

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

a. Klasifikasi

Klasifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat dilihat pada uraian di bawah ini:

Kingdom : Bacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Gamma Proteobacteria

Ordo : Pseudomonadales

Family : Pseudomonadaceae

Genus : *Pseudomonas*

Species : *Pseudomonas aeruginosa* (Soedarto, 2015)

b. Deskripsi

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri patogen oportunistik, yaitu bakteri yang dapat menyebabkan penyakit pada tubuh manusia. Bakteri ini dapat ditemukan di tempat yang memiliki kelembapan lingkungan seperti di rumah sakit dan penyebarannya tersebar luas. *Pseudomonas aeruginosa* ditemukan pada luka bakar, fibrosis kistik dan pada pasien dengan penyakit neutropenik (Johnson, dkk., 2010).

c. Morfologi dan Karakteristik

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri Gram negatif, berbentuk basil dengan ukuran 0,6 x 2 µm, bersifat aerobik obligat, dan dapat bergerak aktif dengan menggunakan flagel pada kedua kutubnya. Apabila dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop, bakteri ini terlihat sebagai bakteri tunggal, berpasangan dan terkadang membentuk rantai pendek (Jawetz, dkk., 2012). Bakteri ini tidak memiliki spora, dapat tumbuh pada suhu 37-42°C (mesofil) dan bila dibiakkan pada medium *blood agar* akan menunjukkan hemolisis beta (Soedarto, 2015). Kemampuannya untuk tumbuh pada suhu 42°C membantu membedakannya dari spesies *Pseudomonas* lain dari grup fluoresens. *Pseudomonas aeruginosa* juga mampu memproduksi bau manis pada media biakan yang dihasilkan aminoasetafenon, serta terbentuk koloni bulat dengan warna fluoresen kehijauan (Jawetz, dkk., 2012).

Tipe koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* beragam berdasarkan asalnya yaitu koloni yang kecil dan kasar berasal dari isolat alami dari tanah atau air, koloni besar dan halus dengan tepi datar berasal dari bahan klinik dan koloni halus, berlendir (mukoid) berasal dari sekresi saluran napas dan saluran kemih (Soedarto, 2015). Bentuk koloni yang beragam menunjukkan perbedaan aktivitas biokimia dan enzimatik serta kepekaan terhadap antimikroba (Brooks, dkk., 2005).

Identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dilakukan dengan identifikasi atau pengamatan koloni, pewarnaan Gram dan uji biokimia (Purwaningsih dan Wulandari, 2021).

Bentuk mikroskopis *Pseudomonas aeruginosa* dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 1. Bentuk mikroskopis *Pseudomonas aeruginosa*

Sumber : Todar, 2012.

d. Pertumbuhan dan Pemiakan

Pseudomonas aeruginosa tumbuh dengan cepat pada berbagai jenis media pembiakan, tidak meragikan laktosa, terkadang memproduksi bau manis seperti anggur. Penelitian tingkat laboratorium dapat menggunakan medium paling sederhana untuk pertumbuhannya yang terdiri dari asam asetat (sumber karbon) dan ammonium sulfat (sumber nitrogen) (Todar, 2012). Pada medium MacConkey membentuk koloni yang jernih. *Pseudomonas aeruginosa* menghasilkan pigmen khas *pyocyanin* (biru-hijau) yang larut dalam agar dan didistribusikan ke dalam media perbenihan. Namun, tidak semua *Pseudomonas aeruginosa* menghasilkan *pyocyanin*, beberapa

menghasilkan *pyoverdine* (kuning hijau dan berfluoresensi) dan *pyorubin* (merah-coklat) (Soedarto, 2015).

e. Patogenitas

Pseudomonas aeruginosa adalah flora normal pada kulit manusia, bakteri ini menjadi patogenik apabila berada ditempat yang memiliki fungsi pertahanan tidak normal. Contohnya pada kasus rusaknya jaringan yang terjadi di selaput lendir dan kulit, penggunaan kateter untuk pembuluh darah atau pada uterus dan ketika kemoterapi penyakit kanker. Bakteri akan melekat dan menyerang bagian selaput lendir atau kulit kemudian, bakteri ini akan menyebar ke bagian yang dituju dan menimbulkan penyakit sistemik. Proses tersebut dibantu oleh pili, enzim dan toksin (Jawetz, dkk., 2012).

