UJI OBSERVASI PEMBENTUKAN HASIL FERMENTASI OLEH BAKTERI GRAM NEGATIF PADA MEDIA TSIA PADA BERBAGAI VARIASI WAKTU INKUBASI

KARYA TULIS ILMIAH

OLEH
MUTIARA DIVA SALSABILA
NIM. 1181073

PROGRAM STUDI DIII TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS
SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NASIONAL
SUKOHARJO
2021

UJI OBSERVASI PEMBENTUKAN HASIL FERMENTASI OLEH BAKTERI GRAM NEGATIF PADA MEDIA TSIA PADA BERBAGAI VARIASI WAKTU INKUBASI

KARYA TULIS ILMIAH

DIAJUKAN SEBAGAI PERSYARATAN MENYELESAIKAN JENJANG PENDIDIKAN DIPLOMA III TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS

OLEH
MUTIARA DIVA SALSABILA
NIM. 1181073

PROGRAM STUDI DIII TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS
SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NASIONAL
SUKOHARJO
2021

KARYA TULIS ILMIAH

UJI OBSERVASI PEMBENTUKAN HASIL FERMENTASI OLEH BAKTERI GRAM NEGATIF PADA MEDIA TSIA PADA BERBAGAI VARIASI WAKTU INKUBASI

Disusun Oleh:
MUTIARA DIVA SALSABILA
NIM. 1181073

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji dan
telah dinyatakan memenuhi syarat/sah

Pada 14 Juli 2021

Tim Penguji

Dr. Didik Wahyudi, M. Si	(Ketua)	.....
Yusianti Silviani, S.Pd. Bio, M.Pd	(Anggota)	.....
Ardy Prian Nirwana, S.Pd Bio., M.Si	(Anggota)	.....

Menyetujui ,
Pembimbing Utama

Ardy Prian Nirwana, S.Pd Bio., M.Si

Mengetahui,
Ketua Program Studi
DIII Teknologi Laboratorium Medis

Ardy Prian Nirwana, S.Pd Bio., M.Si

PERNYATAAN KEASLIAN KTI

Saya menyatakan dengan sesungguhnya bahwa Karya Tulis Ilmiah, dengan judul :

UJI OBSERVASI PEMBENTUKAN HASIL FERMENTASI OLEH BAKTERI GRAM NEGATIF PADA MEDIA TSIA PADA BERBAGAI VARIASI WAKTU INKUBASI

Yang dibuat untuk melengkapi persyaratan menyelesaikan Jenjang Pendidikan Diploma III Teknologi Laboratorium Medis Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional, sejauh saya ketahui bukan merupakan tiruan ataupun duplikasi dari Karya Tulis Ilmiah yang sudah dipublikasikan dan atau pernah dipakai untuk mendapatkan gelar dilingkungan Program Studi DIII Teknologi Laboratorium Medis STIKES Nasional maupun di Perguruan Tinggi atau Instansi manapun, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebut dalam daftar pustaka.

Apabila terdapat bukti tiruan atau duplikasi pada KTI, maka penulis bersedia untuk menerima pencabutan gelar akademik yang telah diperoleh.

Sukoharjo , 14 Juli 2021

Mutiara Diva Salsabila

NIM. 1181073

MOTTO

"Sesuatu yang belum dikerjakan sering kali tampak mustahil
Kita baru yakin kalau kita telah berhasil
Melakukannya dengan baik"
– Evelyn Underhill –

"*Believe you can, then you will*"
– Mulan (*Princess stories*) –

PERSEMBAHAN

Karya tulis ini penulis persembahkan kepada :

1. Allah SWT yang telah memberikan kemudahan, kelancaran, kesehatan dan kekuatan selama ini terutama dalam penyelesaian Karya Tulis Ilmiah ini.
2. Yang tercinta orang tua penulis Bapak Suyadi dan Ibu Ariyah serta Kakakku Kartika Dewi Handayani yang selama ini selalu memberikan perhatian dan semangat, terima kasih atas segala doa yang tidak pernah putus untuk penulis dalam menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah ini.
3. Bapak Ardy Prian Nirwana, S.Pd Bio., M.Si selaku dosen pembimbing Karya Tulis Ilmiah sekaligus Ketua Prodi D-III TLM dan Ibu Tiara Indah Sulistyo, S.Tr.Kes selaku instruktur yang selalu sabar dan bijaksana dalam memberikan bimbingan, arahan, semangat, nasehat, serta selalu memberikan jalan keluar setiap permasalahan yang dialami dalam menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah.
4. Bapak Dr. Didik Wahyudi, M.Si dan Ibu Yusianti Silviani, S.Pd. Bio, M.Pd selaku penguji yang memberikan masukan-masukan yang berguna dalam menyusun Karya Tulis Ilmiah.
5. Ibu Noviana Dewi, S.Psi., M.Si. selaku dosen pembimbing akademik yang selalu memberikan semangat kepada anak bimbingannya.
6. Dosen-dosen prodi D-III TLM STIKES Nasional yang telah memberikan ilmu dan pengalamannya.
7. Pak Verry dan Ibu Alwina selaku Laboran yang telah sabar dalam membantu mempersiapkan alat dan bahan selama penelitian ini.

8. Sahabat saya Hanifah Lutfi Nastiti dan Mustika Sylviana L.A yang selalu saling menyemangati dan menjadi pendengar yang baik saat saya berkeluh kesah.
9. Tim Bakteriologi (Ajeng, Luluk, Melinda, Munazi, dan Nanda) yang telah membantu dan bekerjasama selama proses penelitian.
10. Ibu Suratmi (ibu kos) yang berperan sebagai ibu ke dua bagi saya, serta Rista dan Gunawan selaku teman kos yang selalu membantu dan menyemangati saya.
11. Kelas 3A2 yang selalu memberikan semangat untuk menyelesaikan Karya Tulis Ilmah ini.
12. Teman seperjuangan saya yang telah membantu dan mendoakan saya dan memberikan banyak pengalaman dan pelajaran untuk menjadi pribadi yang lebih baik.
13. Serta almamater tercinta STIKES NASIONAL.

