

II. PEWARNAAN SEL BAKTERI

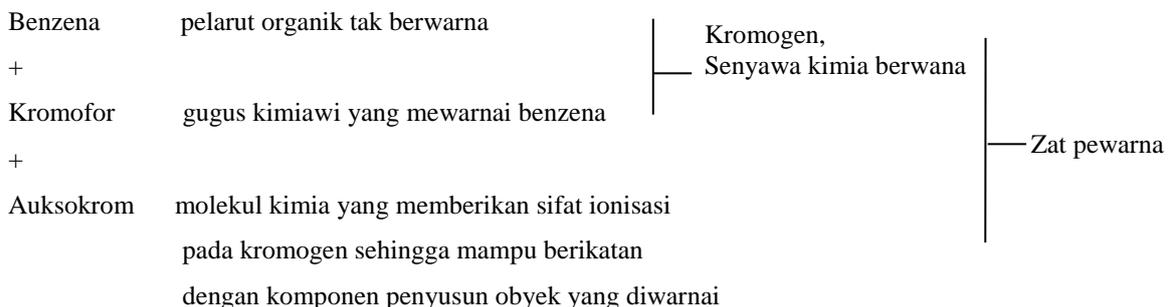
TUJUAN

1. Mempelajari dasar kimiawi dan teoritis pewarnaan bakteri
2. Mempelajari teknik pembuatan apusan kering dalam pewarnaan bakteri
3. Mempelajari tata cara pewarnaan sederhana dan pewarnaan negatif
4. Mempelajari tata cara pewarnaan diferensial; Gram, kapsula dan endospora

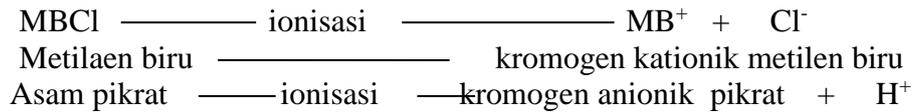
PENDAHULUAN

Mengamati sel mikroba dalam keadaan aslinya cukup sulit, disamping karena ukurannya yang kecil juga karena keberadaan selnya yang transparan. Sel-sel bakteri praktis tidak berwarna bila berada dalam keadaan terlarut dalam medium cair. Untuk memudahkan pengamatan sel bakteri yang tembus cahaya itu maka dikembangkan metode pewarnaan sel.

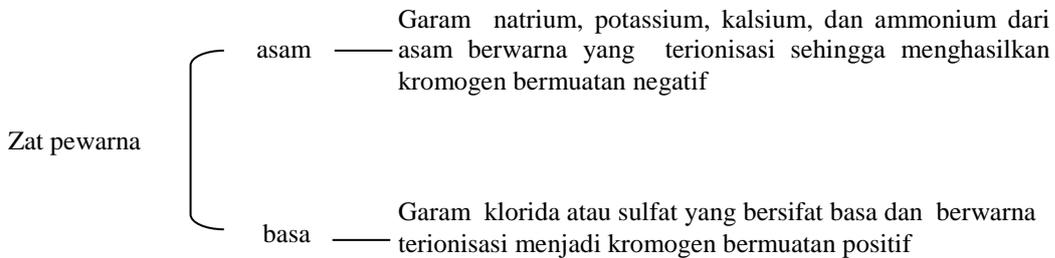
Secara kimiawi, zat pewarna sel bakteri terdiri dari komponen organik yang mengandung cincin benzena, dilengkapi dengan gugus kromofor dan auksokrom.



