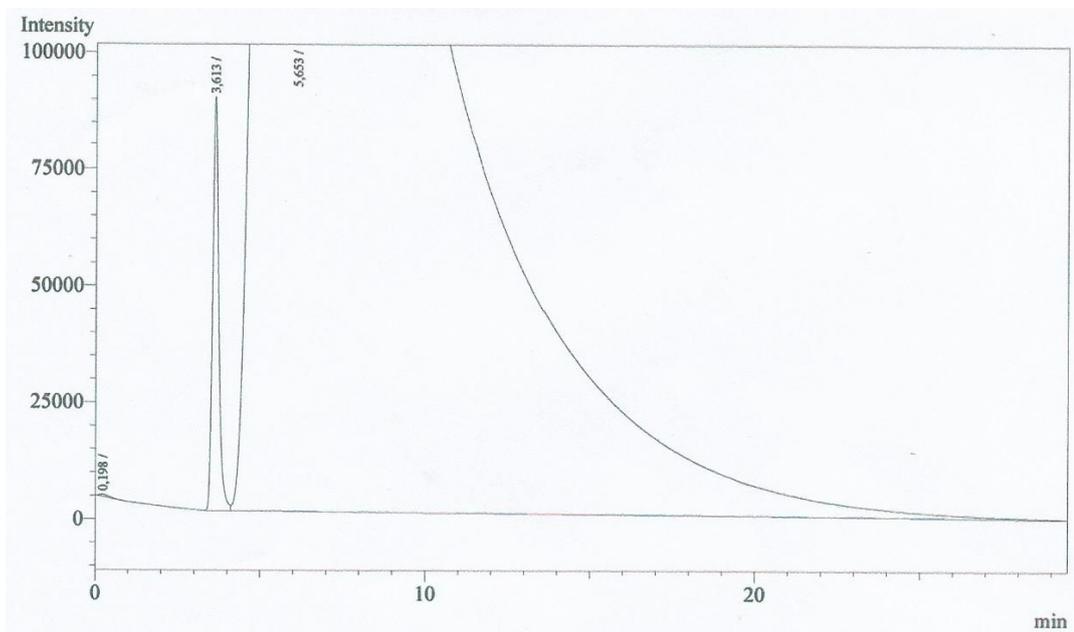
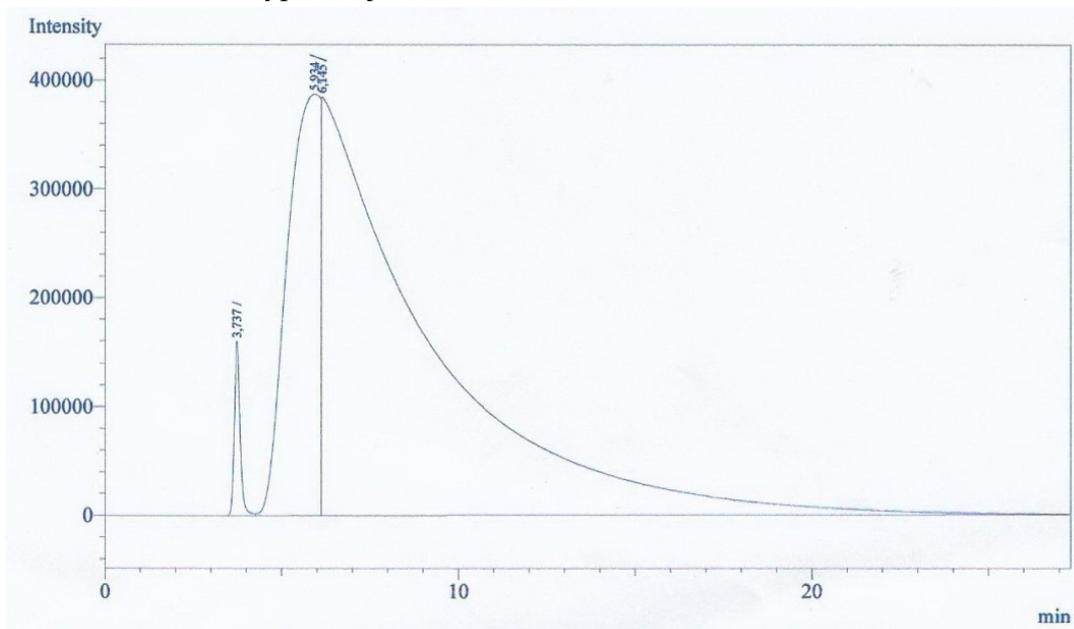