KATA PENGANTAR

Puji syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas berkat, rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah ini yang disusun guna menyelesaikan program pendidikan Diploma III Teknologi Laboratorium Medis di Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional yang berjudul "Uji Observasi Pembentukan Hasil Fermentasi oleh Bakteri Gram Negatif pada Media TSIA pada Berbagai Variasi Waktu Inkubasi"

Penulisan Karya Tulis Ilmiah ini disusun berdasarkan tinjauan pustaka dan pemeriksaan di Laboratorium Bakteriologi STIKES Nasional. Penyusunan Karya Tulis Ilmiah ini tidak lepas dari bimbingan, bantuan, dukungan, semangat, dan saran yang membangun dari berbagai pihak. Maka pada kesempatan kali ini penulis berterima kasih kepada :

1. Allah SWT atas karunia dan petunjuk-Nya sehingga penulis dimudahkan dalam menyusun Karya Tulis Ilmiah ini.
2. Bapak apt. Hartono, M. Si. selaku ketua STIKES nasional yang telah memberikan ijin dan fasilitas kepada penulis dalam menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah ini.
3. Bapak Ardy Prian Nirwana, S.Pd Bio., M.Si selaku Ketua Program studi DIII Teknologi Laboratorium Medis serta dosen pembimbing KTI yang selalu sabar, menerima dan menanggapi setiap pertanyaan dan memberikan masukan selama proses penyusunan Karya Tulis Ilmiah.

4. Ibu Tiara Indah Sulistyo, S.Tr.Kes selaku instruktur laboratorium yang telah memberikan bimbingan, semangat, dan selalu memotivasi selama praktikum dan dalam penyusunan Karya Tulis Ilmiah ini.
5. Bapak Dr. Didik Wahyudi, M.Si dan Ibu Yusianti Silviani, S.Pd. Bio, M.Pd selaku penguji yang memberikan masukan-masukan yang berguna dalam menyusun Karya Tulis Ilmiah.
6. Teman-teman angkatan 2018, yang telah berjuang bersama-sama dari awal pertama kuliah sampai pembuatan Karya Tulis Ilmiah. Terima kasih untuk semua hal yang telah terjadi.
7. Kepada semua pihak yang namanya tidak dapat disebutkan satu persatu, penulis mengucapkan terima kasih banyak atas semua bantuan yang diberikan.

Meskipun telah berusahan semaksimal mungkin untuk menyelesaikan Karya Tulis ilmiah ini, namun penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari kata sempurna. Maka dari itu kritik dan saran yang bersifat membangun dari pembaca diharapkan dapat menyempurnakan Karya Tulis ilmiah ini. Akhir kata, penulis berharap semoga Karya Tulis Ilmiah Ini bermanfaat untuk kemajuan di bidang Teknologi Laboratorium Medis pada khususnya dan ilmu pengetahuan pada umumnya.

Sukoharjo , 14 Juli 2021

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL ..... **i**
HALAMAN JUDUL ..... **ii**
HALAMAN PERSETUJUAN ..... **iii**
HALAMAN PENGESAHAN ..... **iv**
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN KTI ..... **v**
MOTTO ..... **vi**
PERSEMBAHAN ..... **vii**
KATA PENGANTAR ..... **ix**
DAFTAR ISI ..... **xi**
DAFTAR TABEL ..... **xiii**
DAFTAR GAMBAR ..... **xiv**
DAFTAR LAMPIRAN ..... **xv**
INTISARI ..... **xvi**
ABSTRACT ..... **xvii**
BAB I. PENDAHULUAN **1**
A. Latar Belakang Masalah 1
B. Pembatasan Masalah 4
C. Rumusan Masalah 4
D. Tujuan Penelitian 5
E. Manfaat Penelitian 5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA **7**
A. Landasan Teori 7
1. Uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) 7
a. Definisi 7
b. Komposisi TSIA Merek Merck 8
c. Interpretasi Hasil 8
2. Bakteri Gram Negatif 10
a. Definisi 10
b. *Escherichia coli* 11

c. *Klebsiella pneumoniae* 12
d. *Serratia marcescene* 13
e. *Providencia rettgeri* 14
B. Kerangka Pikir 16
C. Hipotesis 17
BAB III. METODE PENELITIAN 18
A. Desain Penelitian 18
B. Tempat dan Waktu Penelitian 18
C. Subyek dan Obyek Penelitian 19
D. Populasi dan Sampel Penelitian 19
E. Definisi Operasional Variabel Penelitian 20
F. Teknik Sampling 23
G. Sumber Data Penelitian 24
H. Instrumen Penelitian 24
1. Alat 24
2. Bahan 24
I. Alur Penelitian 25
1. Bagan 25
2. Cara Kerja 26
J. Teknis Analisis Data Penelitian 29
K. Jadwal Penelitian 31
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN 32
A. Hasil 32
B. Pembahasan 37
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN 42
A. Kesimpulan 42
B. Saran 42
DAFTAR PUSTAKA
LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
Tabel 3.1	Matrik Observasi Pembentukan Fermentasi pada TSIA	30
Tabel 3.2	Pengamatan Fermentasi pada TSIA	30
Tabel 3.3	Jadwal Penelitian	31
Tabel 4.1	Hasil Identifikasi Bakteri Gram Negatif	32
Tabel 4.2	Hasil Pengamatan Koloni Bakteri Gram Negatif pada MC	33
Tabel 4.3	Hasil Uji Pembentukan Fermentasi pada Variasi Inkubasi	35

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
Gambar 2.1	Kerangka Pikir	16
Gambar 3.1	Pembagian Hasil Fermentasi pada Media TSIA	23
Gambar 3.2	Bagan Alur Penelitian	25
Gambar 4.1	Hasil Pengecatan Gram Bakteri	33
Gambar 4.2	Hasil Pengamatan pada Media MC	34

LAMPIRAN

Lampiran 1.	Dokumentasi Penelitian	47
Lampiran 2.	Komposisi Reagen	49

INTISARI

Mutiara Diva Salsabila. NIM 1181073. Uji Observasi Pembentukan Hasil Fermentasi Oleh Bakteri Gram Negatif pada Media TSIA pada Berbagai Variasi Waktu Inkubasi.

TSIA merupakan media diferensial dengan indikator pH yang dapat membedakan mikroorganisme berdasarkan kemampuannya dalam memecah karbohidrat spesifik yakni glukosa dan laktosa atau sukrosa dengan atau tanpa menghasilkan gas. Media yang digunakan mempunyai dua bagian, yaitu *slant* (lereng) dan *butt* (dasar). Perubahan yang dialami setelah inkubasi adalah warna medium kuning menandakan asam, warna medium menjadi lebih merah menandakan medium menjadi basa. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui waktu pembacaan hasil pembentukan fermentasi pada media TSIA oleh beberapa bakteri gram negatif pada variasi waktu inkubasi.