Pili atau fimbriae akan menjulur dari permukaan sel, fungsinya untuk membantu proses perlekatan pada sel epitel inang. Isolat *Pseudomonas aeruginosa* yang berasal dari infeksi klinis akan menghasilkan enzim ekstrasuler, elastase, protease dan dua hemolisin yaitu fosfolipase C yang tidak tahan terhadap panas dan suatu glikolipid yang tahan terhadap panas. Strain *Pseudomonas aeruginosa* akan menghasilkan eksotoksin A yang dapat mengakibatkan kerusakan jaringan. Antitoksin terhadap eksotoksin A dapat ditemukan dalam serum manusia, termasuk pada pasien yang sudah sembuh dari infeksi *Pseudomonas aeruginosa*. Demam, syok, gejala susah bernapas yang terjadi pada orang dewasa, oliguria,

gangguan koagulasi darah (DIC), lekositosis dan leukopenia disebabkan karena adanya lipopolisakarida (Jawetz, dkk., 2005).

Pseudomonas aeruginosa memiliki slime layer yang bersifat antigenik sehingga mempersulit proses fagositosis. Selain itu, Kebanyakan *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan faktor virulensi eksotoksin A yang dapat menyebabkan nekrosis dan terhambatnya sintesis protein serta menggunakan eksoenzim (ExoU) untuk merusak membran plasma eukariotik sehingga menyebabkan terjadinya lisis (Soedarto, 2015).

Pseudomonas aeruginosa tahan terhadap konsentrasi yang tinggi dari garam dan zat warna, antiseptik lemah dan berbagai jenis antibiotika sehingga infeksi yang disebabkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* sukar diobati dengan antibiotika yang biasa digunakan (Soedarto, 2015).

2. Teknik Penyimpanan dan Pemeliharaan Bakteri

Penyimpanan (preservasi) kultur bakteri memiliki tujuan utama yaitu mereduksi atau mengurangi laju metabolisme bakteri, sehingga perlu dilakukan penentuan teknik penyimpanan atau pengawetan yang tepat. Teknik penyimpanan yang baik harus dapat mempertahankan viabilitas atau daya hidup bakteri (Setiaji, 2015).

Penyimpanan atau koleksi meliputi jangka panjang maupun jangka pendek. Penyimpanan jangka pendek merupakan penyimpanan yang

dilakukan untuk keperluan rutin penelitian yang disesuaikan dengan kegiatan program tertentu. Penyimpanan jangka panjang dilakukan apabila suatu saat diperlukan dapat diperoleh kembali atau dalam keadaan tersedia sehingga harus mempertahankan daya hidup bakteri (Setiaji, 2015).

Beberapa teknik pengawetan dan penyimpanan mikroba sudah banyak dilakukan dan dikembangkan. Namun untuk memilih suatu metode yang akan digunakan untuk penyimpanan bakteri yang tepat perlu memperhatikan beberapa faktor penting diantaranya yaitu jumlah kultur, nilai ekonomis kultur, frekuensi penggunaan kultur, fasilitas yang dimiliki yang meliputi sumber daya manusia dan peralatan yang ada serta biaya. Dari beberapa faktor tersebut, hal yang paling penting adalah untuk menjaga agar mikroorganisme yang diawetkan dan disimpan tidak mati, tidak terkontaminasi, tidak mengalami perubahan populasi dan tidak mengalami perubahan genetik (Novelina, 2005).

Berikut adalah beberapa teknik penyimpanan bakteri yang digunakan untuk menyimpan bakteri :

a. Peremajaan Berkala

Teknik peremajaan berkala merupakan teknik pemeliharaan kultur murni tertua yang digunakan untuk memelihara koleksi isolat mikroba di laboratorium yang dilakukan dengan cara memperbarui biakan mikroba dari biakan lama ke medium baru secara berkala, misalnya sebulan atau dua bulan sekali. Peremajaan berkala tidak dianjurkan untuk penyimpanan dan pemeliharaan jangka panjang karena

kemungkinan terjadinya kontaminasi sehingga harus melakukan identifikasi untuk memperoleh kultur standar bakteri yang murni (Sharman, dkk., 2009). Penyimpanan dengan cara peremajaan berkala ini memiliki kelemahan, yaitu kemungkinan terjadinya kontaminasi, hilangnya viabilitas dan terjadinya perubahan genetik melalui seleksi varian (Yuniarti, 2003).

