
Precision of enumeration technique for count of the number of bacterial cells with the spread plate method

Elsa Alfiyanti*, Dwi Hilda Putri

Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Padang, West Sumatera, Indonesia

*Correspondence author: elsaalfiyanti2608@gmail.com

Abstrak

Tujuan Bakteri endofit isolat B.J.T.A.2.1 merupakan isolat yang menghasilkan senyawa antimikroba yang baik. Tetapi, saat ini belum diketahui persisi jumlah sel bakteri tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan mendapatkan persisi jumlah sel bakteri.

Metode Penelitian ini dilakukan dengan cara enumerasi melalui perhitungan menggunakan pengenceran. Metode penanaman yang digunakan adalah metode sebar (spread plate). Metode penelitian yang digunakan adalah deskriptif yaitu melakukan analisis data dan disajikan dalam bentuk grafik dari jumlah sel bakteri. Parameter analisis adalah jumlah sel bakteri.

Hasil Hasil penelitian menunjukkan bahwa persisi jumlah sel bakteri adalah -0,8 hingga +1,2. Zona biru pada grafik adalah persisi (ketepatan) jumlah sel bakteri.

Kesimpulan utama Presisi jumlah sel bakteri endofit isolat B.J.T.A.2.1 adalah -0.8 sampai dengan +1.2. Zona biru pada grafik merupakan range pemeriksaan dari persisi jumlah sel bakteri.

Kata kunci *Persisi, jumlah sel bakteri*

Pendahuluan

Penyakit infeksi adalah penyakit yang disebabkan oleh mikroba patogen. Angka kematian manusia akibat infeksi di dunia semakin meningkat. Salah satu faktor yang mempengaruhi peningkatan infeksi adalah karena meningkatnya jumlah mikroba yang resisten terhadap pengobatan. Meningkatnya kasus resistensi mikroba ini, menyebabkan infeksi menjadi salah satu dari 10 penyebab kematian terbesar di dunia. Untuk mengatasi masalah infeksi dan resistensi kuman ini, maka diperlukan sumber zat antimikroba baru (Gurib-Fakim, 2006). Salah satunya dari bakteri endofit Andalas (*Morus macroura* Miq).

Penelitian Afifah, Irdawati, & Putri, (2018); Putri, Fifendy, & Putri, (2018); dan Yandila, Putri, & Fifendy, (2018) berhasil mengisolasi bakteri endofit yang berasal dari tumbuhan Andalas (*Morus macroura* Miq.) yang berpotensi sebagai antimikroba. Isolat B.J.T.A.2.1 merupakan salah satu isolat yang menghasilkan senyawa aktif antimikroba yang baik.

Analisis jumlah sel bakteri merupakan salah satu teknik yang penting dilakukan untuk pengembangan bakteri endofit sebagai penghasil senyawa antimikroba. Teknik menghitung jumlah sel bakteri adalah dikenal juga dengan nama Enumerasi. Menurut (Brooks, Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2013) teknik enumerasi digunakan untuk menghitung jumlah mikroba dalam suatu media tanpa mengidentifikasi jenis mikroba (bakteri, jamur, yeast). Teknik ini bertujuan untuk menentukan jumlah sel dari suatu kultur bakteri secara kuantitatif.

Enumerasi secara kuantitatif bakteri dapat dilakukan dengan perhitungan jumlah bakteri secara langsung atau tidak langsung dari suatu sampel. Analisis langsung dapat dilakukan dengan kamar hitung (*Counting chamber*). Kelemahan teknik ini adalah tidak dapat membedakan sel bakteri yang hidup dan mati (Lily et al., 2010). Menurut (Madigan, Martinko, Stahl, & Clark, 2009), perhitungan jumlah bakteri dengan cara tidak langsung dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu perhitungan pada cawan petri (*Total Plate Count*), perhitungan melalui pengenceran, perhitungan jumlah terkecil atau terdekat (metode MPN), dan kalorimeter (turbidimetri).

Keuntungan menggunakan metode enumerasi mikroorganisme secara tidak langsung adalah perhitungan hanya dilakukan pada mikroba yang masih hidup sehingga hasilnya lebih akurat. Kekurangan dalam metode perhitungan tidak langsung adalah membutuhkan waktu inkubasi yang lama sehingga hasilnya tidak didapat dengan waktu yang cepat. Perhitungan mikroba secara tidak langsung memiliki sensitifitas yang tinggi sehingga metode tersebut cocok digunakan untuk deteksi sensitif dari kontaminasi mikroba pada makanan dan materi yang lain (Madigan et al., 2009). Setiap bakteri memiliki jumlah sel yang berbeda pada masing-masing pengenceran. Oleh karena itu, dilakukan penelitian terhadap bakteri endofit Andalas Isolat B.J.T.A.2.1 untuk mengetahui dan mendapatkan persisi jumlah sel bakteri dengan metode spread plate menggunakan pengenceran.