Penelitian ini menggunakan desain deskriptif observasional. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bakteriologi STIKES Nasional dan waktu penelitian dilakukan pada bulan Januari-Mei. Sampel Penelitian ini adalah kultur bakteri *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescene,* dan *Providencia rettgeri,* media Isolasi TSIA (*Triple Sugar Iron Agar)* di inkubasi dengan variasi waktu inkubasi 8, 16, 24, dan 32 jam. Teknik sampling yang digunakan adalah Quota Sampling.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada hasil acid/acid pada bakteri *Escherichia coli* dan *Klebsiella pneumonia* dalam waktu inkubasi 8 jam terfermentasi $^{4}/_{4}$ bagian *slant* (miring) dan *butt* (dasar). Untuk hasil alkali/acid pada *Serratia marcescene* bagian acid pada *butt* (dasar) terfermentasi $^{4}/_{4}$ bagian dalam waktu inkubasi 8 jam, sedangkan untuk bakteri *Providencia rettgeri* bagian acid pada *butt* (dasar) terfermentasi $^{3}/_{4}$ bagian pada waktu inkubasi 8 jam.

Berdasarkan dari hasil penelitian yang telah dilakukan mengenai uji observasi pembentukan hasil fermentasi pada media TSIA pada berbagai variasi waktu inkubasi dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan hasil fermentasi acid/acid dan alkali/acid pada media TSIA yang di hasilkan oleh bakteri *Escherichia coli, Klebsiella pneumonia, Serratia marcescene* dan *Providencia rettgeri* pada variasi waktu inkubasi 8, 16, 24, dan 32 jam.

Kata kunci: Uji Observasi Fermentasi, Bakteri Gram Negatif, TSIA, inkubasi.

ABSTRACT

Mutiara Diva Salsabila. NIM 1181073. The Observation Test for the Formation of Fermentation Results by Gram Negative Bacteria on TSIA Media at Various Incubation Time Variations.

TSIA is a differential medium with a pH indicator that can distinguish microorganisms based on their ability to decompose specific carbohydrates, namely glucose and lactose or sucrose with or without producing gas. The media used has two parts, namely slant and butt. Changes experienced after incubation, namely the color of the medium yellow indicates acid, the color of the medium becomes redder indicates the medium becomes alkaline. The aims of this study was to determine the reading time of the results of the formation of fermentation on TSIA media by several gram-negative bacteria at various incubation times.

This study used a descriptive observational design. This study was conducted at the STIKES Nasional Bacteriology Laboratory and the time of the study was carried out in January-May. The samples of this study were bacterial cultures of *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescene,* and *Providencia rettgeri,* isolated media of TSIA (Triple Sugar Iron Agar) which were incubated with variations in incubation time of 8, 16, 24, and 32 hours. The sampling technique used is Quota Sampling.

The results of study showed that results of acid/acid in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bacteria within an incubation time of 8 hours fermenting $^{4}/_{4}$ parts slant and butt. For alkaline/acid results in *Serratia marcescene,* the acidic part of the butt was fermented $^{4}/_{4}$ parts within an incubation time of 8 hours, while for *Providencia rettgeri* bacteria the acidic part of the butt was fermented $^{3}/_{4}$ parts at an incubation time of 8 hours.

Based on the results of study that has been carried out regarding the observation test for the formation of fermented products on TSIA media at various incubation times, it can be concluded that there are differences in the results of acid/acid and alkaline/acid fermentation on TSIA media produced by bacteria *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescene* and *Providencia rettgeri* at various incubation times of 8, 16, 24, and 32 hours.

Keywords: Fermentation Observation Test, Gram Negative Bacteria, TSIA, incubation.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Uji biokimia dilakukan untuk mengetahui sifat-sifat fisiologis koloni bakteri hasil isolasi. Biokimia bakteri berkaitan dengan proses metabolisme sel bakteri. Identifikasi bakteri tidak dapat dilakukan dengan mengetahui sifat morfologinya saja, namun harus mengetahui sifat fisiologis bakteri juga. (Maulana. 2019). Sifat metabolisme bakteri dalam uji biokimia biasanya dilihat dari interaksi metabolit-metabolit yang dihasilkan dengan reagen-reagen kimia. Uji lain dapat dilakukan dengan cara melihat kemampuannya menggunakan senyawa tertentu sebagai sumber karbon dan sumber energi. Uji-uji biokimia ditujukan untuk memastikan bakteri yang akan dianalisa benar-benar bakteri yang kita harapkan. Uji biokimia bertujuan untuk memperkecil kesalahan, karena beberapa spesies memiliki sifat-sifat yang hampir sama (Haryani, dkk. 2012).

Salah satu media uji biokimia yang sering digunakan adalah TSIA (*Triple Sugar Iron Agar)*, TSIA merupakan media diferensial dengan indikator pH yang dapat membedakan mikroorganisme berdasarkan kemampuannya dalam memecah karbohidrat spesifik dengan atau tanpa menghasilkan gas. Berdasarkan hal tersebut bakteri dapat digolongkan sebagai mikroba non fermenter, fermenter glukosa, atau fermenter glukosa dan laktosa. Pada TSIA terdapat karbohidrat berupa glukosa, sukrosa dan

laktosa, fenol merah sebagai indikator pH, serta natrium tiosulfat. Dimana fermentasi karbohidrat dapat terjadi secara aerob pada permukaan agar dan secara anaerob pada dasar agar. Pada permukaan agar glukosa akan dikatabolisme melalui jalur Embdn-Meyerhof menghasilkan asam piruvat yang kemudian didegradasi sempurna dalam siklus asam sitrat menjadi CO_2, H_2O, dan energi. Sedangkan pada dasar agar uji, katabolisme glukosa akan menghasilkan produk akhir berupa asam-asam organik, alkohol, CO_2, H_2, dan energy (Haryani, dkk. 2012).

