

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Es Balok dalam Kegiatan Sehari-hari

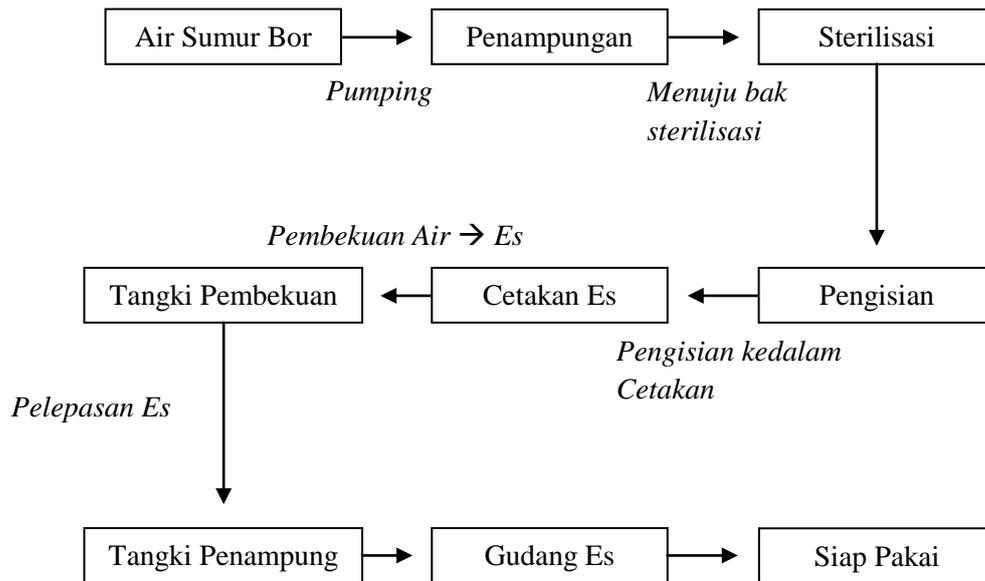
Es digunakan dalam salah satu metode atau cara pengawetan bahan-bahan makanan, daging, ikan, makanan dalam kaleng, serta minuman. Es yang digunakan dalam pengawetan selain es batu adalah es balok. Apabila dari bahan baku es tersebut mengandung bakteri, dikhawatirkan akan mencemari bahan makanan tersebut yang akan berdampak buruk bagi kesehatan, yaitu diare (Saraswati dkk, 2010).

Es merupakan wujud lain dari air dalam bentuk padatan yang terjadi bila air didinginkan pada suhu 0°C (273.15°K atau 32°F) pada tekanan atmosfer standar. Es dapat terbentuk pada suhu yang lebih tinggi dengan tekanan yang lebih tinggi juga, dan air akan tetap sebagai cairan atau gas sampai -30°C pada tekanan yang lebih rendah (Anonim, 2009).

Air akan mulai membeku jika molekulnya tidak memiliki lagi energi yang cukup untuk melepaskan diri dari ikatan atom hidrogen (H). Pada suhu 0°C mulailah terbentuk ikatan-ikatan yang kuat, dimana setiap atom oksigen (O) dikelilingi oleh 4 atom hidrogen, yang pada mulanya ikatan molekul

air tidak erat menjadi struktur kristal yang berlubang (*cluster*) (Anonim, 2009).

Es balok dibuat melalui beberapa tahap, diantaranya :



Gambar 2.1 Proses Pembuatan Es Balok

Berdasarkan Standar World Health Organization (WHO), standar air minum yang digunakan tidak boleh mengandung *Eshcerichia coli* dan sebaiknya air bebas dari bakteri *coliform*. Standar WHO kualitas Standar WHO kualitas air yang baik adalah 0 cfu / 100ml sampel air (WHO, 2004).

2.2 Hubungan Es Balok dengan Bakteri Patogen

Escherichia coli merupakan flora normal usus, biasanya tidak menyebabkan penyakit dan didalam usus memberikan fungsi normal berupa pembusukan feses dan sisa-sisa makanan. Namun jika *Escherichia coli* masuk kedalam saluran pencernaan dalam jumlah banyak, dapat membahayakan kesehatan. Walaupun *Escherichia coli* merupakan bagian mikroba normal saluran pencernaan, tetapi saat ini telah terbukti bahwa galur-galur tertentu mampu menyebabkan gastroenteritis taraf menengah hingga taraf berat pada manusia maupun hewan (Feliatra, 2002).

