

Alternatif Phospat Buffer Sebagai Pengganti Cacodylate Buffer Pada Preparasi Bakteri Dengan Penggunaan Scanning Elektron Mikroskop

Soeyati Poejiani¹, Wahyudha Ngatiril Lady²

¹ Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, ucik.fk@ub.ac.id

² Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, ladymania.fk@ub.ac.id

Submisi: 30 Januari 2024; Penerimaan: 19 Februari 2025

ABSTRAK

Struktur morfologi permukaan bakteri jika diamati dengan mikroskop binokuler hanya akan menampakkan bentuk batang, kokus dan spiral saja, sehingga perlu adanya mikroskop yang mempunyai resolusi tinggi. Salah satu mikroskop dengan resolusi tinggi tersebut adalah scanning electron (SEM). Preparasi untuk pengamatan dengan menggunakan SEM dibutuhkan tahapan-tahapan. Salah satu tahapan tersebut adalah fiksasi. Bahan yang digunakan fiksasi biasanya menggunakan buffer cacodylate. Buffer ini selain harganya mahal, pemesanan bahan harus import sehingga membutuhkan waktu dan juga bersifat toksik. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk memanfaatkan bahan alternatif untuk menggantikan buffer cacodylate yang bersifat toksik yaitu buffer phospat. Selain harganya murah, buffer phospat mudah di dapat dan tidak bersifat toksik. Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan acak lengkap. Metode penelitian yang digunakan secara kualitatif dengan prosedur bakteri di kultur pada media tumbuh dan preparasi dengan tahapan-tahapan untuk pengamatan dengan SEM.

Kata kunci: : larutan penyangga, fiksasi, SEM

LATAR BELAKANG

Banyaknya peneliti yang mempelajari baik sampel material atau biologis untuk mengamati morfologi permukaan sel. Pengamatan morfologi permukaan sel dibutuhkan alat perbesaran yang lebih tinggi (Hayakawa dan Matsuoto, 2016). Salah satu alat dengan perbesaran yang lebih tinggi adalah Scanning Elektron Mikroskop (SEM). SEM ini merupakan alat yang memiliki resolusi yang tinggi sehingga dapat mengamati morfologi permukaan sel.

Salah satu permukaan sel yang dipelajari oleh para peneliti yaitu morfologi bakteri. Bakteri apabila hanya diamati

dengan mikroskop binokuler dengan perbesaran 1000 hanya akan menampakkan bentuk batang, bulat, spiral, sehingga tidak bisa membedakan ada tidaknya kerusakan morfologi apabila bakteri diberi perlakuan.

Sebelum pengamatan dengan menggunakan SEM, perlu adanya cara mempersiapkan sampel bakteri agar dapat dianalisis dengan tepat dan mendapatkan hasil yang berkualitas. Persiapan ini memerlukan beberapa tahapan. Salah satu tahapan preparasi bakteri untuk pembacaan SEM adalah fiksasi. Fungsi dari fiksasi yaitu menjaga morfologi bakteri agar tidak mudah kempis dan hancur

(Andhika., dkk. 2018). Bahan yang digunakan dalam tahap fiksasi ini adalah *cacodylate buffer* (Bozzolla dan Russel., 1999).

Penggunaan *cacodylate buffer* ini mempunyai kelemahan yaitu harganya mahal, penerimaannya dengan sistem *indent* atau memesan terlebih dahulu karena termasuk barang impor. Berdasarkan uraian tersebut perlu adanya penelitian bahan alternatif yaitu *phospat buffer* sebagai pengganti *cacodylate buffer*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober sampai Nopember 2023. Penelitian dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Klinik FKUB dan Gedung O6 Laboratorium Mineral dan Material Maju Fakultas MIPA Universitas Negeri Malang.