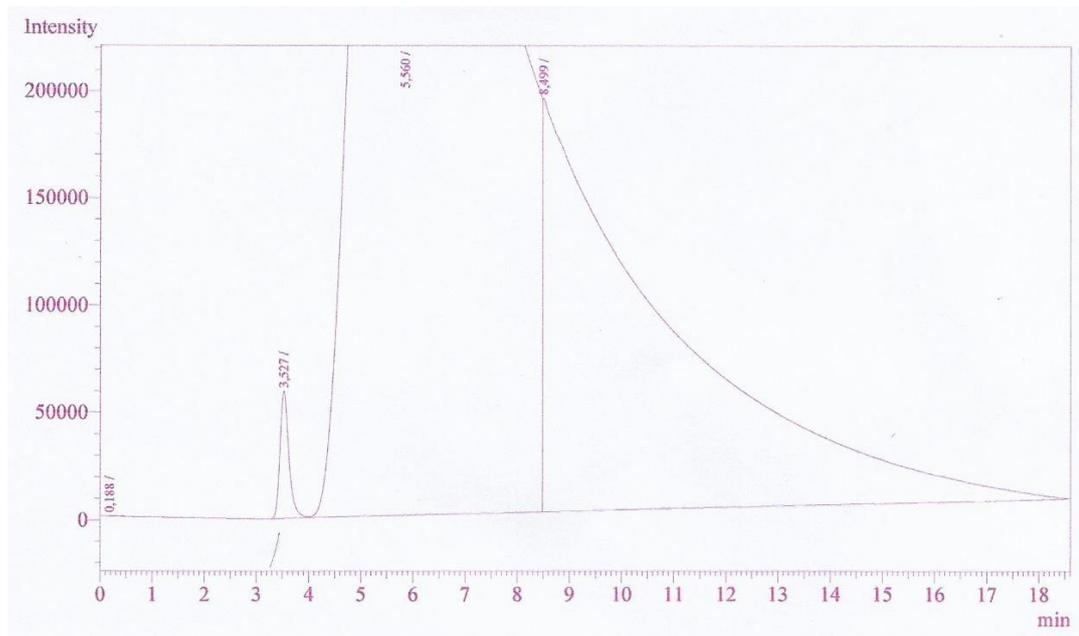
2. Salmonella typhi 12 jam



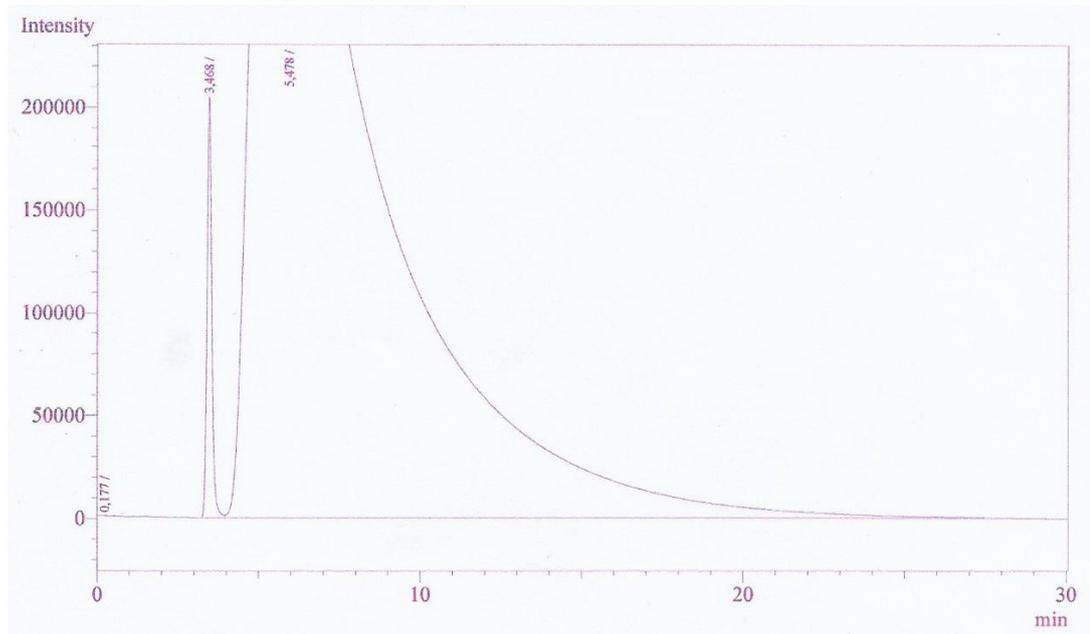