Menurut hasil penelitian dari pemerintah Hongkong, adanya *E. coli* pada es dapat dikarenakan permukaan pembungkus es telah terkontaminasi saat pengantaran atau pada saat penyimpanan es. Permukaan yang telah terkontaminasi dapat mencemari es tersebut. Selain itu apabila air yang digunakan untuk es bukanlah air bersih, juga dapat memungkinkan terjadinya pencemaran *E. coli*, karena menurut hasil penelitian, *E. coli* yang terkandung dalam air tersebut tidak mati dalam proses pembekuan, sehingga saat es tersebut mencair dapat memungkinkan *E. Coli* hidup kembali (Saraswati. dkk, 2010).

Berdasarkan *case report* di Surabaya, adanya kontaminasi bakteri patogen yang ditemukan pada air sumur di salah satu kecamatan di Surabaya adalah *Escherichia coli*, genus *Salmonella*, dan *Vibrio cholera* dalam air

sebagai bahan baku pembuatan es balok, merupakan penyebab tingginya kejadian diare di Surabaya (Surtiningsih dkk, 2011).

Klebsiella spp. merupakan penghuni alami banyak lingkungan air, dan mereka dapat berkembang biak secara pesat di perairan kaya nutrisi, seperti limbah pabrik pulp, industri tekstil dan pabrik operasi pengolahan tebu. Dalam sistem distribusi air minum, mereka diketahui mengkolonisasi ring pada keran. *Klebsiella spp.* juga diekskresikan dalam kotoran banyak manusia dan hewan, serta mereka mudah dideteksi dalam air limbah yang tercemar (Craun dkk. 2006).

2.3 Bakteri Patogen

2.3.1 Karakteristik *Escherichia coli*

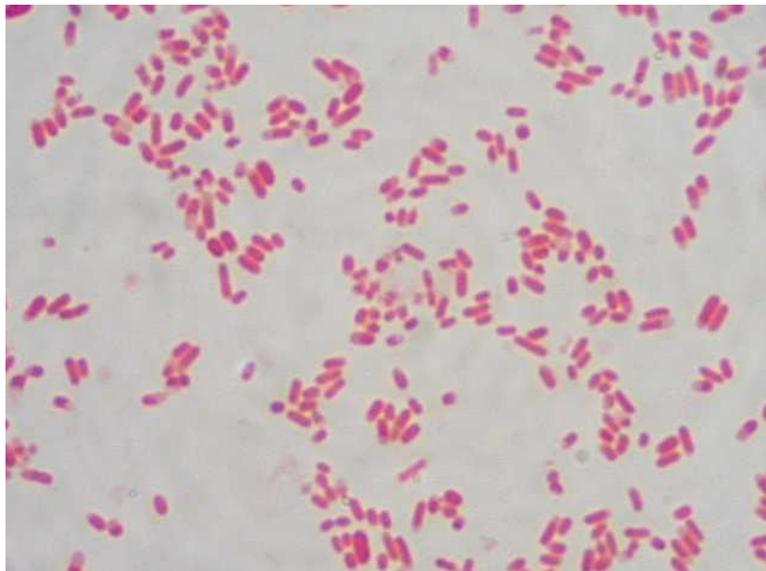
Escherichia coli merupakan bakteri gram negatif yang berbentuk basil, ada yang individu (monobasil), saling berpasangan (diplobasil) atau berkoloni membentuk rantai pendek (streptobasil), tidak membentuk spora maupun kapsula, berdiameter $\pm 1,1 - 1,5 \times 2,0 - 6,0 \mu\text{m}$, dapat bertahan hidup di medium sederhana dan memfermentasi laktosa, menghasilkan asam dan gas, kandungan G+C DNA ialah 50-51 mol % (Jawetz dkk, 2008).

Pergerakan bakteri ini motil, dan peritrikus. Ada yang bersifat aerobik dan fakultatif anaerob. *Escherichia coli* merupakan flora normal usus, dan seringkali menyebabkan infeksi. Kecepatan berkembang biak bakteri ini berada pada interval 20 menit jika faktor media, derajat keasaman, dan

suhu sesuai. Selain tersebar di banyak tempat dan kondisi, bakteri ini tahan terhadap suhu, bahkan pada suhu ekstrim sekalipun. Suhu yang optimalnya adalah 37 °C. Oleh karena itu, bakteri tersebut dapat hidup dalam tubuh manusia dan vertebrata lainnya (Jawetz dkk, 2008).