b. Penyimpanan dalam Akuades Steril

Penyimpanan dalam akuades steril hanya dapat digunakan untuk beberapa bakteri, terutama bakteri Gram negatif dan berbentuk batang, misalnya anggota genus *Pseudomonas* (Prastowo, 2019). Pada kondisi penyimpanan ini, bakteri yang disimpan masih berpeluang tumbuh dengan lambat, sehingga tidak dapat dijamin stabilitas genetiknya untuk jangka panjang. Penyimpanan dengan cara ini juga memungkinkan terjadinya kontaminasi. Oleh karena itu, cara ini lebih dianjurkan sebagai alternatif penyimpanan jangka sedang atau sebagai pendamping jangka panjang (Machmud, 2001).

c. Penyimpanan dalam Tanah Steril

Teknik penyimpanan dalam tanah steril bermanfaat bagi fungi, *Streptomyces sp.*, dan bakteri yang membentuk spora seperti *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.*, dan *Rhizobium sp.* Keuntungan dari teknik ini yaitu biaya murah, penyimpanan pada suhu ruang, dan dapat mempertahankan stabilitas genetik mikroba (Sumarsih, 2014).

d. Penyimpanan dalam Minyak Mineral

Teknik penyimpanan dalam minyak mineral merupakan salah satu teknik yang paling sederhana untuk memelihara bakteri, khamir dan jamur. Metode penyimpanan dalam minyak mineral dilakukan dengan cara menyimpan biakan bakteri dalam tabung dan menutupnya dengan minyak mineral atau parafin cair. Bakteri ditumbuhkan pada tabung berisi medium agar miring atau medium cair (*broth*) yang sesuai, lalu permukaan biakan ditutup dengan minyak mineral steril setinggi 10-20 mm dari permukaan atas medium. Metode ini memiliki kelemahan yaitu kurang praktis untuk di transportasi dan keberadaan minyak mineral mengakibatkan peremajaan menjadi kotor (Sumarsih, 2014).

e. Penyimpanan dengan Metode Kering Beku atau Liofilisasi

Metode liofilisasi atau disebut juga pengeringan beku (*freeze drying*) merupakan salah satu penyimpanan kultur bakteri jangka panjang. Liofilisasi (*lyophilization*) adalah metode penyimpanan kering beku untuk mengawetkan kultur jangka panjang menggunakan bahan pelindung atau lioprotektan. Penambahan lioprotektan dilakukan sebelum proses liofilisasi untuk meminimalisir kerusakan sel bakteri. Beberapa lioprotektan yang dapat digunakan untuk bakteri yaitu susu skim, sukrosa, trehalosa dan gliserol. Lioprotektan yang digunakan dapat berbahan dasar gula karena gula mempunyai kemampuan untuk melindungi struktur protein dalam keadaan kering. Gula yang dapat

berfungsi sebagai lioprotektan untuk protein meliputi glukosa, laktosa, trehalosa, maltodektrin dan manitol. (Puspawati, dkk., 2010).

Proses kering beku merupakan kombinasi dua teknik penyimpanan jangka panjang paling baik, yaitu pembekuan dan pengeringan. Garis besar tahapan proses ini meliputi pembuangan uap air dengan cara sublimasi vakum dari status beku (Machmud, 2001).

Prinsip dari liofilisasi yaitu membekukan sampel secara cepat dalam kondisi hampa udara untuk menghindari terbentuknya kristal-kristal es yang dapat merusak sampel. Penghilangan kadar air pada sampel dilakukan dengan mengatur tekanan dan suhu. Umumnya sampel yang dapat diliofilisasi yaitu sampel seperti protein, bakteri, jamur, virus, obat-obatan, plasma sel dan jaringan yang sensitif terhadap panas dan mudah rusak jika pengeringan dilakukan pada kondisi standar (Carpentier, dkk., 2007).