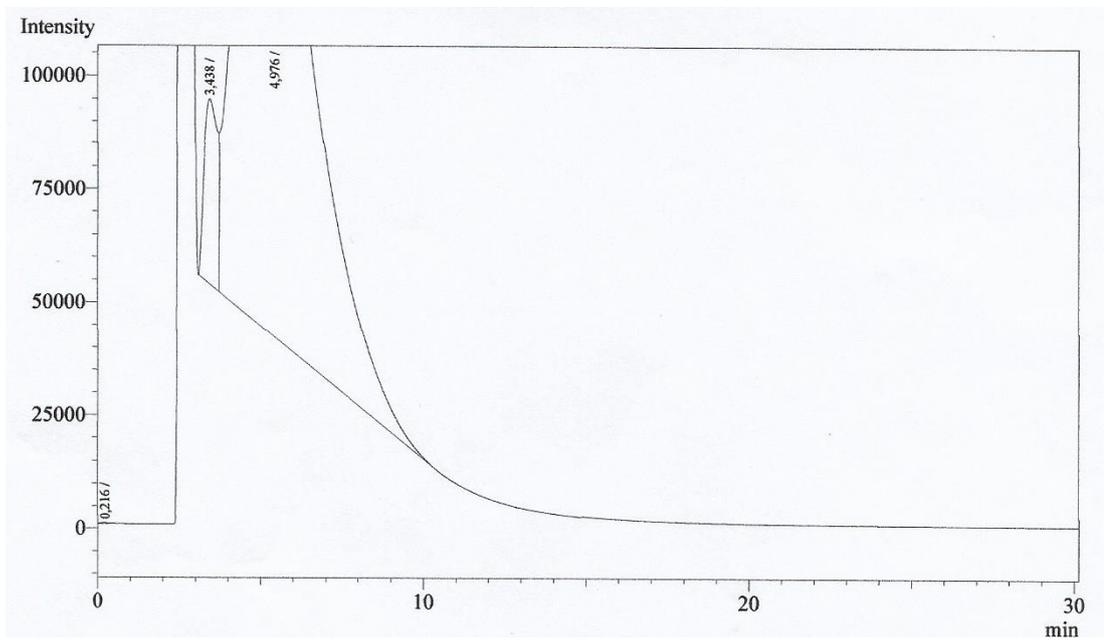
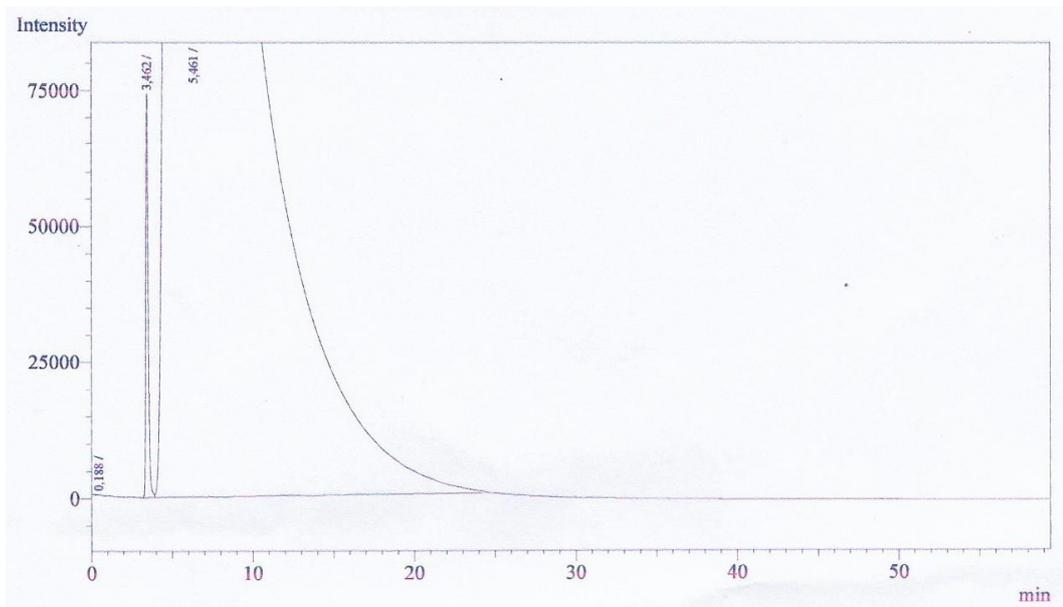
3. Salmonella typhi 24 jam