Dalam mata kuliah praktik bakteriologi pada materi identifikasi bakteri gram negatif batang, media TSIA merupakan salah satu media biokimia atau media deret yang selalu digunakan, hal ini dikarenakan kemampuannya dalam membedakan golongan *Enterobacteriaceae* yang mampu memfermentasi karbohidrat jenis tertentu. Pada praktik sehari-hari inkubasi dilakukan pada suhu 37°C dengan waktu pembacaan hasil pada kisaran waktu 18-24 jam masa inkubasi. Dimana terdapat dua reaksi yang terjadi dalam tabung yang sama, yaitu ketika glukosa yang ada pada TSIA difermentasi sehingga mengubah fenol menjadi kuning pada bagian dasar, jika fermentasi glukosa tidak terjadi maka dasar akan tetap berwarna merah. Jika sukrosa dan atau laktosa pada TSIA yang difermentasi maka bagian miring pada agar berubah menjadi kuning juga, non-fermentasi sukrosa atau laktosa menyebabkan kemiringan tetap merah. Secara konvensional produksi asam ditujukan dengan huruf A sedangkan kondisi basa ditujukan dengan huruf K (Chester & Cooper. 2018).

Masa inkubasi optimal 18-24 jam sesuai dengan Aryal (2018) dimana, walaupun glukosa digunakan pertama kali oleh organisme fermenter dan dapat mengubah media menjadi asam (kuning) dalam waktu 8-12 jam tetapi keadaan asam ini mampu bertahan setelah 18-24 jam karena adanya asam organik yang dihasilkan dari fermentasi glukosa dalam kondisi anaerobik pada dasar tabung, sehingga lebih baik hasil fermentasi pada TSIA dibaca dalam waktu inkubasi 18-24 jam, reaksi negatif palsu dapat diamati jika dibaca lebih dari 24 jam pada fermentasi yang menghasilkan kode acid/acid, dikarenakan terjadi oksidasi pada kemiringan media.

Menurut Amrita (2011) pembacaan lebih dari 24 jam tidak disarankan karena asam pada bagian miring akan teroksidasi menjadi karbondioksida dan air oleh organisme sehingga kemiringan akan kembali menjadi merah, selain itu hal ini untuk memastikan bahwa substrat karbohidrat belum habis terpakai dan degradasi pepton yang menghasilkan produk akhir alkali tidak terjadi. Karena pada fermentor yang kuat seperti bakteri *Escherichia coli* akan memfermentasi semua gula yang tersedia kemudian akan mulai menggunakan asam amino, dimana pada penggunaan asam amino ini akan menghasilkan gugus amina yang akan menyebabkan media berubah menjadi basa.

Dikarenakan kemampuan media TSIA dalam memecah karbohidrat tertentu sehingga mampu mengubah warna media dan menghasilkan fermentasi baik acid/acid, alkali/acid maupun alkali/alkali dalam waktu inkubasi tertentu, sehingga peneliti tertarik untuk melakukan penelitian

tentang “Uji Observasi Pembentukan Hasil Fermentasi oleh Bakteri Gram Negatif pada Media TSIA pada Berbagai Variasi Waktu Inkubasi”.

B. Pembatasan Masalah

Pembatasan masalah pada penelitian ini adalah mengenai pembentukan fermentasi acid/acid atau alkali/acid pada media TSIA oleh beberapa bakteri gram negatif yaitu *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescene,* dan *Providencia rettgeri* pada berbagai variasi waktu inkubasi.

C. Rumusan Masalah

Adakah perbedaan hasil fermentasi acid/acid dan alkali/acid pada media TSIA oleh bakteri *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescene,* dan *Providencia rettgeri* dengan perlakuaan variasi waktu inkubasi selama 8, 16, 24, 32 jam?

D. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum

   Untuk mengetahui adakah perbedaan hasil fermentasi acid/acid dan alkali/acid pada media TSIA oleh beberapa bakteri gram negatif pada variasi waktu inkubasi selama 8, 16, 24, 32 jam.

2. Tujuan Khusus

   a. Untuk mengetahui adakah perbedaan hasil fermentasi acid/acid pada media TSIA oleh bakteri *Escherichia coli* dan *Klebsiella pneumoniae* dengan berbagai variasi waktu inkubasi selama 8, 16, 24, 32 jam.

   b. Untuk mengetahui adakah perbedaan hasil fermentasi alkali/acid pada media TSIA oleh bakteri *Serratia marcescene* dan *Providencia rettgeri* dengan berbagai variasi waktu inkubasi selama 8, 16, 24, 32 jam.

E. Manfaat Penelitia

1. Manfaat Teoritis

   Menambah pengetahuan mengenai uji observasi pembentukan hasil fermentasi acid/acid dan alkali/acid oleh bakteri gram negatif pada media TSIA pada berbagai variasi waktu inkubasi.

2. Manfaat Praktis

   a. Bagi Penulis

      Menambah pengetahuan, keterampilan dan pengalaman langsung dalam melakukan penelitian uji observasi pembentukan hasil fermentasi oleh

bakteri gram negatif pada media TSIA pada berbagai variasi waktu inkubasi.

b. Bagi Akademis

1) Menambah informasi ilmiah dan menjadi referensi pustaka di perpustakaan STIKES Nasional mengenai uji observasi pembentukan hasil fermentasi oleh bakteri gram negatif pada media TSIA pada berbagai variasi waktu inkubasi.
2) Dapat dipergunakan sebagai acuan atau studi banding dalam penelitian mahasiswa selanjutnya.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Karya Tulis Ilmiah ini menggunakan jenis penelitian deskriptif observasional untuk melihat uji observasi pembentukan fermentasi pada media TSIA oleh bakteri *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescene,* dan *Providencia rettgeri* dengan variasi waktu inkubasi yang berbeda-beda.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

   Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bakteriologi STIKES Nasional.

2. Waktu Penelitian

   Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari-Mei 2021

C. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subyek Penelitian

   Subyek penelitian ini adalah kultur bakteri gram negatif yaitu bakteri *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescene,* dan *Providencia rettgeri* yang terdapat pada Laboratorium STIKES Nasional.

2. Obyek Penelitian

   Obyek penelitian ini adalah observasi pembentukan fermentasi acid/acid dan alkali/acid pada media TSIA oleh beberapa bakteri gram negatif yaitu *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescene,* dan *Providencia rettgeri* dengan variasi waktu inkubasi.