Teknik pengeringan beku merupakan yang terbaik untuk dapat mencegah terjadinya perubahan kimia dan meminimalkan kehilangan nutrien selama proses pengeringan berlangsung. Kultur kering beku mempunyai penampakan jernih, padat dan memiliki viabilitas sel yang baik. Pengeringan beku dapat mempertahankan bentuk kaku dari bahan yang dikeringkan sehingga dapat menghasilkan produk kering yang berpori dan tidak berkerut. Produk kultur yang mengalami proses pengeringan beku memiliki beberapa keuntungan. Keuntungan produk kering beku antara lain: kering, stabil, menempati volume yang kecil

sehingga dapat menekan biaya penyimpanan dan pengiriman (Machmud, 2001). Selain itu, keunggulan produk hasil liofilisasi antara lain adalah dapat mempertahankan stabilitas produk, dapat mempertahankan stabilitas struktur bahan sehingga dapat meningkatkan daya rehidrasi, daya hidup dan rekonstitusi sel-sel hidup tetap tinggi (Pujihastuti, 2009).

3. Angka Lempeng Total (ALT)

Proses liofilisasi memiliki tujuan untuk mengawetkan kultur jangka panjang dengan mempertahankan daya hidup bakteri. Metode kuantitatif yang digunakan untuk mengetahui daya hidup bakteri dapat dilakukan perhitungan Angka Lempeng Total (ALT) atau disebut juga *Total Plate Count* (TPC). ALT merupakan jumlah bakteri yang ditemukan dalam per gram atau per milliliter sampel (Puspawati, dkk., 2010).

Angka Lempeng Total (ALT) umumnya dikenal sebagai metode kuantitatif yang digunakan untuk mengetahui jumlah mikroba yang ada pada satu sampel atau untuk mengetahui daya hidup bakteri, hasil akhir berupa koloni yang diamati secara visual dengan menggunakan media padat yaitu *Plate Count Agar* (PCA).

Prinsip dari metode hitungan cawan adalah menumbuhkan sel bakteri hasil pengenceran yang masih hidup pada metode agar, sehingga sel tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dengan mata tanpa menggunakan mikroskop (Fardiaz, 1993).

Pengenceran yang digunakan yaitu diawali dari 1:10 dan dilakukan kelipatannya. Koloni bakteri yang tumbuh pada media dihitung dan dikalikan dengan kebalikan pengenceran, sehingga diketahui jumlah bakteri tiap gram atau tiap mililiter sampel (Retnaningrum, dkk., 2017). Hasil akhir dari perhitungan ALT berupa angka dalam koloni (CFU/*Colony Forming Unit*) per gram atau per milimeter dapat pula koloni per 100 milimeter (BPOM-RI, 2008).

Beberapa metode perhitungan ALT sebagai berikut:

- 1) *Pour Plate* (cawan tuang), merupakan metode untuk menumbuhkan bakteri di dalam media agar dengan cara mencampurkan media agar yang masih cair dengan suspensi bakteri sehingga sel-sel tersebut tersebar merata. Suspensi bakteri perlu dilakukan pengenceran sebelum ditumbuhkan pada medium agar di dalam cawan petri. Metode cawan tuang ini membutuhkan ose atau pipet untuk melakukan pengenceran biakan bakteri secara berseri, kemudian inokulum yang telah diencerkan tersebut dituangkan pada media agar cair di dalam cawan petri, dicampur, lalu dibiarkan hingga memadat (Cappuccino dan Sherman, 2013).
- 2) *Spread Plate* (cawan sebar), merupakan suatu metode untuk menumbuhkan bakteri dengan cara menuangkan suspensi bakteri ke media agar yang telah memadat lalu disebar atau digores secara merata. Sel bakteri disebarkan pada permukaan media agar padat menggunakan ose bengkok atau ose yang berbentuk “L” steril selama

inokulasi dan cawan petri diputar. Sama halnya dengan metode *pour plate*, pada metode ini juga dilakukan pengenceran suspensi bakteri sebelum ditumbuhkan pada medium agar di dalam cawan petri.

