

Perbedaan Cara Penyebaran Suspensi terhadap Jumlah Bakteri pada Media Eosin Methylene Blue Agar

(DIFFERENCE METHOD TO TOTAL BACTERIA SPREADING IN SUSPENSION EMBA MEDIA)

Ahmad Nuzuludin Kadri¹, Ketut Tono Pasek Gelgel², I Gusti Ketut Suarjana²

¹Mahasiswa Program Pendidikan Dokter Hewan,

²Laboratorium Mikrobiologi,

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana

Jl.P.B. Sudirman Denpasar Bali tlp. 0361-223791

Email : ahmadnk1985@gmail.com

ABSTRAK

Dalam rangka pengawasan mutu secara biologis dilakukan pengujian laboratorium untuk mengisolasi dan melakukan jumlah penghitungan jumlah bakteri patogen (*enumerasi*). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan cara penyebaran suspensi dengan menggunakan batang gelas bengkok, mikropipet dan ose terhadap jumlah bakteri yang terhitung pada media Eosin Methylene Blue Agar. Sampel diambil dari air susu kambing yang kemudian dihitung jumlahnya dengan tiga kelompok perlakuan yaitu menggunakan batang gelas bengkok, mikropipet dan ose. Data hasil penelitian dianalisis menggunakan sidik ragam, bila hasilnya berbeda nyata maka dilanjutkan dengan uji Duncan. Jumlah bakteri yang terhitung dengan menggunakan batang gelas bengkok, mikropipet dan ose per ml berturut-turut mengandung 9.722.222 cfu, 68.944.444 cfu dan 116.444.444 cfu. Dengan sidik ragam, perlakuan cara penyebaran dengan menggunakan mikropipet dan ose berbeda sangat nyata ($P<0,01$) terhadap jumlah bakteri yang terhitung dengan menggunakan batang gelas bengkok. Setelah di uji dengan uji Duncan, rata-rata jumlah bakteri yang terhitung dengan menggunakan mikropipet dan ose lebih tinggi sangat nyata ($P<0,01$) dibandingkan dengan menggunakan batang gelas bengkok, sedangkan rata-rata jumlah bakteri yang terhitung menggunakan ose lebih tinggi sangat nyata ($P<0,01$) dibandingkan dengan menggunakan mikropipet. Kesimpulan dari penelitian ini adalah terdapat perbedaan cara penyebaran suspensi dengan menggunakan batang gelas bengkok, mikropipet dan ose terhadap jumlah bakteri pada media EMBA. Penyebaran bakteri menggunakan ose lebih banyak ($P<0,01$) dibandingkan mikropipet dan batang gelas bengkok. Sedangkan penyebaran bakteri menggunakan mikropipet lebih banyak ($P<0,01$) dibandingkan dengan gelas bengkok.

Kata-kata kunci: penyebaran, suspensi, bakteri, media EMBA.

ABSTRACT

In order to control the quality of the biological testing laboratory to isolate and perform number of counting the number of pathogenic bacteria (*enumeration*). The purpose of this study was to determine differences in the way the spread of the suspension by using a bent glass rod, micropipette and the ose counted against the number of bacteria on the media Eosin Methylene Blue Agar. Samples were taken from goat's milk, and then computed the number of bacteria in the three treatment groups, namely using a bent glass rod, micropipette and ose. The data were analyzed using analysis of variance, the results are significantly different when it is followed by Duncan's test. The number of bacteria counted by using a glass rod bent, and ose per ml micropipette row contains 9,722,222 cfu, 68,944,444 and 116 444 444 cfu. With the variance, treatment means using a micropipette and spread of different ose highly significant ($P<0.01$) to the number of bacteria counted

by using a bent glass rod. Having tested by Duncan's test, the average number of bacteria counted by using a micropipette and higher ose highly significant ($P < 0.01$) as compared to using a bent glass rod, while the average number of bacteria were counted using higher loop is highly significant ($P < 0.01$) compared with using a micropipette. The conclusion of this study is that there is significant different of the suspension by using a bent glass rod, and the micropipette ose to the number of bacteria on the media EMBA. The spread of bacteria using more ose ($P < 0.01$) compared micropipette and bent glass rod. While the spread of bacteria using a micropipette more ($P < 0.01$) as compared with the curved glass.