Taksonomi *Escherichia coli* :

Kingdom / Domain	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gammaproteobacteria
Ordo / Order	: Enterobacteriales
Family	: Enterobacteriaceae
Genus	: Escherichia
Species	: <i>Escherichia coli</i>



Gambar 2.2 *Escherichia coli* setelah pewarnaan Gram

Bakteri hanya menjadi patogen bila bakteri ini berada diluar jaringan usus yang terdapat flora normal. Tempat yang paling sering terkena infeksi yang penting secara klinis adalah saluran kemih, saluran empedu, dan tempat lain dalam rongga abdomen, tetapi setiap tempat anatomi (misal bakteriemia, kelenjar prostat, paru, tulang, meninges) dapat menjadi tempat penyakit. Beberapa bakteri enterik (misalnya *Serratia Sp.*, *Mercescens Sp.*, *Enterobacter aerogenes*) merupakan patogen oportunistik. Bila imunitas pejamu adekuat, terutama pada bayi atau usia tua, stadium akhir penyakit lain, setelah mengalami immunosupresi atau pada orang dengan kateter vena atau urin terpasang lama akan dapat menyebabkan terjadinya infeksi lokal yang bermakna klinis, dan bakteri dapat masuk ke peredaran darah dan menimbulkan sepsis (Anonim, 2012).

Manifestasi klinis infeksi oleh *E. coli* tergantung pada tempat infeksi dan tidak dapat dibedakan dengan gejala atau tanda akibat proses yang disebabkan bakteri lain. *E. coli* yang menyebabkan diare sangat banyak ditemukan di seluruh dunia.

E. coli ini diklasifikasikan berdasarkan karakteristik sifat virulensinya, dan masing masing kelompok menyebabkan penyakit melalui mekanisme yang berbeda. Sifat pelekatan sel epitel usus halus dikodekan oleh gen di plasmid. Dengan cara yang sama, toksin sering diperantarai oleh plasmid atau faga.

EPEC / *Escherichia coli* *Enteropatogenic*, merupakan penyebab diare yang penting pada bayi, terutama di negara berkembang. EPEC sebelumnya dikaitkan dengan wabah diare di ruang perawatan di negara maju. EPEC menempel pada sel mukosa usus halus. Faktor yang diperantarai oleh kromosom meningkatkan perlekatan. Terdapat kehilangan mikrofil (penumpulan), pembentukan tumpuan filament aktin atau struktur mirip mangkuk dan kadang-kadang EPEC masuk ke dalam sel mukosa. Lesi yang khas dapat dilihat pada biopsi lesi usus halus di mikrograf elektron. Akibat infeksi EPEC adalah diare encer, yang biasanya sembuh dengan sendirinya tetapi dapat menjadi kronik. Diare EPEC disebabkan oleh berbagai serotipe spesifik *E. coli*, strain diidentifikasi dengan antigen O dan kadang-kadang dengan penentuan tipe antigen H. Model infeksi dua tahap yang menggunakan sel HPEp-2 juga dapat dilakukan. Pemeriksaan untuk mengidentifikasi EPEC dilakukan di laboratorium rujukan. Lamanya diare EPEC dapat diperpendek dan diare kronik dapat diobati dengan terapi antibiotik.

ETEC / *Escherichia coli* *Enterotoxigenic*, adalah penyebab umum “diare wisatawan” (*Traveller’s diarrhea*) dan penyebab diare yang sangat penting bagi bayi di negara berkembang. Faktor kolonisasi ETEC spesifik untuk mendorong perlekatan ETEC pada sel epitel mukosa usus halus manusia. Beberapa strain ETEC menghasilkan eksotoksin yang tidak tahan panas (LT) (BM 80.000) yang berada dibawah kendali genetik plasmid. Sub-unit B menempel pada gangliosida GM1 di *brush border* sel epitel usus halus

dan memfasilitasi masuknya sub-unit A (BM 26.000) ke dalam sel, yang kemudian mengaktifkan adilat siklase. Hal ini meningkatkan konsentrasi lokal *cyclic adenosine mono phosphate* (cAMP) secara bermakna yang mengakibatkan hipersekresi air (H₂O) dan *chloride* (Cl⁻) yang banyak dan lama serta menghambat reabsorpsi natrium (Na⁺⁺). Lumen usus teregang oleh air, terjadi hepermotilitas dan diare yang berlangsung selama beberapa hari. LT bersifat antigenik dan bereaksi silang dengan enterotoksin *Vibrio cholera*. LT merangsang produksi antibodi penetralisir di dalam serum pada orang yang sebelumnya terinfeksi dengan enterotoksin *E. coli*.