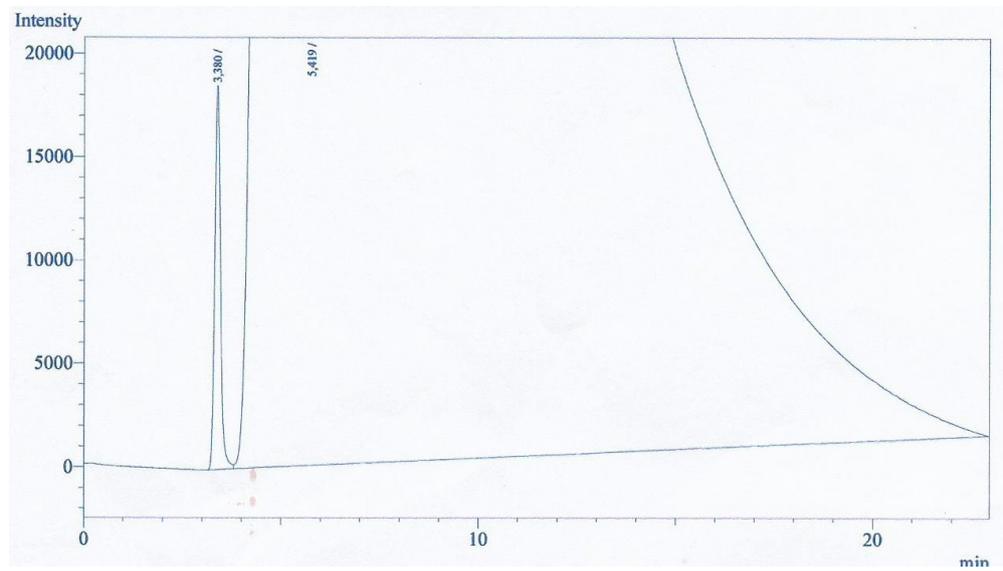
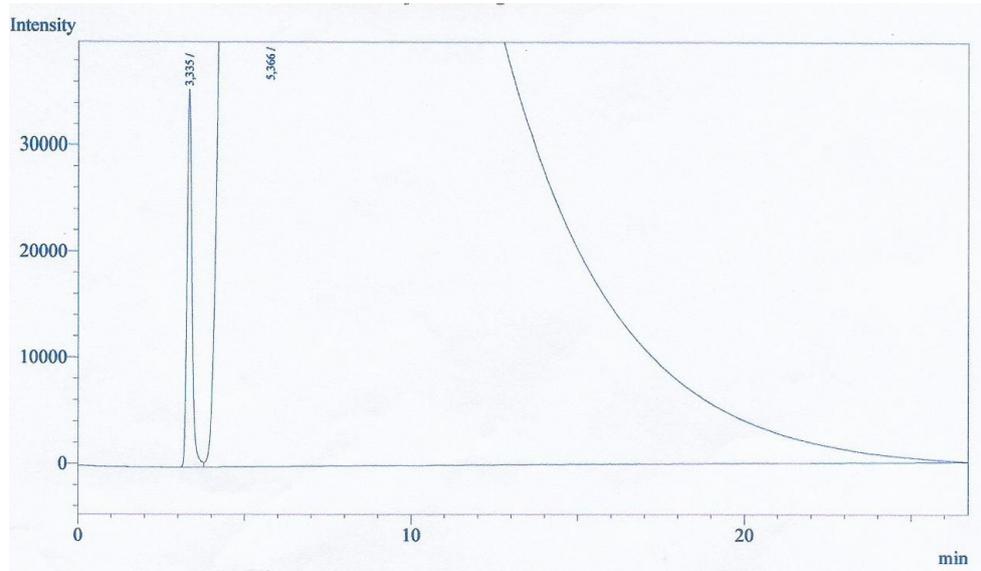