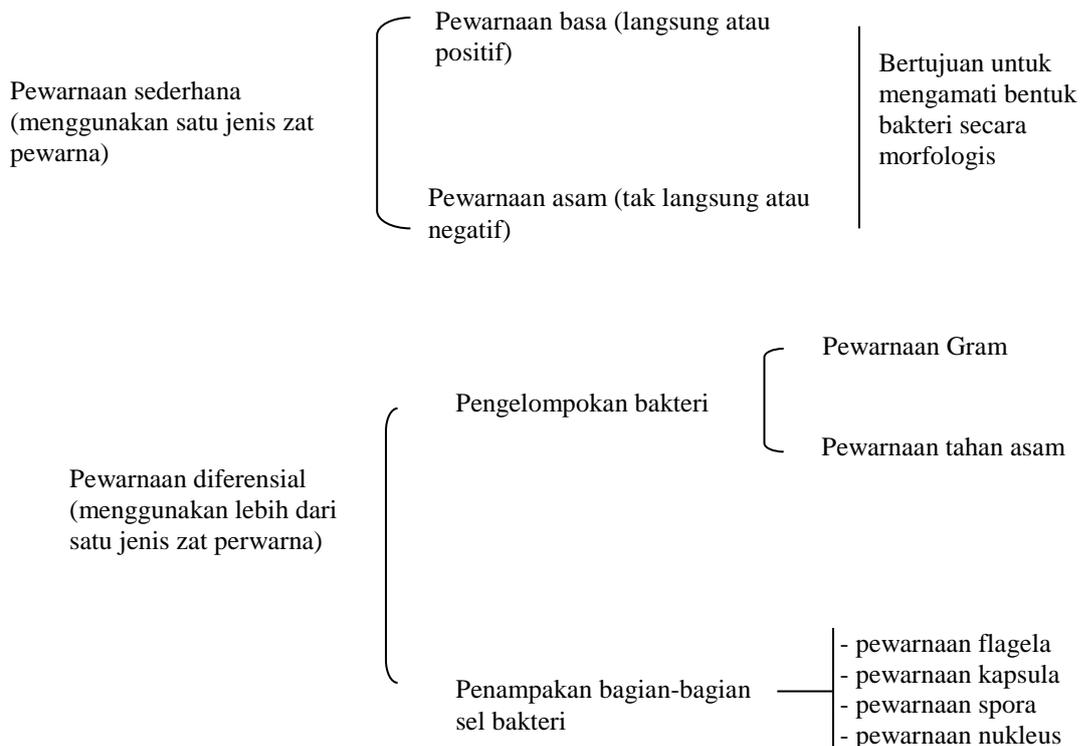
Kemampuan zat pewarna untuk mengikat komponen makromolekul sel semacam protein atau asam nukleat bergantung pada muatan ion yang terdapat pada kromogennya. Berdasarkan garam yang terbentuk dari hasil ionisasi auksokrom dengan kromogen akan diperoleh hasil ionisasi berupa kromogen bermuatan positif (suasana basa) dan kromogen bermuatan negatif (suasana asam). Metilen biru adalah contoh kromogen positif, sedangkan nigrosin dan asam pikrat adalah contoh kromogen negatif.



Pengelompokan zat pewarna :



Banyak metode dan teknik pewarnaan bakteri yang dapat dilakukan untuk berbagai kepentingan pengamatan. Secara ringkas, metode dan teknik tersebut adalah sebagai berikut :



Pewarnaan langsung (positif) mewarnai struktur mikroorganisme sementara pewarnaan tidak langsung (negatif) mewarnai lingkungan sekitar sel mikroba. Hal ini terjadi berkaitan dengan muatan dinding sel mikroorganisme yang cenderung negatif bila berada di lingkungan dengan pH normal.

Persiapan yang harus dilakukan sebelum melakukan proses pewarnaan bakteri adalah : menyiapkan kaca obyek dan membuat apusan preparat kering

Kaca obyek harus bersih, kering dan terutama bebas lemak. Kaca obyek yang kotor akan membuat pengamatan bentuk bakteri menjadi terganggu sedangkan lemak dapat menyebabkan bakteri sukar atau tidak dapat melekat pada kaca obyek. Kaca obyek dibersihkan dengan sabun, air, dan alkohol 96 % sebelum dikeringkan dan digunakan.