EHEC / *Escherichia coli* *Enterohemorrhagic*, menghasilkan verotoksin, dinamakan berdasarkan efek sitotoksiknya terhadap sel Vero, suatu sel ginjal monyet Afrika. Paling sedikit ada dua bentuk antigenik toksin. EHEC menimbulkan kolitis hemoragik, diare yang berat, dan pada sindroma hemolitik uremik, suatu penyakit yang mengakibatkan gagal ginjal akut, anemia hemolitik mikroangiopati, dan trombositopenia. Verotoksin ini memiliki banyak sifat yang serupa dengan toksin *Shiga* yang dihasilkan oleh *Shigella dysenteriae* tipe 1, namun dua toksin tersebut berbeda secara antigenik dan genetik.

EAEC / *Escherichia coli* *Enteraggregative*, menyebabkan diare akut dan kronik (durasi >14 hari) pada masyarakat di negara berkembang. Organisme ini juga menyebabkan penyakit yang ditularkan melalui

makanan di negara industri. Organisme ini ditandai oleh pola perlekatannya yang khas pada sel manusia. EAEC menghasilkan toksin mirip sitotoksin dan hemolisin.

EIEC / *Escherichia coli Enteroinvasive*, menimbulkan penyakit mirip shigellosis. Penyakit ini terjadi paling sering pada anak-anak di negara berkembang dan pada pengunjung negara-negara tersebut. Seperti shigella, strain EIEC tidak memfermentasikan laktosa atau memfermentasikan laktosa dengan lambat dan non-motil. EIEC menimbulkan penyakit dengan menginvasi sel epitel mukosa usus (Jawetz dkk, 2008).

Struktur antigen *Enterobacteriaceae* mempunyai struktur antigen yang kompleks, diklasifikasikan lebih dari 150 antigen somatic (O) yang berbeda dan tahan panas (*lipopolysaccharide*), lebih dari 100 antigen kapsular (K) yang tidak tahan panas, dan antigen flagellar (H) yang lebih dari 50 (Jawetz dkk, 2008).

2.3.2 Karakteristik *Salmonella sp.*

Salmonella sp. merupakan bakteri batang gram negatif, motil yang secara khas dapat memfermentasi laktosa dan manosa tanpa memproduksi gas tetapi tidak memfermentasikan maltosa dan sukrosa. Sebagian besar *Salmonella* menghasilkan H₂S. *Salmonella sp* dapat tumbuh pada media agar Mc'Conkey dan LAD. Organisme ini umum bersifat patogen untuk manusia dan hewan bila termakan (Jawetz dkk, 2008).

2.3.3 Karakteristik *Shigella sp.*

Habitat asli *Shigella sp.* terbatas pada saluran cerna manusia dan primata. Organisme ini apabila jumlahnya lebih dari normal, dapat berubah menjadi patogen dan menyebabkan penyakit disentri basiler. *Shigella sp.* adalah bakteri gram negatif batang berbentuk cocobasil ditemukan pada biakan. Bakteri ini bersifat fakultatif anaerob tetapi tumbuh paling baik secara aerob. Koloni berbentuk konveks, dan bulat. Semua *Shigella sp.* dapat memfermentasikan glukosa. Kecuali *Shigella sonnei* yang tidak dapat memfermentasikan laktosa. *Shigella* membentuk asam dari karbohidrat tetapi jarang menghasilkan gas. Organisme ini juga dapat dibagi menjadi organisme yang dapat memfermentasikan manitol dan tidak dapat memfermentasikan manitol. (Jawetz dkk, 2008).

2.3.4 Karakteristik *Klebsiella sp.*

Spesies yang paling patogen dari genus *Klebsiella sp.* adalah spesies *Klebsiella pneumoniae*. Spesies ini memproduksi β -laktamase. Morfologi mikroskopik dari *Klebsiella pneumoniae* adalah bakteri batang gram negatif, ukurannya antara 0.6-6 μ m x 0.3-0.5 μ m. memiliki kapsul polisakarida dan non motil.