Keywords : spreading, suspension, bacteria, EMBA media.

PENDAHULUAN

Analisis pangan terhadap kemungkinan adanya bakteri patogen merupakan standar yang diharuskan untuk mengetahui kualitas pangan dan menjamin keamanan pangan (De Boer dan Beumer, 1999). Peredaran makanan dan minuman harus mendapatkan pengawasan yang ketat agar makanan yang dikonsumsi tidak mengandung mikroorganisme yang berbahaya bagi manusia. Berdasarkan hal tersebut maka dalam rangka pengawasan mutu secara mikrobiologis dilakukan pengujian laboratorium untuk mengisolasi dan melakukan penghitungan jumlah bakteri patogen yang disebut juga dengan *enumerasi*.

Isolasi dan identifikasi merupakan metode konvensional dalam pemeriksaan bakteri yang didasarkan pada reaksi biokimia. Oleh karena itu, dalam isolasi dan identifikasi bakteri diperlukan media yang selektif. Banyak metode yang digunakan dalam menghitung jumlah bakteri dari suatu populasi bakteri dalam sampel. Proses penghitungan bakteri dapat dilakukan dengan beberapa metode baik secara langsung maupun tidak langsung. Metode cawan yang diperkenalkan oleh Fardiaz (1992) mengungkapkan bahwa:

1. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan kumpulan koloni yang besar, dimana jumlah koloni diragukan dapat dihitung sebagai satu koloni.
2. Satu deretan rantai koloni yang terlihat sebagai satu garis tebal dihitung satu koloni.

Dari uraian di atas tampaknya tidak sesuai dengan metode penghitungan kuantitatif bakteri. Dalam satu, dua koloni atau lebih di hitung satu. Penghitungan kuantitatif tersebut sangat berbeda dengan penghitungan lainnya, seperti : menghitung telur, menghitung itik, menghitung uang dan lain lain. Penghitungan kumpulan koloni yang besar dan satu deretan rantai koloni yang terlihat sebagai satu garis tebal tidak bisa dihitung satu. Apalagi hal tersebut dikalikan dengan faktor pengencer. Sebagai ilustrasi : lima puluh butir telur yang ditempatkan di dalam sebuah *egg tray* dan beberapa lembar uang rupiah yang diikat menjadi satu tidak bisa dihitung satu.

Pengukuran kuantitatif bakteri dengan metode cawan Fardiaz (1992) mengungkapkan bahwa koloni yang bergabung menjadi kumpulan besar koloni dapat dihitung satu. Namun disisi lain, koloni mikroba yang tumbuh tidak selalu berasal dari satu sel mikroorganisme, karena beberapa mikroorganisme tertentu cenderung untuk berkelompok atau berantai (Muhammad., *et al.* 2005). Ini bisa diartikan bahwa di dalam koloni mikroba/bakteri yang berkelompok atau berantai panjang dapat terbentuk dari satu atau beberapa sel bakteri. Hubungannya dengan penghitungan jumlah bakteri, koloni bakteri yang terlihat berkelompok atau berantai tidak bisa dihitung satu.

Pada dasarnya sel tersebar homogen pada sampel setelah dilakukan pengenceran berseri. Pengenceran digunakan karena untuk menumbuhkan koloni bakteri pada media yang terbatas tidak mungkin dilakukan penghitungan bakteri yang berjumlah puluhan ribu. Pengenceran ini dimaksudkan untuk mengurangi kepadatan bakteri pada sampel (Puspitasari., *et al.* 2012). Di sisi lain ada jenis bakteri yang memang pembelahan selnya dapat terpisah baik sehingga tersebar merata dan ada pula bakteri yang setelah membelah sel anakan masih menempel pada induknya, seperti halnya yang terjadi pada *Streptococcus*, *Diplococcus*, *Sarcina* dan lain lain. Sehingga penyebarannya berkelompok-kelompok. Pada jenis yang seperti ini jika tersebar merata dalam kelompok-kelompok sel maka pertumbuhan menjadi koloni tunggal bukan berasal dari satu sel saja melainkan dari beberapa sel. Oleh sebab itu pada kondisi seperti ini peran alat perata/*spreader* sangat dibutuhkan.