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah adalah *Mac Conkey Agar* (Oxoid), *Nutrien Agar* (Oxoid), *Nutrien Broth* (Oxoid), *NaCl 0,9%* (Merck), aquadest, blue/yellow tip, oksidase strip (Oxoid), pengecatan gram, gelas kaca, gelas penutup, *Ceftazidime* (Merck), *Sodium Cacodylate Trihydrate* (Electron Microcopy Sciences), *Phospat Buffer Saline*, *Glutaraldehid* (Sigma), *Osmium Tetraoxide* (Electron Microcopy Sciences), alkohol 50%, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 95%, alkohol *absolut* (Merck), *t-Butanol* (Merck), *Pseudomonas aeruginosa*.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet mikro (Eppendorf) ukuran 200 μ l-1000 μ l, 20 μ l-200 μ l, ose, api bunsen, korek api, *Laminary Air Flow* (Heraus), Inkubator suhu (Memmert), Autoclave (Tommy), bak pengecatan, cawan petri, *centrifuge* (Dlab), *analytical balance* (Kern), gelas ukur 100 ml, *beaker glass* 500 ml, Spektrofotometri *UV-VIS* (BioRad), *Scanning Electron Microskop*.

Jenis penelitian yang digunakan ialah penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan acak lengkap. Bakteri yang digunakan merupakan variabel bebas sedangkan analisis hasil secara kualitatif dengan prosedur bakteri di kultur pada media tumbuh dan preparasi dengan tahapan-tahapan untuk pengamatan dengan SEM merupakan variabel terikat.

Uji hipotesis pada penelitian ini memanfaatkan bahan alternatif untuk menggantikan *buffer cacodylate* yang bersifat toksik yaitu *buffer phospat*. Data hasil penelitian dianalisis dengan mendiskripsikan kerusakan pada membran sel bakteri dengan menggunakan *Scanning Elektron Microskop*.

Uji Identifikasi Bakteri

Pewarnaan gram

Pewarnaan gram menurut penelitian Chaskes dkk., pada tahun 2015 dapat dilakukan dengan cara membuat sediaan aquadest steril dan koloni bakteri pada gelas benda dan dikeringkan udara. Untuk sediaan cair tidak disuspensikan dengan aquadest steril. Sediaan yang telah kering di fiksasi dengan cara melewatkannya di atas api bunsen. Tetes sediaan dengan kristal violet diamkan selama satu menit, kemudian dibilas dengan air mengalir. Tambahkan lugol dan diamkan selama satu menit, kemudian dibilas dengan air mengalir. Tetes sediaan dengan alkohol 96% diamkan selama satu 5-10 detik, kemudian dibilas dengan air mengalir. Memberi sediaan dengan safranin diamkan selama setengah menit, kemudian dibilas dengan air mengalir. Mengeringkan sediaan yang sudah terwarnai dengan kertas penghisap, meneteskan minyak emersi dan melihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Hasil positif untuk bakteri *Pseudomonas aeruginosa* adalah tercatat merah dan berbentuk batang

Tes Oksidase

Tes oksidase menurut penelitian Gardenia, dkk., (2010) dapat dilakukan dengan cara menyiapkan oksidase tes strip. Secara aseptis mengambil satu koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan ose dan menggoreskan *Pseudomonas aeruginosa* pada oksidase tes stri tersebut. Diamkan selama 10 detik dan mengamati perubahan warna pada kertas oksidase tes. Hasil positif bakteri *Pseudomonas aeruginosa* akan berwarna biru keunguan.

Persiapan Kultur Bakteri Uji

Kultur bakteri uji yang akan digunakan dapat dilakukan dengan cara mengambil satu ose bakteri dari *Nutrien Agar*, kemudian dinokulasikan pada medium cair *Nutrien Broth*. Selanjutnya divortek supaya homogen, lalu diinkubasi pada suhu 37^o selama 1x24 jam didapatkan inokulum yang langsung dapat digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri. Suspensi bakteri uji pada medium cair *Nutrien Broth* yang telah diinkubasi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm sehingga diketahui *Optical Density* (OD) 0,1 setara dengan 10⁸ CFU/ml (Murray, dkk. 1999).