Pada media agar EMB dan Mc'Conkey koloni *Klebsiella sp* koloni sangat berlendir (mukoid), ukuran koloni sedang-besar. *Klebsiella sp.* dapat menyebabkan penyakit *primary community acquired pneumonia*,

nosokomial pneumonia, abses paru, emfisema, infeksi saluran kemih, enteritis pada anak, bakteriemia, septikemia, rhinoscleroma, ozaena atau chronic atrofi rhinitis, nekrosis dan pembentukan abses, dan meningitis (Simatupang, Maria. 2008).

2.3.5 Karakteristik *Enterobacter sp.*

Enterobacter aerogenes termasuk dalam kelas *enterobacteriaceae* yang merupakan bakteri fakultatif anaerob yang mampu menghasilkan H₂S. Bakteri ini memiliki bentuk batang dengan lebar 0.6 - 1.0 µm dan panjang 1.2 - 3.0 µm, gram negatif, motil, dan optimal tumbuh pada suhu 37°C. Organisme ini mempunyai kapsul yang kecil, dapat ditemukan hidup bebas di air atau berada di saluran cerna dan dapat menyebabkan infeksi saluran kemih dan sepsis (Jawetz dkk, 2008).

2.3.6 Karakteristik *Streptococcus sp.*

Bakteri kokus tunggal bulat telur, tersusun dalam bentuk rantai. Tampak seperti diplokokus, dan bersifat gram positif. Pada umumnya *Streptococcus sp.* tumbuh pada media padat yang diperkaya darah (media LAD). Dalam biakan terbentuk koloni 1-2mm cembung, halus transparan dan membentuk zona lisis darah pada sekitar koloni. *Streptococcus sp.* memiliki klasifikasi ordo *Eubacteriales*, Famili *Lactobacillaceae*, genus *Streptococcus*. dan spesies *S. pyogenes.*, *S. faecalis.*, *S. viridans.*, *S. agalactie.* (Simatupang, Maria. 2008).

2.3.7 Karakteristik *Proteus sp.*

Proteus sp., memiliki morfologi seperti batang (basil) gram negatif pendek, susunan berkelompok sampai satuan. Ukuran 1-3 μ m x 0.4-0.6 μ m. Jenis flagel peritrik, dan tidak memiliki kapsul. Pada media agar pembiakan Mc'Conkey, koloni tidak berwarna. Pada LAD koloni terlihat *swarming* (penuh pada media). *Proteus sp.* dapat menyebabkan penyakit gastroenteritis, pleuritis, peritonitis, pyelonefritis, cystitis, septicemia, abses, serta infeksi mata dan telinga (Simatupang, Maria. 2008).

2.4 Bahaya Bakteri Patogen

Manifestasi klinis infeksi oleh *E. coli* tergantung pada tempat infeksi dan tidak dapat dibedakan dengan gejala atau tanda akibat proses yang disebabkan bakteri lain. *E. coli* yang menyebabkan diare sangat banyak ditemukan di seluruh dunia (Firlieyanti, 2006).

/

2.5 Most Probable Number (MPN)

Metode MPN terdiri dari tiga tahap, yaitu uji pendugaan (*presumptive test*), uji konfirmasi (*confirmed test*), dan uji kelengkapan (*completed test*). Dalam uji tahap pertama, keberadaan *coliform* masih dalam tingkat probabilitas rendah; masih dalam dugaan. Uji ini mendeteksi sifat fermentatif *coliform* dalam sampel. Karena beberapa jenis bakteri selain *coliform* juga memiliki sifat fermentatif, diperlukan uji konfirmasi untuk

mengetes kembali kebenaran adanya *coliform* dengan bantuan media selektif diferensial. Uji kelengkapan kembali meyakinkan hasil tes uji konfirmasi dengan mendeteksi sifat fermentatif dan pengamatan mikroskop terhadap ciri-ciri *coliform*: berbentuk batang, Gram negatif, tidak-berspora.

Output metode MPN adalah nilai MPN. Nilai MPN adalah perkiraan jumlah unit tumbuh (*growth unit*) atau unit pembentuk-koloni (*colony forming unit* ; cfu) dalam sampel. Namun, pada umumnya, nilai MPN juga diartikan sebagai perkiraan jumlah individu bakteri. Satuan yang digunakan, umumnya per 100 mL atau per gram. Jadi misalnya terdapat nilai MPN 10/g dalam sebuah sampel air, artinya dalam sampel air tersebut diperkirakan setidaknya mengandung 10 coliform pada setiap gramnya. Makin kecil nilai MPN, maka air tersebut makin tinggi kualitasnya, dan makin layak minum. Metode MPN memiliki limit kepercayaan 95 persen sehingga pada setiap nilai MPN, terdapat jangkauan nilai MPN terendah dan nilai MPN tertinggi (Cahyo, 2008).