Sulitnya mendapatkan koloni yang benar-benar merata dan terpisah ini mengilhami penulis untuk memodifikasi alat metode cawan sebar ke dalam 3 teknik, yaitu teknik sebar menggunakan batang gelas bengkok, teknik sebar menggunakan mikropipet dan teknik sebar menggunakan ose.

METODE PENELITIAN

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah susu kambing segar. Sebanyak 250 ml susu kambing segar diambil pada saat pemerahan pagi hari, lalu dimasukkan dalam tabung reaksi steril dan dibawa menggunakan termos es, kemudian dilakukan penghitungan di Laboratorium Mikrobiologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana.

Alat yang di gunakan adalah mikropipet steril volume 20 μ l, ose steril dan batang gelas bengkok steril 1 buah, empat tabung reaksi berisi 9 ml larutan aquades, dua puluh tujuh cawan petri steril, korek api, api bunsen, autoklaf, pipet ukur volume 5 ml, erlenmeyer, *hot plate* dan *magnetic stirrer*, inkubator, *tissue*/kapas, kertas label, *quebec colony counter* dan

timbangan analitik. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquades, alkohol 70% dan media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) steril.

Gambar 1. Alat-Alat Penyebar Suspensi



Batang gelas bengkok



Ose



Mikro pipet

Penelitian ini menggunakan 3 perlakuan yang terdiri dari alat perata/*spreader* batang gelas bengkok, mikropipet dan ose. Masing-masing perlakuan diberikan 9 kali ulangan, sehingga total yang digunakan 27 media EMBA. Setiap sampel sebanyak 0,02 ml pada pengenceran 10^{-4} ditanam pada 3 buah media EMBA steril. Media pertama (perlakuan 1) disebar dengan batang gelas bengkok, media kedua (perlakuan 2) disebar dengan mikropipet dan media ketiga (perlakuan 3) disebar dengan ose. Selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C pada inkubator dengan posisi terbalik. Koloni dari masing-masing media yang tumbuh setelah 24 jam dihitung di atas *quebec colony counter*. Menurut Sukandar., *et al* (2010) bahwa sebaiknya jumlah koloni mikroba yang tumbuh dan dapat dihitung berkisar antara 30-300 koloni. Metode cawan dengan jumlah koloni yang tinggi (>300) sulit untuk

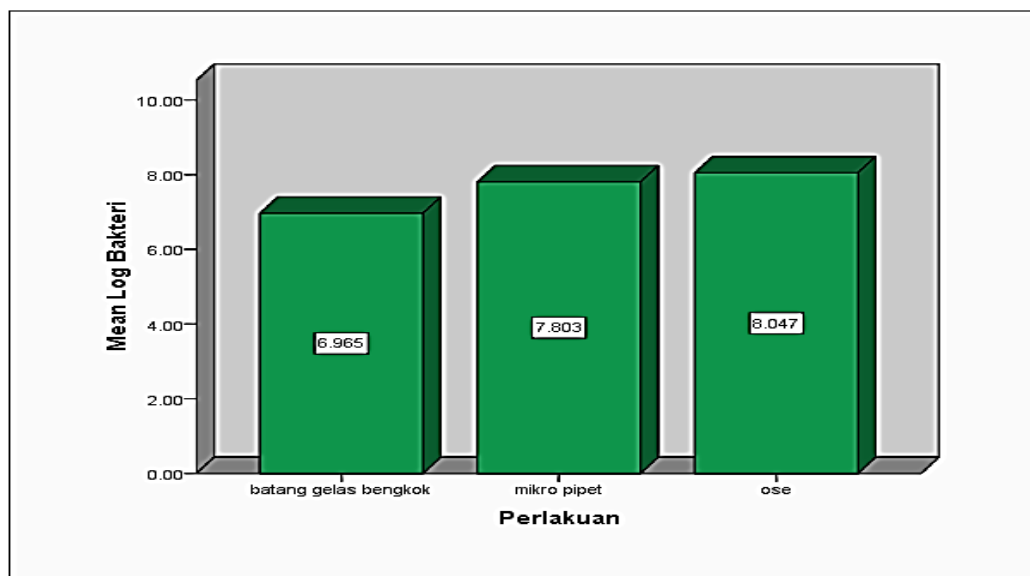
dihitung sehingga kemungkinan kesalahan perhitungan sangat besar. Satuan yang digunakan untuk menyatakan jumlah koloni atau bakteri adalah cfu/mL (cfu = *colony forming units*).