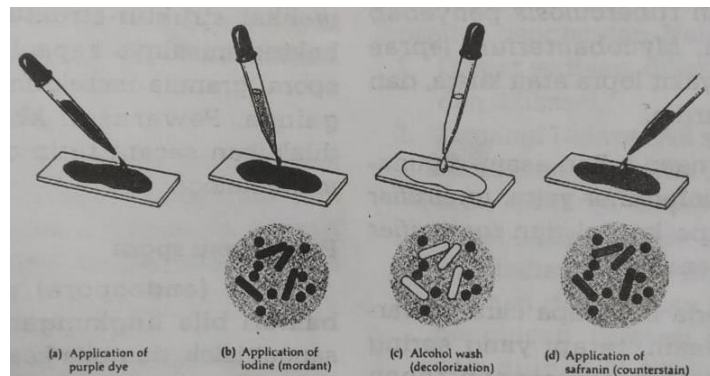
4. Pengamatan Morfologi

Bakteri memiliki morfologi yang berbeda antara satu dengan yang lainnya. Pengamatan morfologi koloni bakteri digunakan untuk mengidentifikasi bakteri. Pengamatan morfologi dilakukan dengan mengamati koloni yang tumbuh dalam medium pertumbuhan dan morfologi sel yang diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran tertentu. Parameter morfologi koloni sel dalam medium pertumbuhan yang diamati berupa warna, bentuk dan letak koloni dalam medium (Cappuccino dan Sherman, 1987).

Pengamatan morfologi bakteri dapat dilakukan dengan teknik pengecatan atau pewarnaan bakteri. Pewarnaan bakteri bertujuan untuk memudahkan melihat bakteri dengan mikroskop, memperjelas bentuk bakteri, untuk melihat struktur luar dan struktur dalam bakteri seperti dinding sel dan vakuola, menghasilkan sifat-sifat fisik dan kimia yang khas daripada bakteri dengan zat warna, serta meningkatkan kontras mikroorganisme dengan sekitarnya (Pelczar dan Chan, 2008).

Pewarnaan terhadap bakteri yang paling sering dilakukan adalah pewarnaan Gram. Pewarnaan tersebut untuk mengetahui morfologi, struktur dan karakteristik bakteri. Prosedur pewarnaan Gram dimulai

dengan pemberian Kristal violet, setelah itu ditambahkan larutan iodium maka semua bakteri akan berwarna biru. Setelah itu ditambahkan alkohol. Bakteri Gram positif membentuk kompleks kristal iodine yang berwarna biru. Setelah ditambahkan safranin, bakteri Gram positif akan berwarna ungu (Cappuccino dan Sherman, 2014). Sedangkan bakteri Gram negatif kehilangan zat warna ungu gantiannya dan mengambil zat warna kedua yaitu fuksin karbol encer atau safranin yang berwarna merah (Gupte, 1990).



Gambar 2. Prosedur Pewarnaan Gram

Sumber: Universitas Brawijaya, 2003.

Teknik pewarnaan Gram memiliki kelebihan yaitu sebagai metode paling sederhana dan murah untuk diagnosis cepat infeksi bakteri. Metode ini jauh lebih cepat dibandingkan dengan kultur bakteri, dan sebagai pedoman awal untuk memutuskan terapi antibiotik sebelum tersedia bukti definitif bakteri penyebab infeksi secara spesifik. Sedangkan kekurangan dari metode ini yaitu hanya dapat mengetahui ukuran dan bentuk bakteri serta melihat struktur dalam bakteri dengan zat warna saja. Kondisi pewarnaan Gram dan morfologi bakteri kadang-kadang berubah karena

terapi antimikroba. Spesies batang negatif dapat menjadi filamen dan pleomorfik, sedangkan bakteri Gram positif dapat menjadi bervariasi setelah terapi antimikroba (Nagata, dkk., 2010).

5. Uji Biokimia

Identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan pengujian sifat fisiologisnya berdasarkan reaksi biokimia yang terjadi pada media uji selain dengan pengamatan morfologi bakteri tersebut. Uji biokimia merupakan tahapan lanjutan yang diperlukan untuk mengidentifikasi suatu bakteri (Darmayasa, dkk., 2008).