Bahan dan Metode

Bahan yang digunakan adalah bakteri endofit Andalas yang berasal dari hasil isolasi (Afifah et al., 2018) yaitu isolat B.J.T.A.2.1. Medium yang digunakan pada penelitian ini adalah Nutrient Agar (NA), Nutrient Broth (NB), aquades steril, gliserol, NaCl 0,9%.

Stok kultur bakteri dalam agar miring NA.

Stok kultur isolat bakteri B.J.T.A.2.1 pada penyimpanan minggu ke-2 sebelum dilakukan pengenceran diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam.

Pembuatan Larutan NaCl 0,9%

Larutan NaCl dibuat dengan cara melarutkan kristal NaCl sebanyak 0,9 dalam 100 mL aquades. Larutan selanjutnya disterilisasi dalam autoclave pada suhu 121°C dan tekanan 15 PSI selama 15 menit.

Enumerasi bakteri endofit isolat B.J.T.A.2.1

Perhitungan jumlah sel bakteri dilakukan dengan enumerasi melalui perhitungan menggunakan metode pengenceran. Pengujian dilakukan dengan cara mengambil 1-4 ose stok kultur bakteri dalam agar miring NA kemudian dimasukkan kedalam NaCl 0,9% dan dihomogenkan dengan vortex. Selanjutnya, suspensi bakteri disetarakan kekeruhannya dengan skala McFarland's 0,5.

Pengujian dilakukan dengan mengambil 10 µL suspensi bakteri dimasukkan ke dalam 990 µL aquades steril lalu di vortex (nilai pengenceran 10^{-2}). Dengan menggunakan mikropipet, dilakukan pengenceran berseri dengan cara memindahkan sebanyak 10 µL suspensi dari tabung eppendorf 1 ke tabung eppendorf 2 yang berisi 990 µL aquades

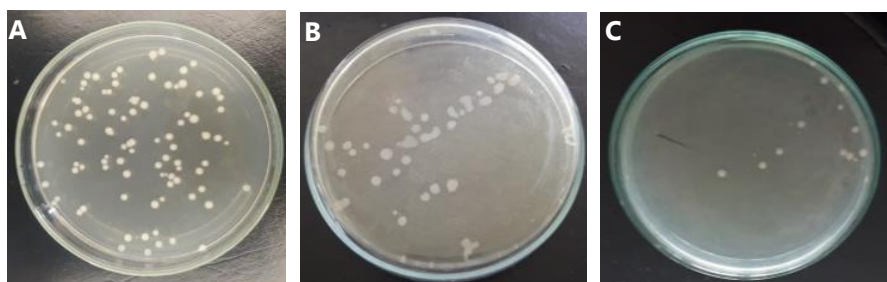
steril dan dihomogenkan dengan vortex (nilai pengenceran 10^{-4}). Suspensi dari tabung eppendorf 2 diambil sebanyak 100 μL dan dimasukkan ke tabung eppendorf 3 yang berisi 900 μL aquades steril dan dihomogenkan dengan vortex (nilai pengenceran 10^{-5}). Proses ini dilanjutkan sampai diperoleh nilai pengenceran 10^{-6} .

Dari pengenceran 10^{-6} masing-masing di ambil 100 μL dan diinokulasikan pada media NA melalui metode pour plate. Plate kemudian diinkubasikan dalam posisi terbalik selama 24 jam pada suhu ruang. Jumlah sel bakteri dinyatakan dengan satuan Colony Forming Units per mL (CFU/mL), yang dihitung menggunakan rumus:

CFU/mL = jumlah koloni x faktor pengenceran x 10

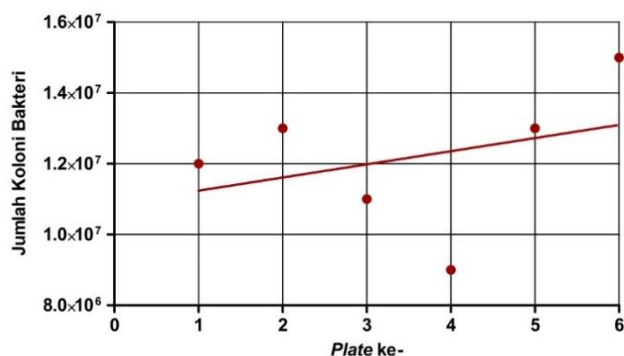
Hasil dan Pembahasan

Persisi jumlah sel bakteri isolat B.J.T.A.2.1 diperoleh dengan enumerasi melalui perhitungan menggunakan metode seri pengenceran. Sebelum menentukan persisi jumlah sel bakteri, hasil dari semua jumlah koloni pada pengenceran 10^6 dirata-ratakan terlebih dahulu. Gambar 1 dapat dilihat koloni bakteri yang tumbuh pada palte NA dari beberapa pengenceran.