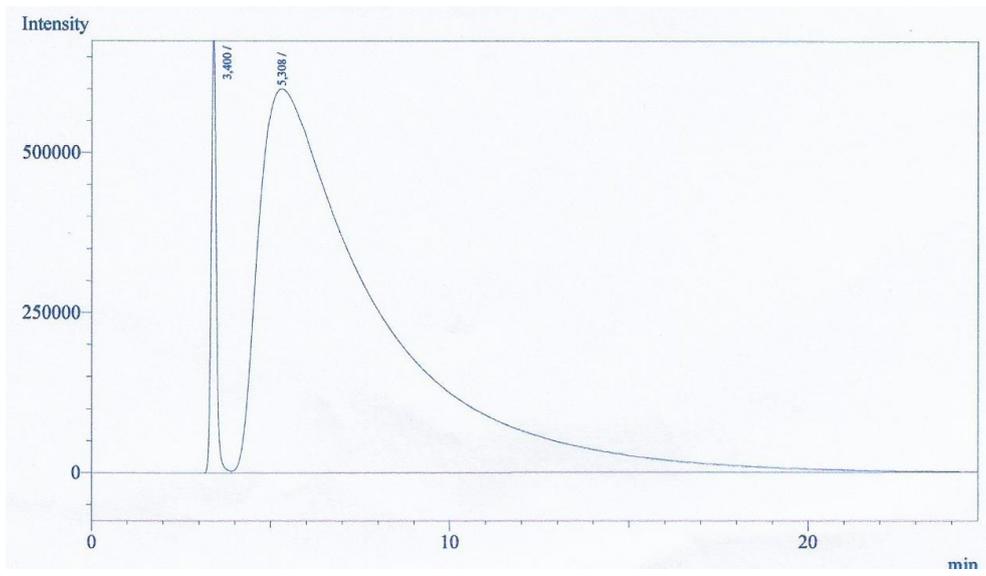


4. Salmonella typhi 36 jam



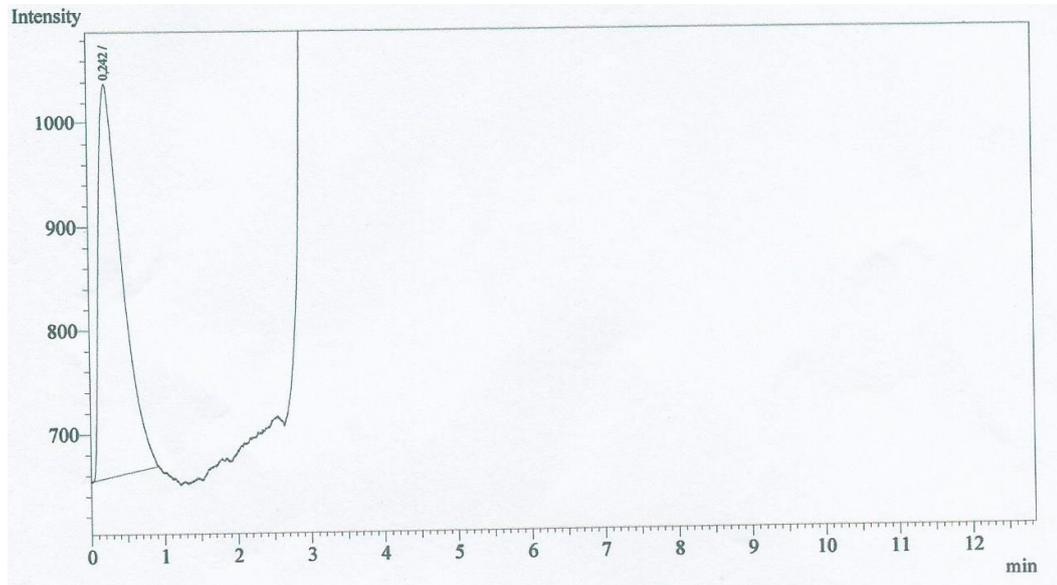


5. *Salmonella typhi* 48 jam

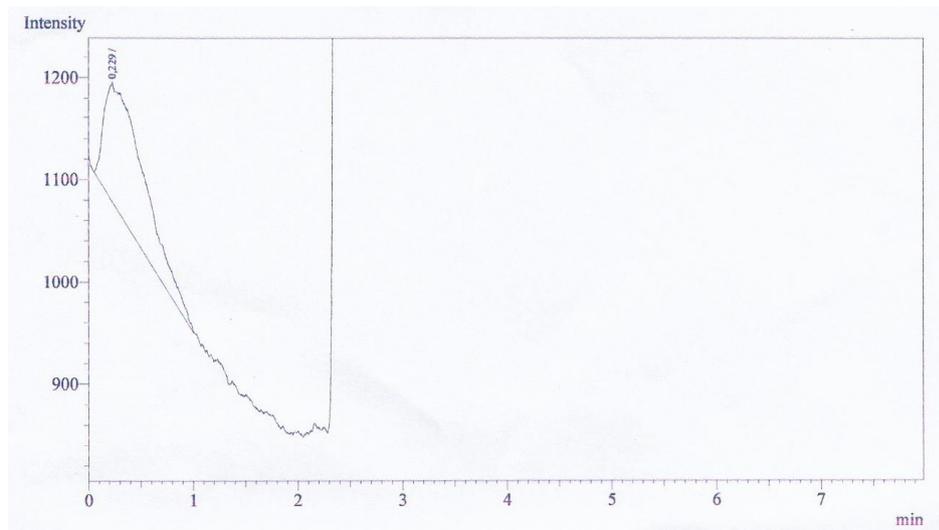


Lampiran 9. Hasil kromatogram pelarut

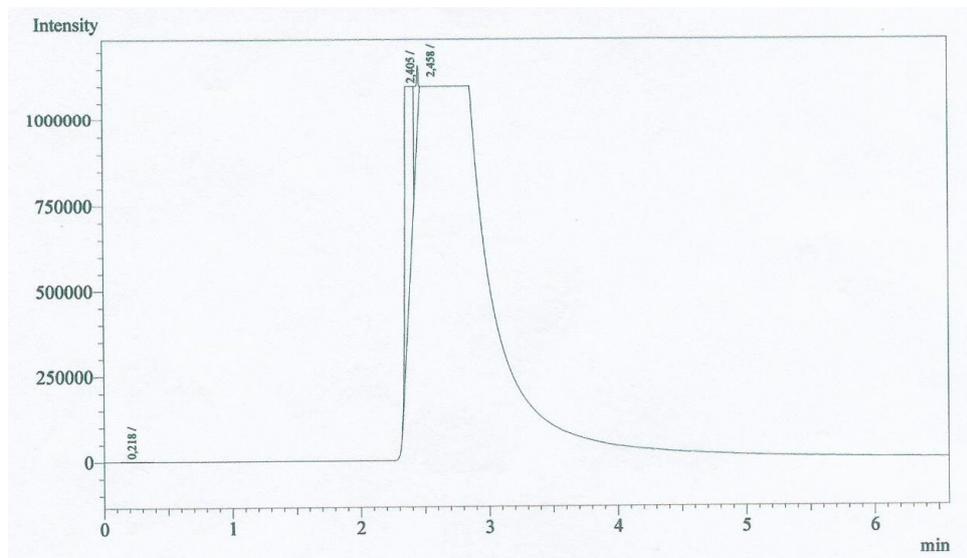
1. Reagen saponifikasi



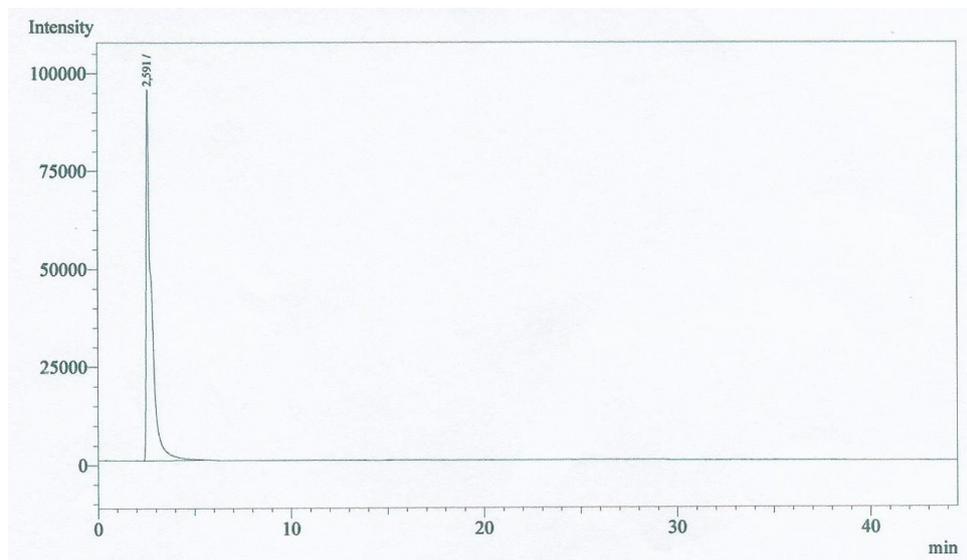
2. Reagen metilasi



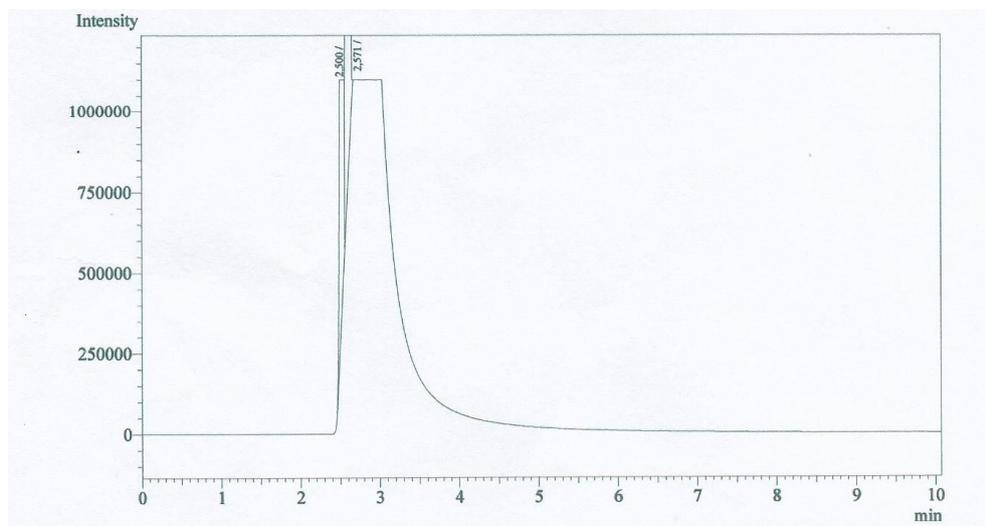
3. Reagen ekstraksi



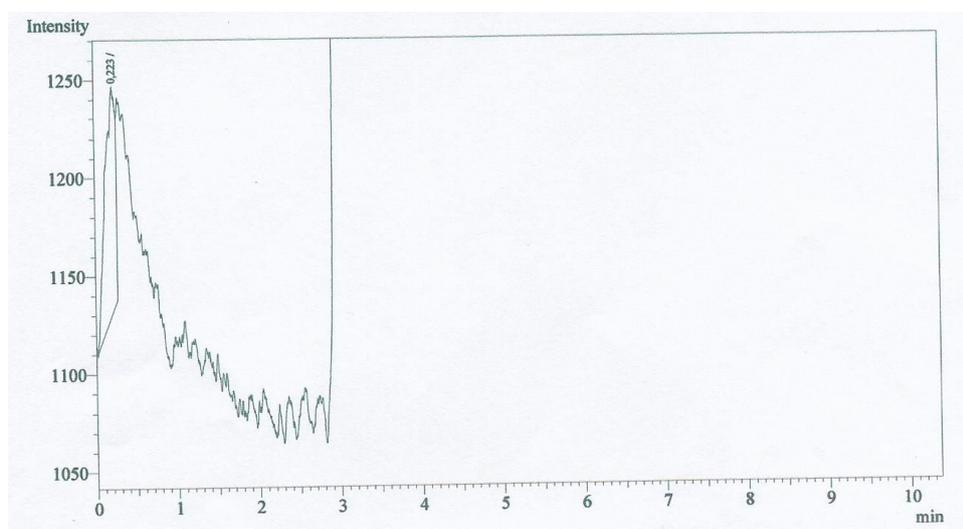
4. Reagen pencucian



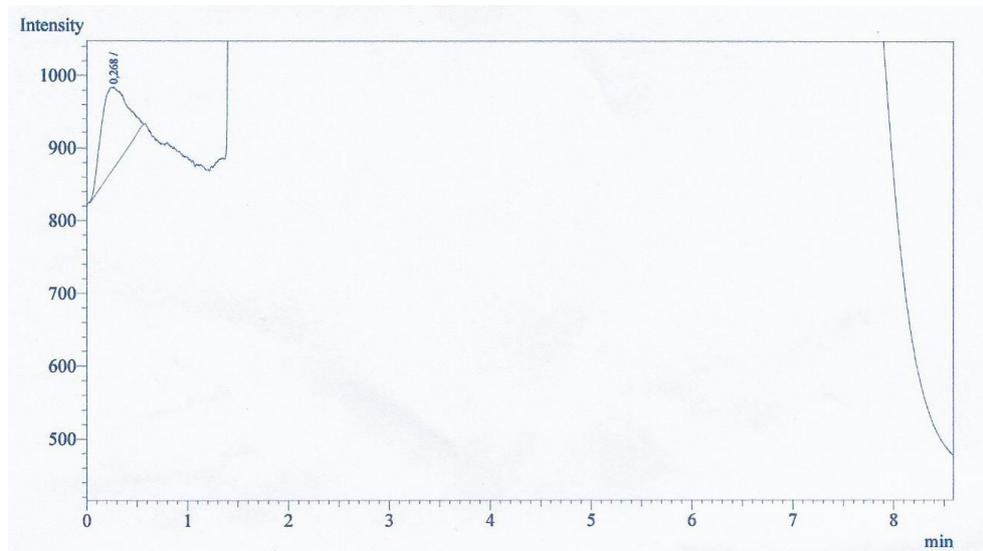
5. Heksan