Apusan preparat kering dapat disiapkan dari kultur media cair atau kultur media padat. Perlu untuk diperhatikan bahwa apusan harus dibuat setipis mungkin, sehingga ketika dikeringkan akan diperoleh lapisan keputih-putihan yang semi transparan di atas kaca obyek. Hal ini akan sangat memudahkan dalam pengamatan.

Apusan bakteri disiapkan dengan memindahkan kultur pada kaca obyek yang telah diberi satu-dua tetes air bersih. Kultur diratakan menggunakan ujung jarum Oose hingga diperoleh lapisan tipis melebar dan dibiarkan mengering dekat api. Apusan bakteri dari media cair dibuat dengan meneteskan kultur ke atas permukaan kaca obyek lalu meratakan dan mengeringkannya dekat nyala api. Proses pengeringan tidak dilakukan di atas api (terlalu panas) untuk menghindari kerusakan sel karena pemanasan. Pembuatan apusan prepatat kering pada dasarnya merupakan proses fiksasi sebagai usaha melekatkan sel bakteri pada kaca obyek. Apusan yang kurang sempurna akan tercuci pada proses pewarnaan

PERALATAN UMUM

- mikroskop
- lampu spiritus
- jarum inokulasi (Oose)
- kaca obyek

2.1 PEWARNAAN SEDERHANA

PRINSIP DASAR

Mewarnai apusan bakteri dengan satu jenis zat pewarna sederhana yang bersifat basa. Pewarnaan positif menggunakan kromogen kationik bermuatan positif untuk mengikat asam nukleat dan komponen-komponen tertentu dari dinding sel bakteri yang bermuatan negatif.

BAHAN

- a) kultur murni bakteri (*Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus*)
- b) zat pewarna basa (metilen biru dan safranin).
- c) alkohol 96 %

PROSEDUR KERJA

1. Buat apusan kering dari masing-masing bakteri seperti latihan 1.2
2. Teteskan zat pewarna sesuai dengan petunjuk asisten

3. Biarkan masing-masing zat pewarna menutupi seluruh permukaan apusan
 - metilen biru 1 – 2 menit
 - safranin 3 – 10 detik
4. Cucilah kelebihan zat pewarna dengan air secara hati-hati
5. Keringkan kaca obyek dengan kertas hisap atau tissue dengan cara menempelkan kertas hisap / tissue. Jangan menggesek permukaan apusan.
6. Tetesi apusan yang telah diwarnai dengan minyak emersi, lalu amati menggunakan mikroskop.
7. Gambarlah hasil pengamatan berikut warnanya.

2.2 PEWARNAAN NEGATIF

PRINSIP DASAR

Pewarnaan negatif menggunakan zat pewarna asam yang memiliki kromogen bermuatan negatif. Karena permukaan sel cenderung bermuatan negatif, maka zat pewarna asam tidak melekat atau masuk ke dinding sel, melainkan membentuk lingkungan latar belakang sel yang terwarnai. Sel-sel bakteri sendiri akan terlihat terang pada bidang yang terwarnai. Karena pewarnaan ini tidak membutuhkan fiksasi panas, maka bentuk dan susunan sel bakteri tidak rusak dan tampak dalam ukuran alami. Bentuk-bentuk bakteri yang sukar teramati, misalnya bentuk spiral, dapat ditampilkan dengan pewarnaan ini.

BAHAN

- a) Kultur murni bakteri berumur 24 jam : *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*
- b) zat pewarna asam : Tinta cina atau nigrosin

PROSEDUR KERJA

1. Teteskan tinta cina / nigrosin pada kaca obyek.
2. Teteskan tinta cina / nigrosin pada kaca obyek.
3. Ambil sedikit bakteri secara aseptik lalu suspensikan pada zat warna.
4. Sebarkan suspensi bakteri dengan kaca obyek bersih setipis mungkin
5. Biarkan apusan mengering di udara terbuka tanpa pemanasan
6. Amati apusan dengan menggunakan minyak emersi di bawah mikroskop.
7. Gambar dan beri keterangan mengenai apa yang tampak di bawah mikroskop.