D. Populasi dan Sampel

1. Populasi Penelitian

   Populasi dari penelitian ini adalah kultur bakteri gram negatif yang terdapat pada Laboratorium STIKES Nasional.

2. Sampel Penelitian

   Sampel dalam penelitian ini adalah kultur bakteri gram negatif yaitu *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescene,* dan *Providencia rettgeri* yang terdapat pada Laboratorium STIKES Nasional.

E. Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. *Escherichia coli* merupakan bakteri berwarna merah muda, dan berbentuk batang pendek atau golongan bakteri gram negatif. Pada media TSIA bakteri akan membuat warna media menjadi bewarna kuning pada bagian *slant* dan *butt* dengan menghasilkan gas terlihat dari media seperti pecah atau terbelah dan tidak menghasilkan H_2S.

   Escherichia coli diambil dari biakan murni di Laboratorium Bakteriologi STIKES Nasional.

   Jenis Variabel : Terikat

   Skala data : Kategorik

2. *Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri gram negatif yang berbentuk batang (basil), non motil, bersifat fakultatif anaerob dapat memfermentasi laktosa. Berdasarkan hasil uji biokimia pada TSIA ditandai dengan perubahan media yaitu acid/acid kuning pada *butt* (dasar) dan kuning pada *slant* (permukaan miring). Perubahan tersebut terjadi karena adanya fermentasi glukosa dan sukrosa oleh anggota genus *Klebsiella. Klebsiella pneumonia* diambil dari biakan murni di Laboratorium Bakteriologi STIKES Nasional.

   Jenis Variabel : Terikat

   Skala data : Kategorik

3. *Serratia marcescene* merupakan bakteri gram negatif, dari famili *Enterobactericeae*, berbentuk batang pendek, uji katalase positif, motil, suhu optimum pertumbuhan pada 30-37°C. termasuk bakteri fakultatif

anaerobik, Pada media TSIA hanya memfermentasi glukosa sehingga menghasilkan asam yang menyebabkan warna dasar (*butt)* menjadi kuning dan bagian miring (*slant)* tetap berwarna merah dalam posisi basa sehingga fermentasi alk/a atau alkali/acid, fermentasi glukosa dengan atau tanpa diikuti produksi gas. *Serratia marcescene* diambil dari biakan murni di Laboratorium Bakteriologi STIKES Nasional.

Jenis Variabel : Terikat

Skala data : Kategorik

4. *Providencia rettgeri* merupakan bakteri Gram negatif batang dan berwarna merah pada pengecatan Gram. Pada media *Mac Conkey* membentuk koloni bulat dan tidak berwarna. Hasil uji biokimia mampu menghasilkan asam pada glukosa tidak menghasilkan gas dan tidak dapat memfermentasi laktosa serta sukrosa, serta tidak menghasilkan hidrogen sulfide. *Providencia rettgeri* diambil dari biakan murni di Laboratorium Bakteriologi STIKES Nasional.

   Jenis Variabel : Terikat

   Skala data : Kategorik

5. Inkubasi adalah proses memelihara kultur bakteri dengan mempertahankan suhu tertentu agar bisa bertahan hidup dalam jangka waktu tertentu untuk melihat pertumbuhan bakteri. Waktu inkubasi yang digunakan pada penelitian ini adalah 8, 16, 24, dan 32 jam. Waktu inkubasi 8 jam dipilih karena pada waktu tersebut glukosa telah digunakan sehingga fermentasi yang menghasilkan asam (kuning) pada

dasar tabung telah mulai berlangsung. Waktu inkubasi 16 jam dipilih untuk melihat apakah dalam waktu 16 jam fermentasi yang terjadi sudah mendekati sempurna. Waktu inkubasi 24 jam dipilih karena waktu tersebut merupakan waktu optimal pembacaan hasil pada media TSIA. Waktu inkubasi 32 jam dipilih karena reaksi pada media TSIA tidak disarankan dibaca lebih dari 24 jam masa inkubasi, karena terjadi oksidasi aerobik produk fermentasi laktosa dan atau sukrosa pada bagian miring, sehingga bagian miring yang seharusnya menghasilkan asam (kuning) akan kembali ke keadaan basa (merah).

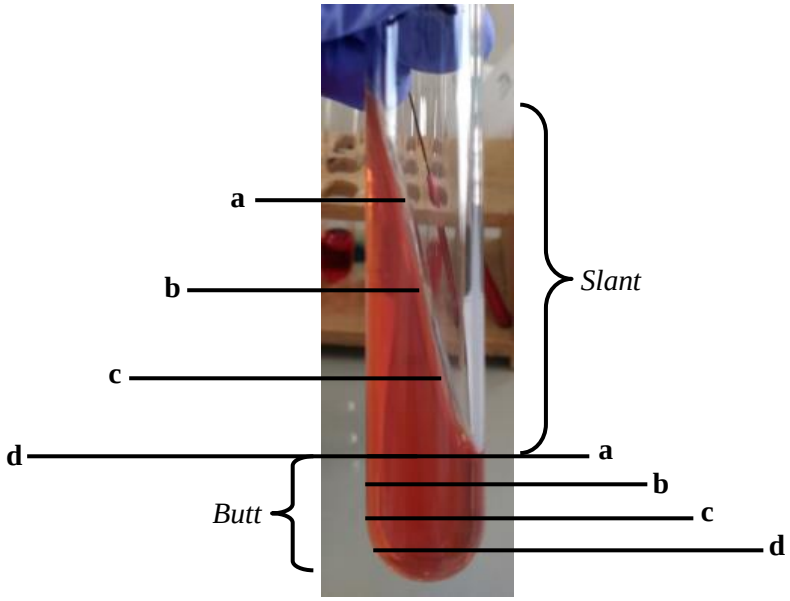
Pada tabel analisa data pengisian hasil diisi dengan Acid dan Alkali sesuai dengan fermentasi yang terbentuk pada media TSIA pada waktu inkubasi tertentu. Pengisian hasil tersebut disertai dengan keterangan tambahan untuk menjelaskan besarnya bagian yang terfermentasi pada masing-masing bagian (*slant)* dan *(butt)*.