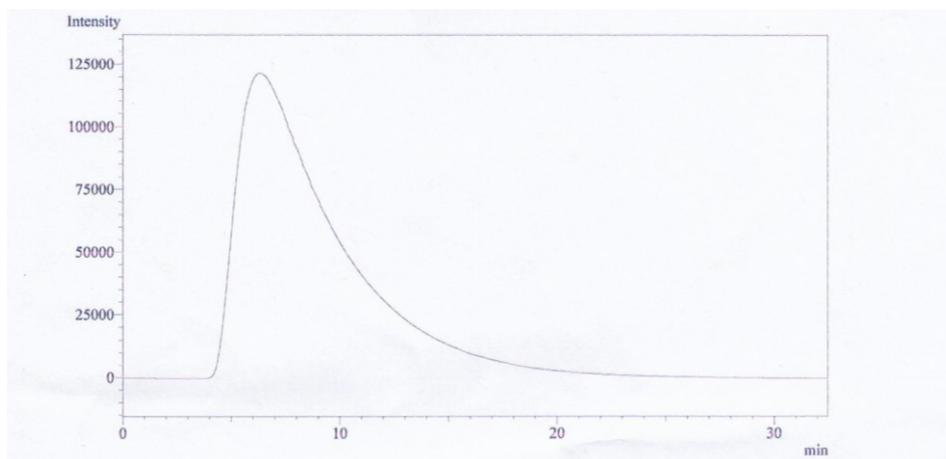
6. Metil tert butil eter



7. Methanol



Lampiran 10. Hasil kromatogram media BSA



Lampiran 11. Hasil perhitungan SD dan RSD

1. Rata-rata hasil waktu retensi asam lemak metil ester bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311

	6 jam	12 jam	24 jam	36 jam	48 jam
Waktu retensi	3.895	3.935	3.737	3.468	3.335
	3.839	3.911	3.613	3.462	3.38
	3.795	3.902	3.527	3.438	3.4
Rata-rata	3.843	3.916	3.625667	3.456	3.371667

2. Hasil perhitungan SD dan RSD

waktu inkubasi	SD	RSD
6	0.05012	1.304186