2.3 PEWARNAAN GRAM

PRINSIP DASAR

Prinsip dari pewarnaan ini adalah perbedaan komponen dinding sel bakteri : besar kecilnya kandungan peptidoglikan dan keberadaan membran luar yang mempengaruhi kemampuan dinding sel mengikat warna dasar (crystal violet)

setelah pencucian dengan alkohol. Sel bakteri Gram positif yang tidak mengandung membran luar berupa lemak, dindingnya yang dominan mengandung peptidoglikan akan mengikat crystal violet (CV) dengan kuat setelah dikuatkan Iodin. Sementara CV yang terikat membran luar sel Gram negatif akan tercuci (larut) oleh Alkohol. Setelah warna dasar tercuci pada bakteri Gram negatif, warna pembanding yang diberikan (safranin) akan diikat oleh sel, sehingga sel berwarna merah muda. Sementara bakteri Gram positif yang dominan mengandung peptidoglikan akan tetap mempertahankan warna CV (kompleks CV-I) yang berikatan pada peptidoglikan karena alkohol mengkerutkan sel sehingga kompleks CV-I menjadi terjebak lebih kuat dalam dinding sel.

Hal yang penting diperhatikan dalam prosedur pewarnaan ini adalah kecermatan dalam melakukan pencucian warna dasar serta umur biakan bakteri yang akan diwarnai. Bakteri-bakteri tertentu, terutama golongan Gram positif, cenderung memiliki penurunan kemampuan dalam mengikat warna dasar seiring dengan semakin tuanya umur sel. Karena itu, pada kultur bakteri yang umurnya lebih dari 24 jam dapat ditemui hasil pewarnaan yang rancu, sebagian tampak sebagai Gram positif (terwarna biru-ungu) sedangkan yang lainnya tampak seperti Gram negatif (terwarna merah muda)

BAHAN

- a) Kultur murni bakteri berumur 24 jam (*Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*)
- b) zat pewarna (Crystal violet, Gram iodine atau lugol, safranin)
- c) alkohol 96 %

PROSEDUR KERJA

1. Buat apusan dari tiap bakteri yang diberikan asisten.
2. Teteskan pewarna dasar crystal violet, biarkan terendam selama 1 – 2 menit.
3. Cuci kelebihan pewarna dengan air mengalir secara hati-hati.
4. Tetesi apusan dengan lugol atau Gram iodine, biarkan selama 1-2 menit.
5. Buang kelebihan reagen, jangan dicuci dengan air.
6. Rendam apusan dalam alkohol 96 % selama 30 detik.
7. Cuci apusan dengan air mengalir secara hati-hati.
8. Warnai dengan safranin selama 1 menit sebagai warna pembanding
9. Cuci kembali safranin yang berlebih di air mengalir lalu dikeringkan (blot)
10. Amati apusan di bawah mikroskop, gambar serta beri keterangan.

2.4 PEWARNAAN ENDOSPORA

PRINSIP DASAR

Endospora merupakan alat survival bagi bakteri tertentu untuk `istirahat` (dorman) selama kondisi lingkungan tidak menguntungkan atau ekstrim. Endospora memiliki dinding yang sangat tebal dan kompleks hingga resisten terhadap kondisi ekstrim lingkungan. Endospora mampu `berkecambah` kembali menjadi sel vegetatif yang aktif bila kondisi lingkungan telah kembali normal.

Sebagai pewarna dasar digunakan zat pewarna malakit hijau. Zat ini mampu mewarnai sel maupun spora bakteri. Karena endospora sel biasanya telah memiliki lapisan khusus yang sulit ditembus zat pewarna, maka pemanasan dibutuhkan selama proses pengikatan warna dasar untuk membantu proses penetrasi zat warna. Setelah pemberian warna dasar, spora dan sel vegetatif bakteri akan terwarna hijau.