Data jumlah bakteri dianalisis secara kuantitatif dengan menggunakan sidik ragam dan bila hasilnya berbeda nyata dilanjutkan dengan uji Duncan. Pengolahan data hasil penelitian dilakukan dengan menggunakan program komputer *SPSS 16.0 for windows*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Jumlah rata-rata bakteri yang berasal dari air susu kambing yang ditanam pada media *Eosin Methylene Blue Agar* dengan pengenceran 10^{-4} didapat pada masing-masing perlakuan yang disebarkan batang gelas bengkok, mikropipet dan ose masing-masing diperoleh seperti yang dicantumkan dalam Gambar 2 berikut ini:

Gambar 2. Jumlah Rata-Rata Bakteri yang Tumbuh pada Media EMBA yang Disebarkan dengan Batang Gelas Bengkok, Mikropipet dan Ose (Log Y)



Pada Gambar 2 di atas menunjukkan bahwa jumlah rata-rata bakteri yang tumbuh pada media EMBA yang disebarkan dengan batang gelas bengkok, mikropipet dan ose setelah dimasukkan ke Log Y berturut-turut adalah 6.965, 7.803 dan 8.047.

Selanjutnya dihitung jumlah bakteri pada setiap ml susu kambing yang ditanam pada media EMBA dengan menggunakan rumus :

Koloni/ml = Jumlah koloni per cawan x 1/faktor pengenceran x volume inokulum

seperti yang diuraikan oleh Fardiaz (1992) maka diperoleh hasil seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Jumlah Bakteri pada Setiap ml Susu Kambing yang Ditanam pada Media EMBA

Ulangan	Batang Gelas Bengkok	Mikropipet	Ose
1	5.500.000	27.000.000	69.000.000
2	12.000.000	95.000.000	149.000.000
3	10.000.000	75.000.000	125.000.000
4	13.000.000	100.500.000	140.000.000
5	4.500.000	32.500.000	56.500.000
6	12.500.000	83.500.000	135.000.000
7	9.500.000	61.500.000	114.000.000
8	10.500.000	67.000.000	125.000.000
9	10.000.000	78.500.000	134.500.000
Jumlah	87.500.000	620.500.000	1.048.000.000
Rata-rata	9.722.222	68.944.444	116.444.444

Pada Tabel 1 di atas diperoleh rata-rata jumlah bakteri pada setiap ml susu kambing yang ditanam pada media EMBA yang disebar dengan batang gelas bengkok, mikropipet dan ose per ml berturut-turut mengandung 9.722.222 cfu, 68.944.444 cfu dan 116.444.444 cfu. Hasil penghitungan di atas terlihat jelas adanya perbedaan jumlah bakteri yang didapatkan dari masing-masing alat penyebar. Jumlah bakteri per ml yang didapatkan dari 9 kali pengulangan dengan penyebaran menggunakan batang gelas bengkok, mikropipet dan ose secara berturut turut adalah 87.500.000 cfu, 620.500.000 cfu dan 1.048.000.000 cfu. Halini menunjukkan bahwa metode penyebaran dengan alat yang berbeda mengindikasikan perbedaan jumlah bakteri yang berbeda.