Uji Perbedaan Morfologi Bakteri dengan Scanning Electron Microskop

Metode yang digunakan dalam persiapan sampel untuk pengamatan SEM adalah metode Bozzolla dan Russel (1999) dengan cara melakukan sentrifuge pada suspensi murni bakteri yang berusia 1x24 jam yang sudah diberi perlakuan dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Supernatan yang dihasilkan dibuang dan endapan di cuci dengan Natrium Clorid 0,9% kemudian disentrifuge kembali, pencucian dilakukan sebanyak 2 kali. Endapan ditambah glutaraldehid 2% dengan pH 7,3 dan inkubasi pada suhu ruang selama 1-2 jam. Menambahkan asam tannin 2% pada endapan dan

inkubasi pada suhu ruang selama 1-2 jam. Tambahkan *buffer cocodilate* dan *Buffer Phospat* pada masing-masing sampel yang berbeda dan diinkubasi selama 20 menit. Menambahkan Osmium Tetraoksida 1% dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam. Secara bertahap menambahkan alkohol 50% pada endapan dan didiamkan selama 20 menit, dan alkohol 70%, 80%, 95% dan didiamkan selama 10 menit, alkohol absolut dan didiamkan selama 20 menit. Sentrifuge dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit, tambahkan t-butanol pada endapan dan didiamkan selama 20 menit dan mengulangi sebanyak 2 kali. Membuat hapusan tipis suspensi pada *cover slip* yang telah dibekukan dan keringkananginkan *cover slip*.

Hasil dan Pembahasan

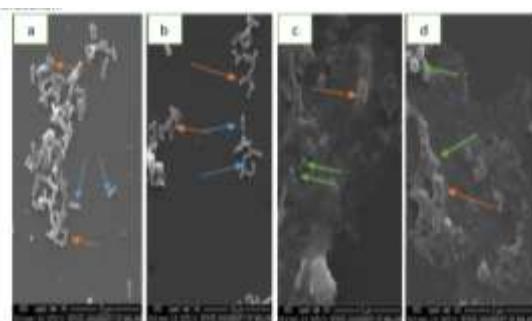
Hasil identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* berdasarkan pengecatan gram didapatkan sel bakteri berbentuk batang, gram negatif berwarna merah (Gambar 1). Identifikasi dilanjutkan uji oksidase dengan menggoreskan koloni bakteri pada kertas oksidase dan dibiarkan 2-5 menit. Hasil menunjukkan oksidase positif, karena terdapat perubahan warna kertas oksidase menjadi biru ungu.



Gambar 1. *Pseudomonas aeruginosa* dengan Pengecatan Gram (perbesaran 1000x).

Hasil Uji morfologi Morfologi Bakteri dengan *Scanning Elektron Microskop* (SEM) dengan penggunaan *Phospat Buffer* dan *Cacodylate Buffer* saat fiksasi pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat

diamati morfologi struktur sel dengan menggunakan SEM pada perbesaran 10.000x (Gambar 2) menunjukkan bahwa tidak nampak adanya perbedaan morfologi struktur sel bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada fiksasi dengan pemberian *Phospat Buffer* dan *Cacodylate Buffer*, membran sel bakteri nampak utuh. Penambahan antibiotik *Ceftazidime* dengan konsentrasi 30 μ g/ml dengan fiksasi menggunakan *Phospat Buffer* dan *Cacodylate Buffer*, membran sel bakteri mengalami kerusakan.