Uji biokimia bakteri adalah suatu kegiatan yang dilakukan untuk mengidentifikasi dan mendeterminasi suatu biakan murni bakteri hasil isolasi melewati sifat-sifat fisiologisnya. Bagian biokimia erat kaitannya dengan metabolisme sel, yakni selama reaksi kimiawi yang dilakukan oleh sel yang menghasilkan energi maupun yang memakai energi untuk sintesis komponen-komponen sel dan untuk kegiatan seluler, seperti pergerakan (Pelczar dan Chan, 2010)

Bakteri memiliki berbagai aktivitas biokimia dengan menggunakan nutrisi yang diperoleh dari lingkungan sekitarnya. Transformasi biokimia dapat timbul didalam dan diluar dari bakteri yang diatur oleh enzim. Setiap bakteri memiliki kemampuan dengan menggunakan enzim yang dimilikinya untuk degradasi karbohidrat, lemak, protein dan asam amino. Metabolisme ini biasanya menghasilkan produk yang dapat digunakan

untuk identifikasi dan karakterisasi bakteri. Pada prinsipnya pengamatan aktivitas biokimia mikroorganisme diketahui dari kemampuan mikroorganisme untuk menggunakan dan menguraikan molekul yang kompleks dan molekul yang sederhana. Selain itu, metabolisme seringkali menghasilkan hasil sampingan yang dapat digunakan untuk identifikasi (Ramaisyah, 2011).

a. Uji Fermentasi Karbohidrat

Uji fermentasi karbohidrat dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri yang mampu memfermentasikan karbohidrat. Karbohidrat atau gula bisa difermentasikan menjadi berjenis-jenis zat, seperti alkohol, asam dan gas; tergantung pada jenisnya gula dan spesies bakteri (Ferdiaz, 1992).

Pengujian fermentatif ditandai dengan adanya perubahan warna dari warna ungu merah menjadi warna kuning dan juga terlihat adanya pembentukan gelembung gas pada tabung Durham. Perubahan warna yang terjadi menandakan bahwa bakteri ini membentuk asam dari fermentasi glukosa. Pembentukan gelembung gas yang terjadi pada tabung Durham disebabkan oleh adanya reaksi fermentasi karbohidrat (Panjaitan, dkk., 2020). Jenis karbohidrat yang digunakan yaitu monosakarida dan disakarida. Pengujian fermentatif karbohidrat dilakukan dengan menggunakan media karbohidrat yang meliputi glukosa, laktosa, manitol, maltosa dan sukrosa. Penggunaan karbohidrat yang berbeda ini memiliki tujuan sendiri yaitu untuk

melihat stabilitas dari perubahan warna antosianin (Novitriani, dkk., 2017). Pada pengujian terhadap *Pseudomonas aeruginosa* didapatkan hasil positif pada media glukosa, negatif pada media laktosa, negatif pada media manitol, negatif pada media maltosa dan negatif pada media sukrosa (Universitas Brawijaya, 2003).

b. Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

Uji TSIA merupakan uji yang bertujuan untuk membedakan berbagai genus Uji TSIA berfungsi untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa, dan sukrosa). Hasil uji TSIA menunjukkan bakteri yang dapat memfermentasi glukosa ditandai dengan warna kuning (asam) pada dasar media dan berwarna merah pada lereng (basa) Alk/A atau Alkali/Acid. Apabila bakteri dapat memfermentasi semua karbohidrat ditandai dengan warna kuning pada dasar media (asam) dan berwarna kuning juga pada lereng media (asam) A/A atau Acid/Acid. Apabila bakteri tidak dapat memfermentasi semua karbohidrat ditandai dengan warna merah pada dasar media (basa) dan berwarna merah juga pada lereng media (basa) Alk/Alk atau Alkali/Alkali (Anggraini, dkk., 2016). Hasil pengujian terhadap *Pseudomonas aeruginosa* menunjukkan terbentuknya warna merah pada dasar media dan juga pada lereng.

c. Uji Produksi Hidrogen Sulfida (H₂S)