12	0.017059	0.435616
24	0.105571	2.911781
36	0.015875	0.459332
48	0.033292	0.987394

Lampiran 12. Lampiran formulasi dan pembuatan media

1. Bismuth Sulfite Agar (BSA)

Meat extract 5,0 gram

Special peptone 10,0 gram

D(+) Glucose 5,0 gram

Iron(II) sulfate 0,3 gram

di-Sodium hydrogen phosphate 4,0 gram

Briliant green 0,025 gram

Bismuth-sulfite indicator 8,0 gram

Agar-agar 15,0 gram

Reagen – reagen diatas dilarutkan dalam aquadest 1000 ml, diamkan selama 15 menit, kemudian panaskan dan aduk sampai larut sempurna. Lalu tuangkan ke dalam cawan petri (MacCoy, J.H, Wilson and Blair)

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 maeat 10,0 gram

Di potassium hydrogen fosfat 3,5 gram

Laktosa 10,0 gram

Sodium sulfit 2,5 gram

Fuchsiun 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 13. Optimasi kondisi suhu kromatografi gas

Kondisi	Percobaan 1	Percobaan 2	Percobaan 3	Percobaan 4	Percobaan 5
Col temp (°C)	170	170	140	150	120
Init time (menit)	20	10	5	7	7
Prog rate (°C/menit)	5	5, 10	5	10	10
Final time (menit)	30	5, 2	5	20	20
Final temp (°C)	250	270, 300	240	240	240