Keterangan tambahan setelah membagi media menjadi 2 bagian :

Slant :	$^1/_4$ bagian terfermentasi	*Butt :*	$^1/_4$ bagian terfermentasi
	$^2/_4$ bagian terfermentasi		$^2/_4$ bagian terfermentasi
	$^3/_4$ bagian terfermentasi		$^3/_4$ bagian terfermentasi
	$^4/_4$ bagian terfermentasi		$^4/_4$ bagian terfermentasi

Jenis Variabel : Terikat

Skala data : Kategorik



Gambar 3.1 Pembagian Hasil Fermentasi pada Media TSIA
(a) $^{1}/_{4}$ bagian (b) $^{2}/_{4}$ bagian (c) $^{3}/_{4}$ bagian
(d) $^{4}/_{4}$ bagian

6. Kontrol negatif yang digunakan adalah media TSIA yang tidak diinokulasikan bakteri untuk melihat perbandingan warna pada media TSIA.

   Jenis variabel : Terikat

   Skala Data : Kategorik

F. Teknik Sampling

Pada penelitian ini dilakukan dengan teknik *Quota Sampling* yaitu pengambilan sampel sesuai yang dibutuhkan.

G. Sumber Data

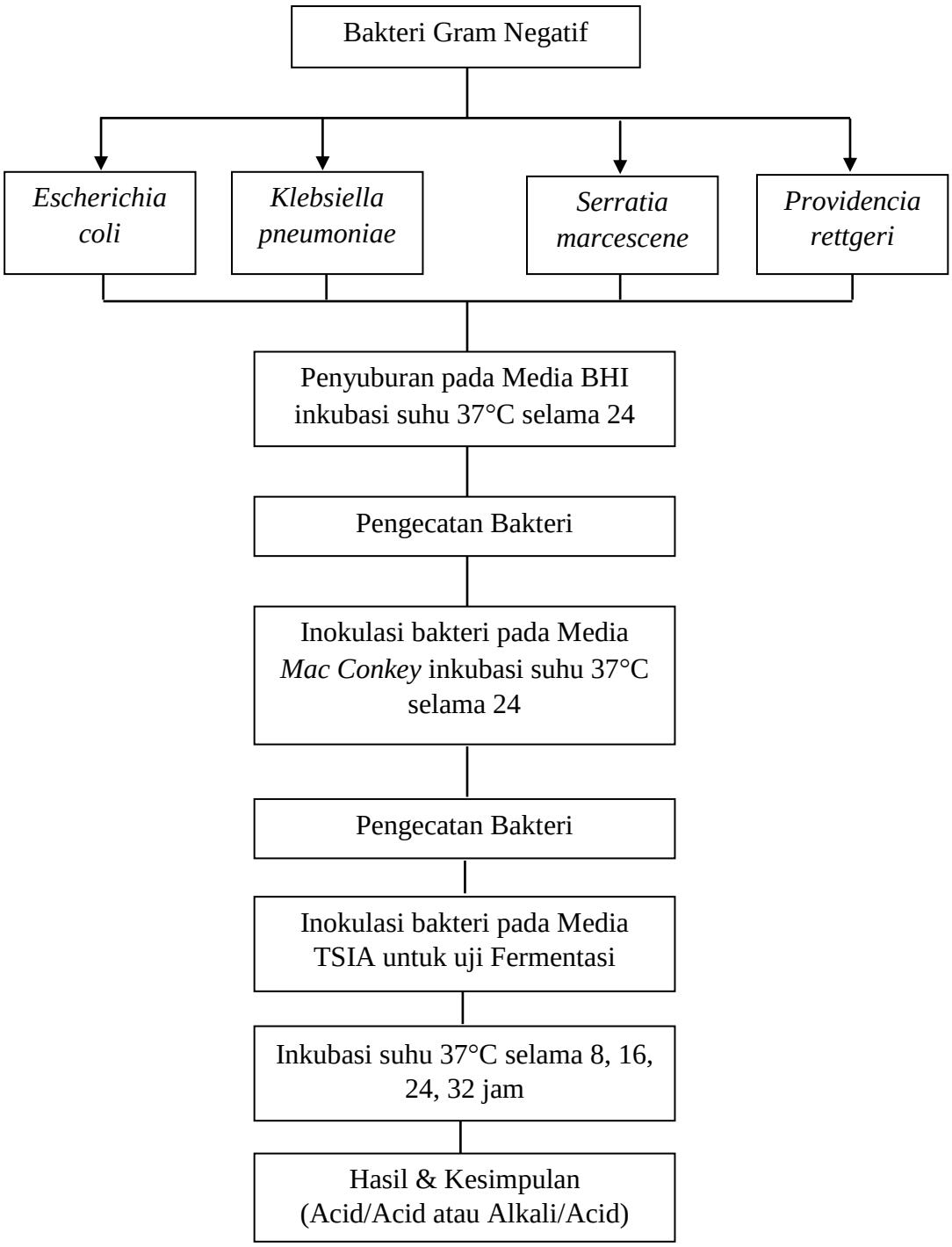
Sumber data diperoleh dari data primer hasil observasi pembentukan hasil fermentasi acid/acid dan alkali/acid oleh bakteri gram negatif pada media TSIA pada berbagai variasi waktu inkubasi

H. Instrumen Penelitian

1. Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : Alat Pelindung diri lengkap (Jas laboratorium, sarung tangan, masker), petri steril, ohse bulat dan ohse lurus, mikroskop, pipet tetes, object glass steril, rak pengecatan, pembakar spirtus, korek api, inkubator, kapas, rak tabung, tabung reaksi, *autoclave*, Erlenmeyer, *waterbath*, labu takar.
2. Bahan pemeriksaan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : Isolat bakteri *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescene* dan *Providencia rettgeri*, cat gram (A, B, C dan D), *Mac Conkey*, *Brain Heart Infusion* (BHI), NaCl 0,9%, alkohol mikroskop, Aquadest, emersi oil, alkohol 70%. Media uji biokimia terdiri dari *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), dan media gula-gula Glukosa, Laktosa, Sakarosa.

I. Alur Penelitian

1. Bagan Alur Penelitian



Gambar 3.2 Bagan Alur Penelitian

2. Cara Kerja

a. Karakterisasi Bakteri *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescene* dan *Providencia rettgeri*

1) Penyuburan bakteri *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescene* dan *Providencia rettgeri*

a) Dari biakan murni bakteri diambil dengan menggunakan ohse bulat steril secara aseptis, lalu dimasukan kedalam 3 ml *Brain Heart Infusion* (BHI).

b) Inkubasi media BHI yang telah berisi bakteri pada suhu 37°C selama 24 jam.