Hasil uji H₂S dan gas terhadap isolat bakteri menunjukkan sebagian kecil isolat bakteri dapat mereaksikan Fe menjadi FeS yang

berwarna hitam atau terjadi kehitaman karena pembentukan metal sulfide (H_2S^+) yaitu: MZ-3, CS-2, dan CS-4. Pengujian hidrogen sulfide (H_2S) dilakukan untuk mengamati kemampuan bakteri dalam mengubah asam amino alanine dan H_2S , sedangkan isolat bakteri yang tidak dapat mereaksikan Fe menjadi FeS yang ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam atau kehitaman (Lumantouw., 2013). Uji produksi H_2S dilakukan pada media *Sulfide Indole Motility* (SIM). Pengujian terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* memberikan hasil negatif dimana tidak terbentuk warna hitam pada media SIM (Sulviana, dkk., 2017).

d. Uji Indol

Indol merupakan senyawa yang mengandung nitrogen yang terbentuk sebagai hasil pemecahan amino triphosphat. Pentingnya uji indol ini adalah karena hanya beberapa jenis bakteri saja yang dapat membentuk indol dan produk ini dapat diuji sehingga dapat digunakan sebagai identifikasi. Adanya indol dapat diketahui dengan penambahan reagen Ehrlich/Kovac's yang berisi paradimetil amino bensaldehid. Uji indol menunjukkan hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna merah pada medium yang menunjukkan bakteri benar enzim triptonase yang bisa menghidrolisis asam amino jenis triptofan yang benar gugus samping indol sehingga indol akan bereaksi dengan reagen uji dan membentuk indol yang berwarna merah (Ferdiaz, 1992). Hasil dari uji indol bakteri *Pseudomonas aeruginosa* menunjukkan negatif atau tidak

terbentuk warna merah setelah penambahan reagen Ehrlich pada media SIM. Hal ini disebabkan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* tidak membentuk indol dan triptophan sebagai sumber karbon (Purwaningsih dan Wulandari, 2021).

e. Uji Motilitas

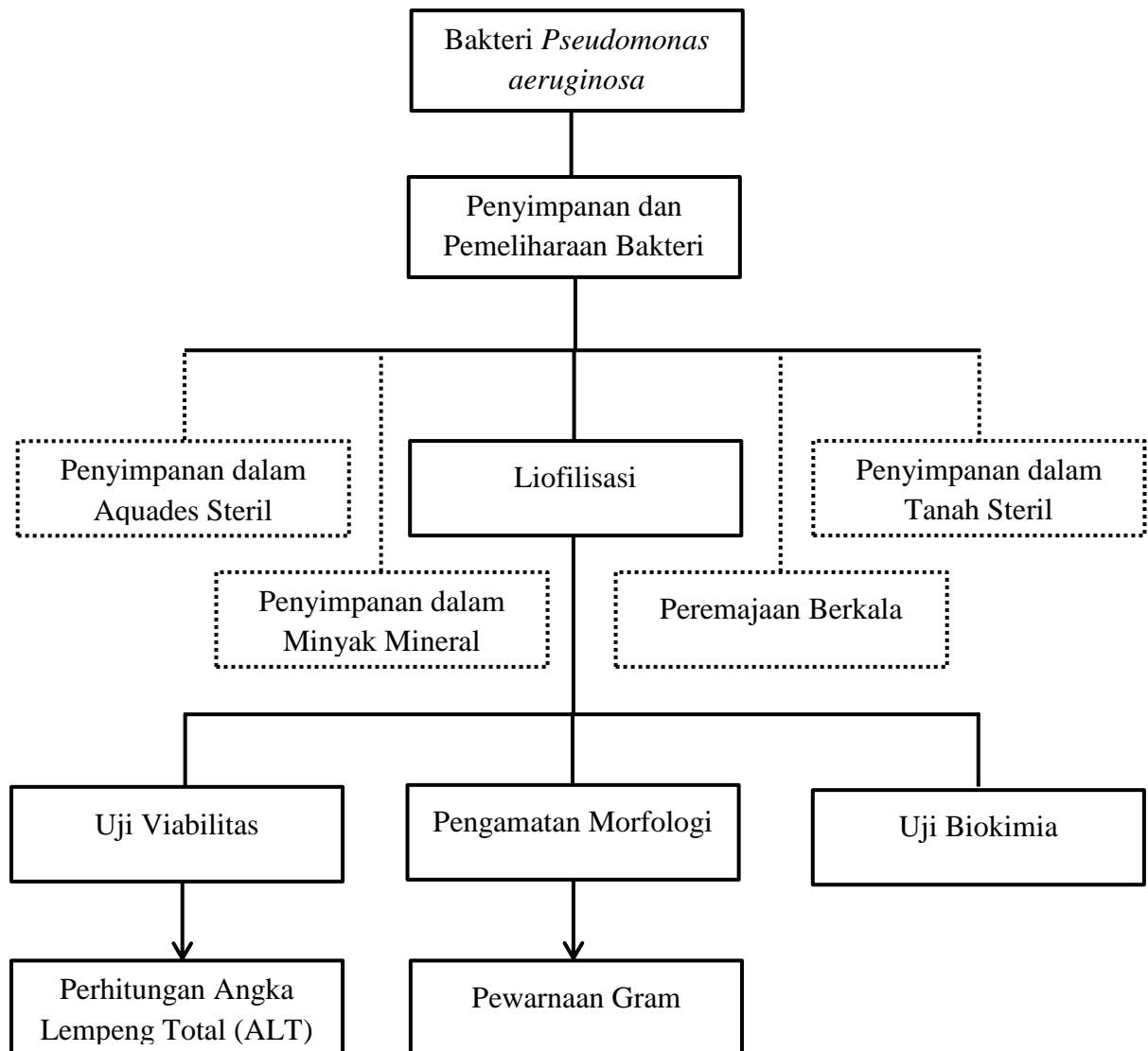
Uji motilitas berfungsi untuk mengetahui gerak. Hasil uji motilitas dapat diketahui negatif (-) ditandai dengan pada bekas tusukan inokulasi saja terdapat bentukan warna putih seperti akar yang menyebar. Apabila positif (+) ditandai dengan disekitar inokulasi terdapat bentukan warna putih seperti akar yang menyebar, dapat diartikan bahwa bakteri yang diinokulasi memiliki flagel sehingga dapat melakukan pergerakan (Handayani, dkk., 2013). Motilitas bakteri *Pseudomonas aeruginosa* positif ditandai dengan adanya pertumbuhan dan penyebaran kekeruhan pada media SIM (Purwaningsih dan Wulandari, 2021).