2.6 Media Agar yang Digunakan untuk Mendeteksi Bakteri Patogen

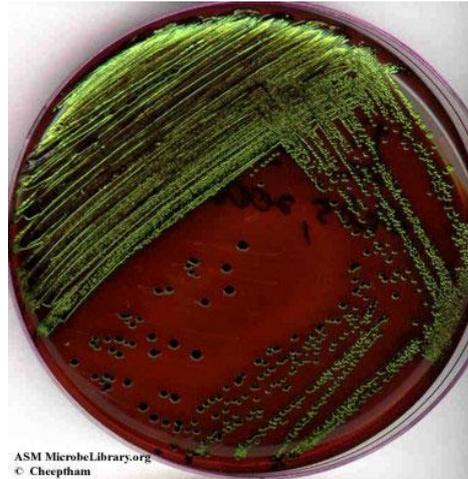
2.6.1 Brilliant Green Lactose Bile (BGLB)

Sebuah media yang sangat selektif, yang mengandung media cair laktosa yang akan mendukung pertumbuhan organisme gram negatif seperti *coliform* dan *Pseudomonas sp.* Laktosa adalah sumber karbon yang digunakan oleh semua *coliform*. Garam empedu yang terkandung dalam media agar menyeleksi terhadap bakteri gram positif. Dengan sedikit

pengecualian, coliform adalah satu-satunya organisme yang akan tumbuh dalam media ini dan juga memproduksi gas dari fermentasi laktosa pada 35-37 °C. Digunakan dalam tes konfirmasi untuk jumlah *coliform* (Anonim. 2012).

2.6.2 Eosin Methylene Blue Agar (EMBA)

Media EMBA adalah medium selektif dan diferensial digunakan untuk mengisolasi *coliform fecal*. Eosin Y dan metilen blue adalah pewarna indikator pH yang bergabung untuk membentuk endapan ungu gelap pada pH rendah (asam), mereka juga berfungsi untuk menghambat pertumbuhan organisme yang paling Gram positif. Sukrosa dan laktosa berfungsi sebagai sumber karbohidrat dapat difermentasi yang mendorong pertumbuhan *coliform*. Fermentor yang kuat dari laktosa atau sukrosa akan menghasilkan jumlah asam yang cukup untuk membentuk kompleks warna ungu tua. Pertumbuhan organisme ini akan muncul berwarna ungu tua sampai hitam. *Escherichia coli*, suatu fermentor yang kuat, sering menghasilkan warna koloni hijau metalik. Fermentor lambat atau lemah akan menghasilkan koloni merah muda mukoid atau berlendir. Biasanya koloni berwarna atau tidak berwarna menunjukkan bahwa organisme fermentor laktosa atau sukrosa tersebut bukan merupakan coliform fecal (Cheeptham,N, 2012).



Gambar 2.3 Media EMBA Positif *Escherichia coli*

2.6.3 Lempeng Agar Darah

Lempeng agar darah digunakan dalam penelitian bertujuan untuk memperkaya medium yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri dan mendiferensiasi bakteri berdasarkan sifat hemolisisnya (Buxton, R. 2013).

Agar darah bukan media didefinisikan secara konsisten. Istilah agar darah umumnya mengacu pada media dasar yang diperkaya darah mamalia defibrinated telah ditambahkan. Di Amerika Serikat agar darah biasanya dibuat dari *Tryptic* Kedelai atau Agar Columbia Basa dengan 5% darah domba. Kelinci atau darah kuda dapat digunakan untuk pertumbuhan spesies *Haemophilus sp.*, tetapi pola hemolitik mungkin tidak konsisten dengan darah domba. (Darah manusia tidak disarankan karena peningkatan kemungkinan paparan patogen melalui darah manusia seperti HIV (Human Immunodeficiency Virus) atau hepatitis tetapi bila dipastikan sehat, dapat digunakan) (Buxton, R. 2013).