2) Pengecatan Gram

Menurut Mansauda dkk (2014) pengecatan gram dilakukan dengan cara :

a) *Object glass* dibersihkan menggunakan alkohol 70% kemudian ditunggu hingga kering.

b) Ambil 2-3 ohse kultur bakteri dengan menggunakan ohse steril dan diaplikasikan diatas *object glass* yang sudah diberi NaCl 0,9% kemudian diratakan membentuk area preparat lalu difiksasi diatas pembakar spirtus.

c) Preparat digenangi dengan *crystal violet* selama 30 detik.

d) Buang sisa cat, kemudian cuci dengan air mengalir.

e) Preparat digenangi dengan larutan lugol selama 1 menit.

f) Buang sisa cat, kemudian cuci dengan air mengalir

g) Preparat dilunturkan dengan menggunakan etanol 96% selama 30 detik atau sampai warnanya hilang.

h) Preparat digenangi dengan safranin selama 1 menit, kemudian di cuci dengan air mengalir.

i) Preparat dikeringkan kemudian ditetesi dengan minyak emersi, lalu dilakukan pengamatan dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x.

3) Inokulasikan Koloni pada Media *Mac Conkey* (MC)

a) Sampel pada media BHI diinokulasikan ke media *Mac Conkey* (MC) secara aseptis.

b) Media MC diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

4) Pengamatan Media MC

a) Menurut penelitian Fhitryani, dkk (2017) pada bakteri *Escherichia coli* akan ditemukan koloni yang berbentuk bulat, diameter 2-3 mm dengan warna merah tua.

b) Menurut penelitian Darna, dkk (2018) bakteri *Klebsiella pneumoniae* akan memiliki warna koloni merah muda dan berlendir (mukoid).

c) Bakteri *Serratia marcescene* membentuk koloni cembung, lembut, dengan tepi yang berbeda, dapat menghasilkan pigmen merah atau biasa disebut *prodigiosin* (Rosidah. 2016).

d) Pada bakteri *Providencia rettgeri* ditemukan bakteri berbentuk lingkaran dengan tepi mengkilat, halus, ramping dan cembung (Al-Gburi. 2020).

5) Lakukan pengecatan bakteri kembali untuk melihat morfologi koloni bakteri yang akan diinokulasikan pada media TSIA.

6) Lalu dipilih koloni yang terpisah, kemudian diinokulasikan ke media uji biokimia yaitu TSIA dan media gula-gula (Glukosa, Laktosa dan Sukrosa) inkubasi pada suhu 37°C selama 8, 16, 24, 32 jam.

a) Hasil uji biokimia pada pembacaan suhu optimal 18-24 jam

(1) *Escherichia coli* (Sari, dkk. 2019)

Pada media TSIA mengalami perubahan warna menjadi kuning pada *slant* dan *deep* dengan menghasilkan gas terlihat dari media seperti pecah atau terbelah dan tidak menghasilkan H_2S.

(2) *Klebsiella pneumoniae* (Darna, dkk. 2018)

Pada media TSIA ditandai dengan perubahan warna media yaitu A/A kuning pada *butt* (dasar) dan kuning pada *slant* (permukaan miring) dan tidak mampu menghasilkan H_2S.

(3) *Serratia marcescene*

Pada media TSIA hanya memfermentasi glukosa sehingga menghasilkan asam yang menyebabkan warna dasar (*butt)* menjadi kuning dan bagian miring (*slant)* tetap berwarna

merah dalam posisi basa sehingga fermentasi alk/a atau alkali/acid, fermentasi glukosa dengan atau tanpa diikuti produksi gas (Rosidah. 2016).

(4) *Providencia rettgeri* (Koreishi, dkk. 2006)

Pada media TSIA menghasilkan asam pada glukosa (*butt),* tidak menghasilkan gas dan tidak dapat memfermentasi laktosa dan sukrosa (*slant*) serta tidak menghasilkan hidrogen sulfida.

(5) Gula-gula untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan gas yaitu dengan : fermentasi positif media menjadi kuning, gas positif terdapat bagian kosong pada tabung durham.

J. Teknis Analisa Data

Teknik analisa data pada karya tulis ini ditentukan berdasarkan hasil observasi pembentukan fermentasi acid/acid dan alkali/acid pada media TSIA oleh bakteri *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescene,* dan *Providencia rettgeri* dengan variasi waktu inkubasi yang berbeda-beda.

Tabel 3.1 Matriks Observasi Pembentukan Fermentasi pada TSIA

Waktu	Keterangan
Hari I	Penyuburan pada media BHI
Hari II	Uji karakteristik sel dengan pengecatan gram & penanaman pada media *Mac Conkey*
Hari III	Uji karakteristik sel dengan pengecatan gram, penanaman pada media TSIA & pengamatan hasil pada inkubasi 8 jam
Hari VII	Pengamatan pembentukam fermentasi pada inkubasi 16, 24 dan 32 jam

Tabel 3.2 Pengamatan Fermentasi pada TSIA

Bakteri Gram Negatif	**Variasi Masa Inkubasi (jam)**			
	8	**16**	**24**	**32**
Escherichia coli				
Klebsiella pneumonia				
Serratia marcescene				
Providencia rettgeri				

Pengamatan fermentasi dilihat berdasarkan pembagian zona *slant* (miring) dan *butt* (dasar) dengan membagi setiap bagian tersebut menjadi 4 bagian.

K. Jadwal Penelitian

Tabel 3.3 Jadwal Rencana Penelitian

No	Kegiatan	Januari	Februari	Maret	April
1	Penyusunan proposal				
2	Konsultasi proposal				
3	Ujian proposal				
4	Penelitian				
5	Pengolahan data dan penyesuaian hasil penelitian				
6	Konsultasi hasil				
7	Ujian KTI				
8	Perbaikan laporan				
9	Seminar hasil				

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Berdasarkan dari hasil penelitian yang telah dilakukan mengenai uji observasi pembentukan hasil fermentasi pada media TSIA pada berbagai variasi waktu inkubasi dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan hasil fermentasi acid/acid dan alkali/acid pada media TSIA yang di hasilkan oleh bakteri *Escherichia coli, Klebsiella pneumonia, Serratia marcescene* dan *Providencia rettgeri* pada variasi waktu inkubasi 8, 16, 24, dan 32 jam.