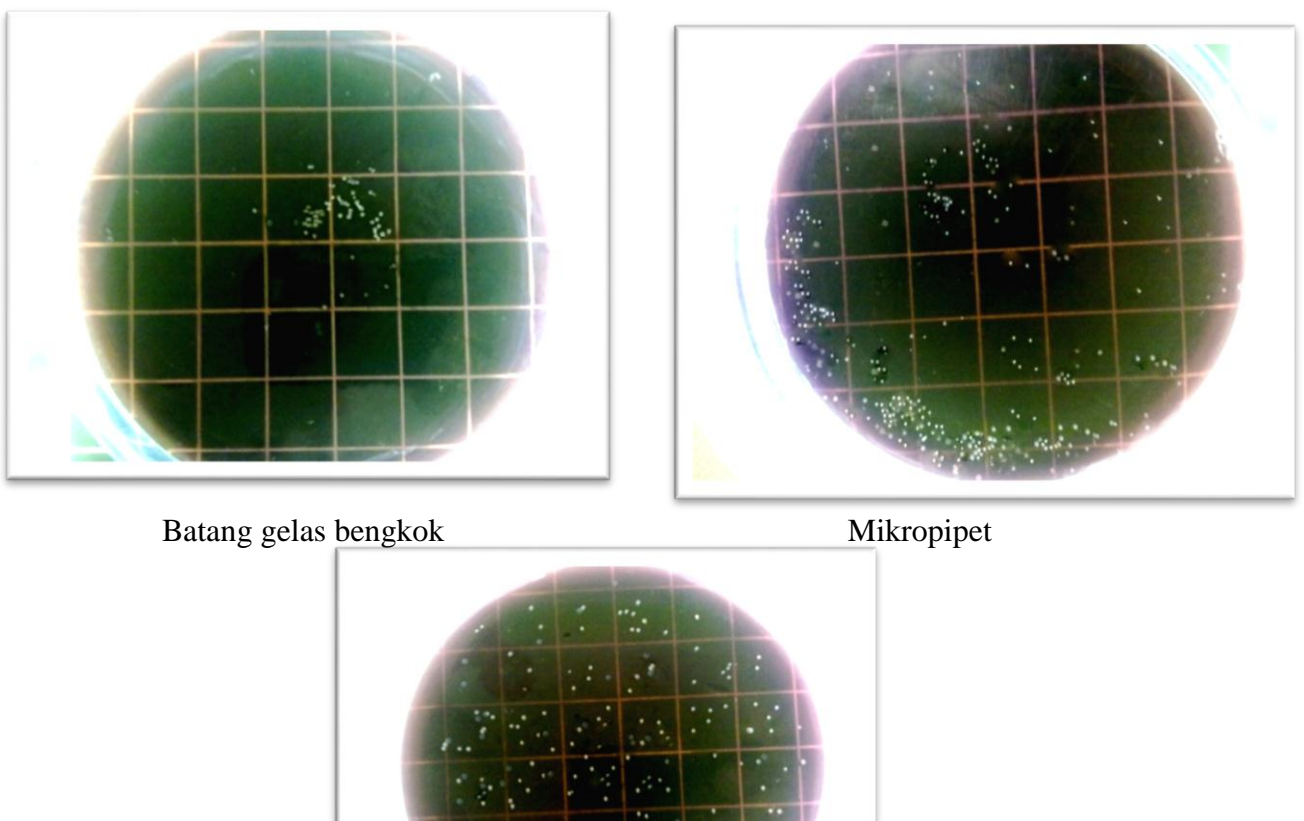
Hasilsidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan cara penyebaran dengan menggunakan mikropipet dan ose berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap jumlah bakteri yang terhitung dengan menggunakan batang gelas bengkok. Jumlah bakteri setelah perlakuan

dengan menggunakan mikropipet dan ose mengalami kenaikan yang sangat jauh dari jumlah bakteri dengan perlakuan batang gelas bengkok.

Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa rata-rata jumlah bakteri yang terhitung dengan menggunakan mikropipet dan ose lebih tinggi sangat nyata ($P < 0,01$) dibandingkan dengan menggunakan batang gelas bengkok, sedangkan rata-rata jumlah bakteri yang terhitung menggunakan ose lebih tinggi sangat nyata ($P < 0,01$) dibandingkan dengan menggunakan mikropipet. Ini membuktikan bahwa mikropipet dan ose dapat digunakan sebagai alat penyebar suspensi pada media EMBA, dimana dengan menggunakan ose koloni bakteri yang terhitung tampak lebih banyak.

Bakteri yang berasal dari air susu kambing yang disebar dengan batang gelas bengkok koloninya besar-besar, sedangkan dengan mikropipet dan penyebaran bakteri dengan ose koloninya kecil-kecil. Jumlah bakteri yang disebar dengan batang gelas bengkok lebih banyak bakterinya menggumpal/bergerombol. Hal tersebut dapat dilihat pada Gambar 3. Koloni yang bergerombol dan membuat rantai tebal dihitungkan satu kesatuan koloni. Dengan ditemukannya koloni bergerombol dan berantai tebal, hitungan koloni lebih sedikit jika dibandingkan dengan mikropipet dan ose. Sedangkan bakteri yang disebar dengan mikropipet jauh lebih banyak dibandingkan dengan batang gelas bengkok. Koloni bakteri yang tumbuh lebih merata walaupun masih ada koloni yang bergerombol. Hal sebaliknya terjadi pada penyebaran dengan ose dimana koloni bakteri yang tumbuh hampir menyebar dengan merata. Ini dapat dilihat dari besarnya koloni bakteri yang tampak kecil-kecil seperti yang terlihat pada Gambar 3.

Gambar 3. Koloni Bakteri pada Media EMBA Setelah Perlakuan



Batang gelas bengkok

Mikropipet

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan cara penyebaran suspensi dengan menggunakan batang gelas bengkok, mikropipet dan ose terhadap jumlah bakteri pada media EMBA. Dimana penyebaran bakteri menggunakan ose lebih banyak ($P < 0,01$) dibandingkan mikropipet dan batang gelas bengkok. Sedangkan penyebaran bakteri menggunakan mikropipet lebih banyak ($P < 0,01$) dibandingkan dengan gelas bengkok.

SARAN

Penggunaan ose dengan metode cawan sebar dalam penghitungan jumlah bakteri perlu dibandingkan dengan metode yang lain seperti : Hitungan mikroskopis dengan metode Breed, MPN (Most Probable Number), Metode Membran Filter dan Kekeruhan (Turbidimetri).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada dosen Laboratorium Mikrobiologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana dan Bapak Encen di Kampung Jawa yang telah membantu dalam pengambilan sampel demi kelancaran semua proses penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Boer DE, Beumer RR. 1999. Methodology for Detection and Typing of Foodborne Microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 50 (1999) 119–130.

Fardiaz. 1992. *Mikrobiologi Pangan 1*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

Muhammad N, Isworo MG, Komariyah R. 2005. *Metoda Baru Untuk Dekontaminasi Bakteri dengan Plasma Non Termik pada Tekanan Atmosfer*. Laboratorium Mikrobiogenetika Jurusan Biologi FMIPA UNDIP. ISSN: 1410-9662 Vol.8, No.3, Juli 2005, Hal 98

Puspitasari FD, Shovitri M, Kuswytasari ND. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Aerob Proteolitik dari Tangki Septik. *Jurnal Sains dan Seni ITS*. 1(1)

Sukandar D, Radiastuti N, Jayanegara I, Hudaya A. Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi. BPPT Jakarta. Valensi Vol. 2 No. 1, Nop 2010 (333-339) ISSN : 1978 - 8193