Untuk membaca reaksi hemolitik pada plate agar darah, plate harus diangkat ke sumber cahaya dan diamati dengan cahaya yang datang dari belakang (cahaya yang ditransmisikan). Beta hemolitik didefinisikan sebagai lisis lengkap atau lisis sel darah sempurna. Sebuah zona bening, mendekati warna dan transparansi dari media yang mengelilingi koloni. Bakteri memproduksi *β-haemolysin* (Streptolisin O dan S), yang melisiskan sel darah merah di media secara sempurna. Alpha-hemolisis yang membentuk zona kehijauan hingga coklat muda disekitar koloni, bakteri menghemolisa sebagian hemoglobin sehingga meninggalkan pigmen hijau biliverdin. Gamma hemolisis agak saling bertentangan. Jenis ini menunjukkan kurangnya hemolisis. Seharusnya tidak ada reaksi dalam medium sekitarnya (Buxton, R. 2013).

2.6.4 Mc'Conkey Agar

Agar Mc'Conkey digunakan untuk isolasi bakteri enterik gram negatif dan diferensiasi gram negatif yang dapat memfermentasi laktosa dan gram negative yang tidak dapat memfermentasi laktosa. Secara umum media ini digunakan untuk membedakan bakteri dengan kemampuan mereka untuk memfermentasi gula selain laktosa. Dalam kasus ini laktosa diganti dalam medium oleh gula lain. Media ini dimodifikasi digunakan untuk membedakan bakteri gram negatif atau untuk membedakan antara fenotipe dengan mutasi yang memberi berbagai kemampuan untuk memfermentasi gula tertentu (Allen, Mary E. 2010).

McConkey agar merupakan media selektif dan diferensial digunakan untuk isolasi dan diferensiasi bakteri batang gram negatif, terutama famili *Enterobacteriaceae* dan genus *Pseudomonas*. Digunakannya kristal violet dan garam empedu di media mencegah pertumbuhan bakteri gram positif seperti *Neisseria sp.* dan *Pasteurella sp.* Toleransi bakteri enterik gram negatif ke empedu merupakan hasil dari membran luar yang relatif resisten empedu, yang menyembunyikan membran sitoplasma yang sensitif empedu (Allen, Mary E. 2010).

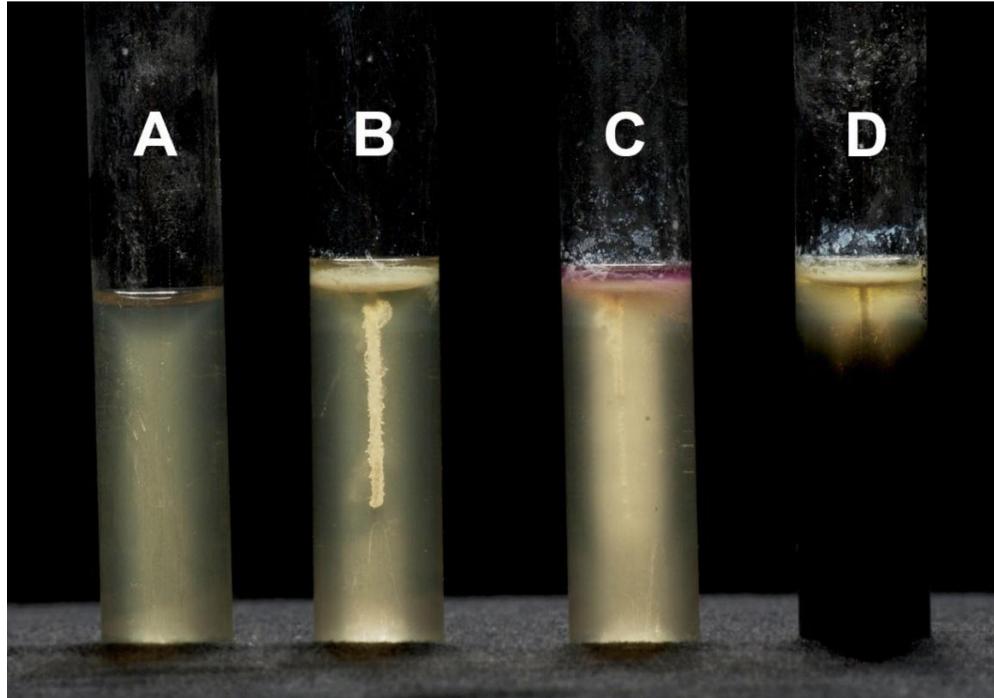
Bakteri gram negatif yang tumbuh pada media dibedakan oleh kemampuan mereka untuk memfermentasi laktosa. Bakteri yang fermentasi laktosa menyebabkan pH dari media turun dan perubahan yang dihasilkan pada pH terdeteksi oleh perubahan menjadi warna merah, yang berwarna merah pada pH di bawah ini 6.8 (Allen, Mary E. 2013).