B. Saran

Bagi peneliti

a. Peneliti selanjutnya dapat melakukan penelitian uji observasi pembentukan fermentasi pada TSIA dengan sampel bakteri dan waktu inkubasi yang berbeda atau lebih beragam.
b. Peneliti selanjutnya dapat melakukan penelitian uji observasi tidak hanya pada pembentukan fermentasi pada TSIA saja, namun dapat disertai dengan penambahan fungsi lain media TSIA seperti gas dan hidrogen sulfide (H_2S).
c. Peneliti selanjutnya dapat melakukan pengukuran pH terhadap warna yang dihasilkan oleh hasil proses fermentasi.

d. Peneliti selanjutnya dapat melakukan penelitian uji observasi pembentukan fermentasi dengan variasi media uji yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

Al-Gburi, N. M. A. 2020. *Isolation and Molecular Identification and Antimicrobial Susceptibility of Providencia* spp*. From Raw Cow's Milk in Baghdad, Iraq. Research Article Veterinary Medicine International.* Volume 2020. Article ID 8874747

Amrita. 2011. *Triple Sugar Iron Agar. Virtual Amrita Laboratories Universalizing Education.* http://vlab.amrita.edu/ diakses pada 6 Maret 2021.

Aryal, S. 2018. *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) *Test*. Microbe Notes. *Online Microbiology and Biology Study Notes.* https://microbenotes.com/triple-sugar-iron-agar-tsia-test/ diakses pada 16 Januari 2021

Azis, M.M.R.S. (2017). Uji Aktivitas Antibakteri Fungi Endofit dari Buah Tanaman Nangka Muda (*Artocarpusheterophyllus* Lamk*)* Terhadap *Staphylooccus aureus, Shigella dysenteriae,* dan *Escherichia coli*. *Skripsi*. Universitas Syarif Hidayatullah Jakarta

Chester, R,. Cooper, J. R. 2018. *Triple Sugar Iron* (TSI) Test. *Microbiology Laboratory,* BIOL 3702l

Darna., Turnip, M., Rahmawati. 2018. Identifikasi Bakteri Anggota *Enterobacteriaceae* pada Makanan Tradisional Sotong Pangkong. *Jurnal Labora Medika,* 2 (2) : 6-12

Delvana, R. 2018. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Pelarut Fosfat pada Tanah Pertanaman Sayur-Sayuran di Kec. Marpoyan Damai Pekanbaru. *Skripsi.* Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau

Devina, Y., Prakasita, V. C., Setiawan, D. C. B., Wahyuni, A. E. T. H. 2020. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Pepaya, Daun Kemangi Serta Temu Ireng, dan Madu terhadap Bakteri *Serratia marcescene. Jurnal Veteriner.* 21 (2) : 1-9

Fhitryani, S., Suryanto D., Karim A. 2017. Pemeriksaan *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* dan *Salmonella sp.* pada Jamu Gendong yang Dijajakan di Kota Medan. *BioLink,* 3 (2) : 142-151.

Fitria, N., Lindasari, E. 2021. Optimasi Perolehan Bioetanol dari Kulit Nanas (*Ananas cosmosus*) dengan Penambahan Urea, Variasi Konsentrasi

Inokulasi Starter dan Waktu Fermentasi. *Jurnal Online Institut Teknologi Nasional.* 1 (9).

Haryani, Y., Chainulfiffah., Rustiana. 2012. Fermentasi Karbohidrat oleh Isolat *Salmonella sp.* dari Jajanan Pinggir Jalan. *Jurnal Ind.Che.Acta*. ISSN 2085-0050

Izzati, M. 2018. Perbandingan Hasil Identifikasi Bakteri Gram Negatif Menggunakan Teknik Biokimia Otomatis (VITEK®2) dan Maldi-Tof MS (VITEK®MS). *Skripsi*. Universitas Sebelas Maret

Koreishi, A. F., Schechter, B. A., Karp, C. L. 2006. *Ocular Infections Caused by Providencia rettgeri. Original Article Ophthalmology.* 133(8) : 1463-1466.

Mansauda, K., Fatimawati., Novel, K. 2014. Analisis Cemaran Bakteri Coliform pada Saus Tomat Jajan Bakso Tusuk yang Beredar di Manado. *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi*, 3 (2) : 2303-2493.

Maulana, M. N. 2019. Identifikasi Bakteri pada Lindi di Tempat Pembuangan Sampah Terpadu (TPST) Mulyoagung Bersatu Kecamatan Dau Kabupaten Malang dan Kajian Implementasinya Sebagai Sumber Belajar Biologi. *Skripsi.* Universitas Muhammadiyah Malang

NCBI (National Center for Biotechnology Information). (2020). *Taxonomy of Providencia retgerri* (online). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=587. Diakses pada tanggal 14 Juni 2021

Rezatinur, W. 2017. Analisis Cemaran Mikroba yang Terdapat pada Bakso Goreng yang Dijajakan di Sekitar MAN 3 Rukoh Banda Aceh Sebagai Penunjang Praktikum Mikrobiologi. *Skripsi.* Universitas Islam Negeri AR-Raniry Darussalam

Rosidah, U. 2016. Tepung Ampas Tahu Sebagai Media Pertumbuhan Bakteri *Serratia marcescene. Skripsi.* Universitas Muhammadiyah Semarang.

Rushayati, S. B. 2007. Mengenal Keanekaragaman Hayati. Yayasan Kehati: Grasindo.

Sari, D. P., Rahmawati., Rusmiyanto, E. 2019. Deteksi dan Identifikasi Genera Bakteri *Coliform* Hasil Isolasi dari Minuman Lidah Buaya. *Jurnal Labora Medika*, 3 (1) : 29-35

Sutiknowati, L. I. 2016. Bioindikator Pencemar Bakteri *Escherichia coli*. *Oseana,* XLI (4) : 63-71

Tankeshwar, A. 2013. *Triple Sugar Iron Agar* (TSI): *Principle, Procedure and Interpretation.* http://microbeonline.com/triple-sugar-iron-agar-tsi-principle-procedure-and-interpretation/ diakses pada 5 Maret 2021.

Tarina, N. T. I., Kusuma, S. A. F. 2017. Deteksi Bakteri *Klebsiella pneumoniae. Farmaka*. 15 (2)