

PENGUJIAN AGAR SEBAGAI MEDIA MIKROBIOLOGI

Umi Rahayu^{*)}

^{*)} Teknisi Litkayasa pada Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan

ABSTRAK

Kegiatan ini ditujukan untuk menguji beberapa jenis agar sebagai media mikrobiologi untuk menumbuhkan bakteri. Sebagai bakteri uji digunakan kultur murni *Escherichia coli* (mewakili Gram negatif), *Lactococcus lactis* (mewakili Gram positif), dan ikan segar sebagai kultur campuran (*mixed culture*). Cara menumbuhkan bakteri dilakukan dengan teknik agar sebar pada media padat yang mengandung contoh (1,5% b/v), *Nutrient Broth* dan akuades. Pengamatan dilakukan terhadap diameter dan jumlah koloni yang tumbuh, sebagai Angka Lempeng Total (ALT) berdasarkan SNI (2006). Dari 8 jenis agar yang diuji ternyata masing-masing memberikan hasil yang relatif sama untuk diameter dan koloninya. Angka lempeng total yang dihasilkan berkisar antara $8,3 \times 10^5$ hingga $2,7 \times 10^6$. Sedangkan diameter koloni yang tumbuh pada semua media agar yang diuji berkisar antara 1—6 mm.

KATA KUNCI: media agar, *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, ikan segar

PENDAHULUAN

Mikroorganisme termasuk kedalam jasad hidup yang sangat peka terhadap perubahan lingkungan; dengan adanya perubahan yang kecil pada suhu atau cahaya misalnya, akan cepat mempengaruhi kehidupan dan aktivitasnya yaitu perubahan sifat morfologi dan fisiologinya. Untuk keperluan hidupnya, jasad hidup memerlukan bahan makanan demikian juga mikroba, untuk kehidupannya memerlukan bahan-bahan organik dan anorganik yang diambil dari lingkungannya. Bahan tersebut dinamakan nutrien (Suriawiria, 1996).

Meskipun persyaratan nutrien mikroorganisme amat beragam, namun sebagai makhluk hidup mereka mempunyai kebutuhan dasar yang sama, meliputi air, karbon, energi, mineral, dan faktor tumbuh. Untuk menumbuhkan mikroorganisme dengan sebaik-baiknya, pertama kali harus memahami kebutuhan dasarnya lalu mencoba memformulasikan suatu medium yang memberikan hasil terbaik. Yang dimaksudkan dengan medium disini ialah bahan yang digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme di atas atau di dalamnya. Konsistensi medium dapat dibuat bermacam-macam bergantung kepada keperluannya. Misalnya, medium cair seperti

kaldu nutrien atau kaldu glukosa yang dapat digunakan untuk keperluan pembiakan organisme dalam jumlah besar, penelaahan fermentasi, dan berbagai macam uji. Bila diinginkan medium padat, dapat ditambahkan bahan pematat ke dalam kaldu. Medium padat biasanya digunakan untuk mengamati penampilan atau morfologi koloni dan mengisolasi biakan murni sedangkan medium dengan konsistensi pertengahan disebut medium setengah padat, kegunaannya antara lain untuk menguji ada tidaknya motilitas dan kemampuan fermentasi. Medium setengah padat mengandung gelatin maupun agar namun dalam konsentrasi lebih kecil daripada medium padat. Sebagai bahan untuk membuat medium menjadi padat dapat dipakai agar. Meskipun bahan utama agar ialah galaktan, yang diekstraksi dari alga laut *Gelidium*, namun sebagian besar mikroorganisme tidak dapat menggunakannya sebagai makanan sehingga agar dapat berlaku semata-mata sebagai bahan pematat. Agar menjadi larut atau cair bila dipanaskan pada suhu hampir 100°C dan tetap berbentuk cair bila didinginkan sampai kurang lebih 43°C (Hadioetomo, 1990).

Agar mikrobiologi adalah agar yang digunakan untuk media mikrobiologi seperti agar *grade A*, *granulated agar*, *technical agar*, *agar*

noble, *agar select*, *marine agar*, dan *nutrient agar*. Agar mikrobiologi biasanya dibuat dari rumput laut *Gelidium* dan *Pterocladia* karena menghasilkan agar dengan titik jendal di atas 41°C. Sedangkan *bacto agar* adalah agar yang telah dimurnikan yang secara khusus digunakan sebagai media kultur mikrobiologi. *Agar grade A* merupakan agar dengan *grade* tinggi, mengandung mineral yang diperlukan untuk pertumbuhan bakteri. Yang membutuhkan persyaratan khusus untuk pertumbuhannya (Anon, 2007 dalam Fransiska, 2007). Dewasa ini dengan tersedianya medium mikrobiologi dalam bentuk terdehidrasi (bentuk bubuk), penyiapan medium menjadi lebih mudah hanya menimbang, melarutkannya dalam air, menyesuaikan pHnya bila perlu, menempatkannya dalam wadah-wadah yang sesuai, dan kemudian mensterilkannya. Namun di Indonesia medium semacam ini masih di impor dari negara-negara maju sehingga harganya pada umumnya amat tinggi (Hadioetomo, 1990).