2.6.5 Sulfur, Indole, Motility (SIM) Agar

Interpretasi media SIM Agar antara lain, bakteri *Escherichia coli* menunjukkan adanya reaksi indole, terlihat adanya motilitas serta tidak memproduksi H₂S. Bakteri *Klebsiella sp.* menunjukkan adanya kekeruhan ditempat tusukan ose (koloni non motil), uji indol negatif dan tidak memproduksi gas H₂S. Bakteri *Proteus sp.* menunjukkan adanya motilitas, uji indol negatif serta positif terdeteksi H₂S. Untuk bakteri *Salmonella sp.* menunjukkan adanya produksi H₂S, motilitas positif serta uji indole

negatif. Bakteri *Shigella sp.*, *Enterobacter sp.*, dan *Streptococcus sp.* menunjukkan uji H₂S, indol serta motilitas negatif (Sturm, Tasha L. 2013).

Media agar semisolid yang digunakan untuk mendeteksi produksi hidrogen sulfida (H₂S), pembentukan reaksi indol, dan adanya motilitas bakteri. Media SIM digunakan untuk membedakan anggota famili *Enterobacteriaceae*. Batas tidak tegas yang menyebar (bergerak) kearah lateral dari garis tusukan ose menunjukkan tes positif adanya motilitas. Tabung harus dibandingkan dengan tabung tanpa inokulasi untuk membedakan antara kekaburan samar dan motilitas. Sebuah perubahan warna merah setelah penambahan reagen Kovács menunjukkan produksi indole, yang menandakan uji indole positif. Sebuah endapan hitam menunjukkan produksi H₂S. Tabung reaksi: (A) tanpa inokulasi tabung, (B) berisi nonmotile dan indole-negatif bakteri *Klebsiella pneumoniae*, (C) mengandung motil dan indole-positif bakteri *Escherichia coli*, dan (D) berisi motil, indole-negatif, dan memproduksi H₂S interpretasi bakteri *Proteus mirabilis* (Wilkins, R. 2011).



Gambar 2.4 Media SIM (Sulfur Indole Motility) Test

2.6.6 Triple Sugar Iron (TSI) Agar

TSI terdiri dari tiga karbohidrat: glukosa (0,1%), sukrosa (1%), dan laktosa (1%). TSI mirip dengan Iron agar Kligler, kecuali Iron agar Kligler hanya berisi dua karbohidrat: glukosa (0,1%) dan laktosa (1%). Selain karbohidrat yang disebutkan, media juga mengandung ekstrak daging sapi, ekstrak ragi, dan peptones yang merupakan sumber nitrogen, vitamin dan mineral. Phenol Red merupakan indikator pH, dan agar-agar digunakan untuk memperkuat media. Selama persiapan, tabung yang berisi agar-agar cair yang miring. Kemiringan media membentuk suasana aerobik, sedangkan media datar cenderung membentuk suasana anaerobik, karena sedikitnya area yg terpapar udara.

Ketika salah satu karbohidrat difermentasi, penurunan pH akan menyebabkan media untuk berubah dari oranye kemerahan (warna asli) menjadi kuning. Sebuah warna merah tua menunjukkan alkalisasi dari peptone. Sodium tiosulfat dalam medium berkurang oleh beberapa bakteri untuk memproduksi gas hidrogen sulfida (H₂S), yaitu gas tidak berwarna. Hidrogen sulfida akan bereaksi dengan ion besi (Fe⁺) dalam medium untuk menghasilkan reaksi besi sulfida, yang merupakan endapan larut berwarna hitam (Lehman, Donald. 2013).

2.7 Uji Biokimia

Uji biokimia meliputi uji gula-gula seperti glukosa, laktosa, maltosa, sukrosa, manitol, kemudian uji agar SIM (Sulfur, Indol, Motility), dan SC (Simone Citrat) agar. Interpretasi positif *Escherichia coli* pada uji Glukosa (+), uji Sukrosa (+), Maltosa (+), Manitol (+), Laktosa (+/-). Pada Uji agar SIM, interpretasi Sulfur (-), Indol (+), Motility (+/-) serta pada uji SC (-) (Meutia, 2012).