Gambar 2. Hasil Pengamatan SEM

Analisis Data

Gambar 2 (a) Sel bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan fiksasi *Buffer Phospat* berdasarkan hasil pengamatan Mikroskop Elektron (SEM) dengan perbesaran 10.000x. Tanda panah merah menunjukkan permukaan membran sel tidak mengalami kerusakan. Tanda panah biru menunjukkan membran sel bakteri yang terlihat utuh (b) Sel bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan fiksasi *Buffer Cacodylate* berdasarkan hasil pengamatan Mikroskop Elektron (SEM) dengan perbesaran 10.000x. Tanda panah merah menunjukkan permukaan membran sel tidak mengalami kerusakan. Tanda panah biru menunjukkan membran sel bakteri yang terlihat utuh (c) *Pseudomonas aeruginosa* dengan fiksasi *Buffer Phospat* dan pemberian antibiotik *Ceftazidime* konsentrasi 30 μ g/ml berdasarkan hasil pengamatan mikroskop

Elektron (SEM) dengan perbesaran 20.000x. Tanda panah merah menunjukkan permukaan membran sel mengalami pengerutan disertai bentuk tipis dan ada bagian sel yang terlihat kosong. Tanda panah hijau menunjukkan permukaan membransel mengalami pengerutan dan lisis. (d) *Pseudomonas aeruginosa* dengan fiksasi *Buffer Cacodylate* dan pemberian antibiotik *Ceftazidime* konsentrasi 30 μ g/ml berdasarkan hasil pengamatan Mikroskop Elektron (SEM) dengan perbesaran 20.000x. Tanda panah merah menunjukkan permukaan membran sel mengalami pengerutan disertai bentuk tipis dan ada bagian sel yang terlihat kosong. Tanda panah hijau menunjukkan permukaan membran sel mengalami pengerutan dan lisis.

Kesimpulan

Pengamatan mikroskopis dengan elektron mikroskop (SEM) menunjukkan bahwa dengan penggunaan *Buffer Phospat* saat fiksasi tidak ada perbedaan secara morfologis dibandingkan dengan penggunaan *Buffer Cacodylate* saat fiksasi.

Pemberian *Ceftazidime* pada konsentrasi 30 μ g/ml terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan fiksasi *Buffer Phospat* terlihat ada kerusakan pada dinding sel dengan ditandai dengan permukaan membran sel yang mengerut dan lisis. Fiksasi dengan penggunaan bahan *Buffer Cacodylate* menunjukkan morfologi yang sama dengan penggunaan bahan *Buffer Phospat* pada pengamatan SEM.

Penggunaan bahan alternatif *buffer phospat* dapat menggantikan *buffer cacodylate* yang bersifat toksik pada preparasi bakteri dengan pembacaan Scanning Elektron Mikroskop

DAFTAR PUSTAKA

- Adhika, D.R., Anindya, L.A., Tanuwijaya, V., Rachmawati, H. 2018. Prosiding Seminar Nasional Instrumentasi dan Otomasi (SNIKO): Teknik Pengamatan Sampel Biologi dan Non Konduktif Menggunakan Scanning Electron Mikroscopy . Buku Abstrak. Institut Teknologi Bandung.
- Bozzola, M.M.C., Flanders, K.J., Donelly, C.W. 1999. *Principles and Techniques for Biologist*, 2nd edition. Jones and Bartleet Publisher. Boston.
- Chaskes, S. 2015, Stains for Light Microscopy dalam Goldman, E. and Green, L.H.(Eds.), *Practical handbook of Microbiology*, 2nd Ed., 39, CRC Press, New York.
- Gardenia, L. 2010. *Applikasi Deteksi Aeromonas hydrophila penghasil Aerolysin dengan Menggunakan Polymerase Chain Reaction(PCR)*. Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur
- Hayakawa, E.H., Matsuoto, H. 2016. Detailed Methodology For High Resolution Scanning Electron Microscopy (SEM) Of Murine Malaria Parasitized-Erythrocytes. *National Library Medicine*: 539-544.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaffer, M.A., Tenofer, F.C., Yolken, R.H. 1999. *Manual of Clinical Microbiology* 7 Edition. USA: ASM Press.
- Pavani, P., Kumar, K., Rani, A., Venkate, S.U., Lee, J.M., 2021. The Influence Of Phosphate Buffer On The Stability Of Various Proteins. *Journal of Molecular Liquid*, 331: 1 Juni 2021
- Ruzin, E.R. 2018. *Microtechnique And Microscopy*. Oxford: Oxford University Press.