Tujuan dari kegiatan ini ialah untuk menguji beberapa jenis produk agar sebagai media mikrobiologi untuk mendapatkan kesesuaiannya terhadap jenis-jenis bakteri.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Agar yang diuji sebanyak delapan jenis hasil riset Kelompok Peneliti Pengolahan Produk Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan. Bakteri yang ditumbuhkan berasal dari kultur murni *Escherichia coli* (mewakili Gram negatif), kultur murni *Lactococcus lactis* (mewakili Gram positif) dan bakteri dari daging ikan mas segar (mewakili kultur campuran/*mixed culture*). Bahan lain yang digunakan adalah larutan pengencer garam fisiologis (NaCl) 0,9% dan media cair *Nutrien Broth* (NB).

Alat

Alat-alat yang digunakan meliputi gelas ukur, *beaker glass*, cawan petri, *erlenmeyer*, batang kaca penyebar (*spreader*), pinset, kompor listrik, tabung reaksi, *spatula*, *vortex*, nampan, dan keranjang plastik, gunting, pembakar *bunsen*, *ose*, *spektrofotometer*, mikropipet 1 mL dan 0,1 mL, tip ukuran 1 mL, dan 0,1 mL, *laminar*, inkubator bersuhu 37°C, *coloni counter*. Sedangkan bahan pelengkap lain yang dipakai adalah plastik tahan panas,

kertas pembungkus cawan petri, kapas, kertas label, kertas tisu, karet gelang, dan spidol permanen.

Metode

Pengujian agar sebagai media mikrobiologi dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri uji pada media padat dengan teknik agar sebar. Koloni yang tumbuh kemudian dihitung berdasarkan SNI (2006).

Prosedur pembuatan media padat adalah sebagai berikut: Agar dan *Nutrient Broth* ditimbang, kemudian ditambahkan akuades sehingga konsentrasi agar mencapai 1,5% (b/v). Selanjutnya campuran dipanaskan di atas kompor listrik dan diaduk sampai agar benar-benar larut lalu dilakukan sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Larutan agar steril kemudian dituang ke dalam petri steril sebanyak kurang lebih 15—20 mL/petri dan dibiarkan membeku. Setiap cawan petri lalu diberi tanda/kode dan tingkat pengenceran yang diinginkan. Ke dalam media padat kemudian diinokulasikan secara aseptik 0,1 mL bakteri uji dengan beberapa seri pengenceran (Gambar 1 dan 2) lalu disebar merata dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Koloni yang tumbuh kemudian dihitung jumlahnya sebagai Angka Lempeng Total (ALT) berdasarkan SNI (2006), di mana perhitungan dilakukan terhadap cawan petri yang mengandung 25—250 koloni dan bebas *spreader*. Perhitungan koloni yang menggunakan metode cawan agar sebar/*spread plate*, jumlah koloni yang dihitung dikalikan dengan 10 dari pengenceran yang digunakan.

Perhitungan Angka Lempeng Total (ALT) berdasarkan (SNI, 2006) sebagai berikut:

$$N = \frac{\Sigma C}{\{(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)\} \times (d)}$$

di mana:

N = jumlah koloni produk, dinyatakan dalam koloni/mL atau koloni/g

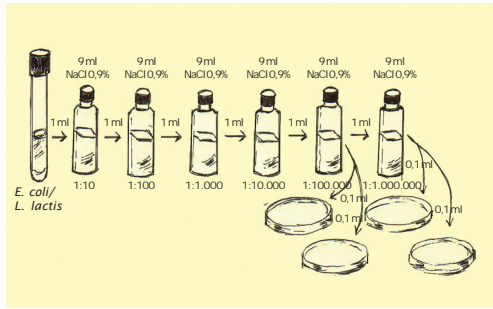
ΣC = jumlah koloni pada seluruh cawan

n_1 = jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung

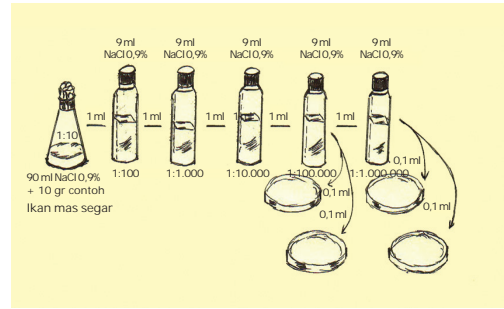
n_2 = jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung

d = faktor pengenceran pertama yang dihitung

Bila pada kedua pengenceran yang digunakan diperoleh koloni kurang dari 25, catat