Sebagai pencuci warna dasar digunakan air yang mengalir. Pewarna dasar yang ada di dinding sel akan hilang sementara yang telah terperangkap dalam spora akan bertahan. Sel vegetatif bakteri menjadi tak berwarna sementara spora tetap terwarna hijau.

Sel vegetatif bakteri ini kemudian diwarnai dengan warna pembanding safranin. Dinding sel yang menyerap safranin terwarna merah muda sementara spora tetap terwarna hijau.

BAHAN

- a) Kultur murni bakteri berumur 24 jam (*Bacillus cereus*, dan *E. coli*)
- b) zat pewarna (malakit hijau, safranin)
- c) penangas air

PROSEDUR KERJA

1. Buat apusan dari tiap bakteri.
2. Tutup apusan bakteri menggunakan kertas saring dan tetesi dengan malakit hijau di atas penangas air selama lima menit. Jaga agar apusan bakteri dan pewarna agar tidak mengering dengan terus menerus meneteskan malakit ke atas apusan selama pemanasan.
3. Cuci kelebihan pewarna menggunakan air mengalir secara hati-hati.
4. Tetesi apusan dengan safranin, biarkan 30 detik.
5. Cuci kelebihan warna dengan air mengalir.
6. Keringkan apusan dengan kertas hisap secara hati-hati.
7. Amati apusan di bawah mikroskop. Perhatikan posisi endospora dalam sel vegetatif.

2.5 PEWARNAAN KAPSULA

PRINSIP DASAR

Kapsula adalah lapisan lendir yang terdapat di sekeliling bakteri jenis tertentu, yang terdiri dari polisakarida, glikoprotein atau polipeptida. Senyawa ini disekresikan oleh sel untuk melindungi sel dari material aktif lingkungannya. Sel-sel bakteri penyebab penyakit biasanya memiliki kapsula yang melindunginya dari serangan komponen-komponen fagositik milik sel-sel tubuh inang. Mewarnai kapsula relatif sulit karena materi penyusun kapsula larut dalam air dan dapat berpindah posisi akibat pencucian yang terlalu deras. Pemanasan apusan berlebihan juga dapat menyebabkan pengerutan sitoplasma sel bakteri, sehingga

menimbulkan ruang kosong antara dinding sel dengan sitoplasma. Ruang kosong ini dapat disalahtafsirkan sebagai kapsula.

Sebagai zat pewarna dasar digunakan kristal violet. Pewarna ini mampu mewarnai material kapsula menjadi biru tua keunguan tanpa memerlukan fiksasi panas. Sebagai pewarna pembanding digunakan larutan 20 % tembaga sulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$).

Kapsula bersifat non-ionik, sehingga walaupun metilen biru mampu menempel pada kapsula sel, namun tidak dapat terserap. Karena kapsula terlarut dalam pencucian dengan air, maka tembaga sulfat yang berwarna biru muda digunakan sebagai pencuci metilen biru dari kapsula sekaligus mewarnai kapsula. Setelah pencucian dengan tembaga sulfat, sel tetap berwarna biru tua keunguan sementara kapsula di sekitarnya akan berwarna biru muda.

BAHAN

- a) Kultur murni bakteri berumur 24 jam *Aerobacter aerogenes* dan *Bacillus cereus* (dalam medium susu).
- b) Zat pewarna [kristal violet 1, tembaga sulfat 20 % ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)]

PROSEDUR KERJA

1. Buat apusan masing-bakteri (Jangan melakukan fiksasi dengan pemanasan)
2. Tetesi apusan dengan kristal violet, biarkan terendam selama 5 – 7 menit.
3. Cuci kelebihan pewarna dengan tembaga sulfat 20 %.
4. Keringkan apusan dengan menyentuhkan kertas hisap secara hati-hati
5. Amati dengan mikroskop, gambar dan beri keterangan.