f. Uji Sitrat

Uji sitrat berfungsi untuk mengetahui sumber karbon bakteri menggunakan sitrat atau tidak menggunakan sitrat. Hasil uji sitrat dapat diketahui negatif (-) ditandai dengan media bakteri tidak mengalami perubahan warna dari hijau menjadi warna biru. Apabila positif (+) ditandai dengan media bakteri mengalami perubahan warna dari hijau menjadi biru, dapat diartikan bahwa salah satu sumber karbon bakteri menggunakan sitrat (Ummamie, dkk., 2017). Uji sitrat

dilakukan pada media *Simmon Citrate* (SC). Pengamatan pada medium *Simmon Citrate* positif berwarna biru yang artinya *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan sitrat sebagai sumber karbon (Purwaningsih dan Wulandari, 2021).

B. Kerangka Teori

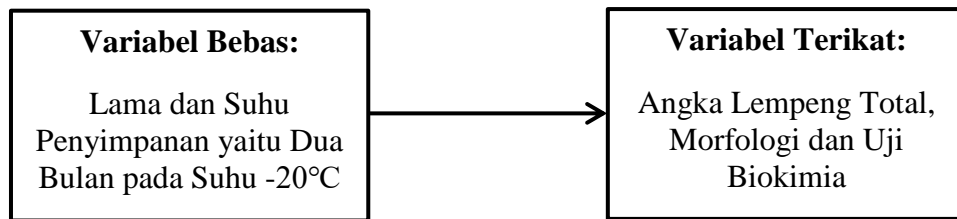


Gambar 3. Kerangka Teori

Keterangan:

- Diteliti
- Tidak Diteliti

C. Kerangka Konsep



Gambar 4. Kerangka Konsep

D. Pertanyaan Penelitian

1. Bagaimana viabilitas liofilisat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang disimpan selama dua bulan pada suhu -20°C?
2. Bagaimana morfologi liofilisat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* setelah disimpan selama dua bulan pada suhu -20°C?