Gambar 1. Kolono bakteri yang tumbuh pada plate NA dari beberapa pengenceran. A) 10^4 B) 10^6 dan C) 10^8 .

Hasil dari rata-rata jumlah sel bakteri adalah $12,2 \times 10^6$. Hasil uji persisi jumlah sel bakteri isolat B.J.T.A.2.1 dapat dilihat pada Gambar 2. Untuk menentukan ketelitian pengujian jumlah sel bakteri, dilakukan uji persisi sebanyak enam kali. Berdasarkan hasil uji persisi Gambar 1 diketahui bahwa rentangan jumlah sel bakteri yang dihasilkan berkisaran antara 9×10^6 CFU/mL - 15×10^6 CFU/mL. Rentangan ini yang digunakan sebagai *cut off* uji, yang akan menentukan terjadinya perubahan jumlah sel bakteri pada pengenceran 10^{-6} .



Gambar 2. Persisi jumlah sel bakteri pada pengenceran 10^6

Pembahasan

Enumerasi merupakan teknik perhitungan jumlah mikroba dalam suatu media tanpa mengidentifikasi jenis mikroba (bakteri dan jamur). Enumerasi bertujuan untuk menentukan jumlah sel dari suatu kultur bakteri secara kuantitatif (Lily et al., 2010). Enumerasi dilakukan melalui metode *spread plate* dan serangkaian pengenceran. Pengenceran bertujuan untuk mengurangi jumlah bakteri sehingga dapat dihitung dengan mudah. Pengenceran yang diinokulasikan pada plate NA adalah pengenceran 10^5 dan 10^6 . Berdasarkan hasil penelitian jumlah koloni bakteri pada pengenceran 10^6 lebih stabil dibandingkan pengenceran 10^5 . Sehingga, yang dipilih adalah pengenceran 10^6 , dapat dilihat pada Gambar 1.

Hasil dari semua jumlah koloni pada plate ke-1 sampai dengan plate ke-6 pada pengenceran 10^6 dirata-ratakan. Hasil rata-rata tersebut adalah $12,2 \times 10^6$, jadi yang dikeluarkan adalah +/- dari hasil jumlah sel bakteri tersebut. Untuk mengukur suatu jumlah sel pada suatu medium, maka dapat dikatakan bahwa range pemeriksaan adalah -0,8 sampai dengan +3,2.

Nilai-nilai jumlah sel bakteri yang berada pada ekstrim atas dan ekstrim bawah dianggap sebagai nilai pencilan. Pada penelitian ini nilai dari ekstrim atas adalah +3,2 dengan jumlah sel bakteri 15×10^6 CFU/ml dan nilai dari ekstrim bawah adalah -0,8 dengan jumlah sel bakteri 9×10^6 CFU/ml. Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa nilai persisi jumlah sel bakteri dari range pemeriksaan adalah -0.8 sampai dengan +1,2.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai oleh PNBP Universitas Negeri Padang melalui skema Hibah Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT).

Daftar Pustaka

- Afifah, N., Irdawati, I., & Putri, D. H. (2018). Isolation and Identification of Endophytic Bacteria from the Andalas Plant Stem (*Morus macroura* Miq.). *Bioscience*, 2(1), 72–75. <http://doi.org/10.24036/02018219952-0-00>
- Brooks, G. F., Jawetz, E., Melnick, J. L., & Adelberg, E. A. (2013). *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. Climate Change 2013 - The Physical Science Basis* (Vol. 53). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. <http://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.008>
- Lily, M., S., S., T.Y., T. N., M.D., N. A., L.L., L., K.C., K., ... A.H., M. (2010). Improving notification of critical laboratory results. *Medical Journal of Malaysia*, 65, 74. Retrieved from <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L70946993> http://www.e-mjm.org/2010/CRC_2010_supA.pdf
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., & Clark, D. P. (2009). *Brock Biology of Microorganisms 13th Edition. Benjamin Cummings* (Vol. 53). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Putri, M. F., Fifendy, M., & Putri, D. H. (2018). Diversitas Bakteri Endofit Pada Daun Muda dan Tua Tumbuhan Andaleh (*Morus macroura* miq.). *EKSAKTA*, 19(1), 125–130. <http://doi.org/https://doi.org/10.24036/eksakta/vol19-iss1>
- Yandila, S., Putri, D. H., & Fifendy, M. (2018). Endophytic Bacteria Colonization on Root Andaleh Plant (*Morus macroura* Miq.). *Bio-Site*, 04(2), 1–7. Retrieved from <https://online-journal.unja.ac.id/BST/issue/view/771>