Gambar 1. Pengenceran serial dan pencawan kuantitatif bakteri uji



Gambar 2. Pengenceran serial dan pencawan kuantitatif kultur campuran

koloni yang ada, tetapi nyatakan perhitungan sebagai kurang 25 dan dikalikan dengan 1/d, di mana d adalah faktor pengencer pertama yang digunakan dan dilaporkan sebagai perkiraan ALT. Seluruh cawan lebih dari 250 koloni.

Jika dari kedua pengenceran menghasilkan lebih dari 250 koloni (tetapi lebih sedikit dari 100 koloni/cm²) maka angka lempeng total adalah yang mendekati 250 dikalikan dengan faktor pengenceran dan nyatakan sebagai perkiraan ALT. Seluruh cawan berisi *spreader* dan atau kegagalan dalam pengujian, dilaporkan sebagai hasil "*Spreader*" (SPR) atau kegagalan dalam pengujian.

Penyiapan pengenceran serial (Hadiotomo, 1990) (Gambar 1 dan 2).

Pengamatan dilakukan terhadap agar bubuk, media agar cair, dan media agar padat, meliputi:

- Agar bubuk: penampakan (deskriptif) dan densitas kamba. Penentuan densitas kamba dilakukan dengan cara sebagai berikut: Contoh agar bubuk ditimbang sebanyak 1—1,5 g kemudian diukur volumenya (dalam mL). Densitas kamba dinyatakan sebagai volume persatuan berat (mL/g).
- Agar cair sebelum sterilisasi diukur pH, penampakan, dan kekentalan (deskriptif).
- Agar padat: penampakan (deskriptif) Angka Lempeng Total (ALT) dan diameter koloni.

HASIL DAN BAHASAN

Hasil pengujian agar sebagai media mikrobiologi dilakukan melalui berbagai pengamatan dan penghitungan Angka Lempeng Total (ALT). Hasil pengamatan terhadap agar bubuk disajikan pada Tabel 1.

Densitas kamba dapat memberikan gambaran terhadap volume bahan pada satuan berat yang sama. Semakin tinggi densitas kamba suatu bahan menunjukkan bahwa bahan tersebut bersifat kamba (*Voluminous*) yaitu memerlukan ruang lebih luas dibandingkan bahan yang lebih kecil densitas kambanya. Berdasarkan Tabel 1 sampel IIIP dan IIK memiliki densitas kamba lebih besar dibandingkan sampel IK, IIK, IP, IIP, OX, dan BD, sehingga untuk membuat 1,5% agar dalam media diperlukan volume agar bubuk yang lebih banyak. Hal ini tampaknya berkaitan dengan hasil pengamatan terhadap kekentalan media agar cair dan konsistensi media agar padat (Tabel 2). Media agar yang dihasilkan dari agar bubuk dengan densitas kamba yang lebih tinggi memiliki tingkat kekentalan yang lebih tinggi dan konsistensi yang lebih keras. Demikian juga sebaliknya contoh agar OX dengan densitas kamba paling kecil tingkat kekentalannya paling rendah.

Hasil pengamatan terhadap pH media agar cair menunjukkan bahwa semua contoh media memiliki kisaran pH sekitar 7 (netral); dengan demikian penambahan contoh agar relatif tidak mengubah pH medium, karena medium *Nutrient Broth* yang digunakan memiliki pH sekitar 7,5. Umumnya bakteri tumbuh baik pada pH sekitar 7 (Lay, 1994).

Pengamatan terhadap pertumbuhan koloni baik jumlah maupun diameternya pada setiap media padat menunjukkan hasil yang relatif sama (Tabel 3). Jumlah koloni bakteri (Angka Lempeng Total/ALT) pada setiap media padat berkisar antara $8,3 \times 10^5$ hingga $2,7 \times 10^6$.

Jumlah koloni yang tumbuh pada suatu media dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain nutrisi dalam medium, pH, suhu,

Tabel 1. Hasil pengamatan penampilan terhadap agar bubuk

Contoh agar	Penampakan	Penentuan densitas kamba		
		Berat (g)	Volume (mL)	Densitas kamba (mL/g)
IP	Warna krem butiran halus, seragam	1.505	3,4	2.259
IIP	Warna krem butiran kurang halus, seragam	1.504	5,2	3.457
IIIP	Warna krem butiran kurang halus, seragam	1.503	5,6	3.725
IK	Warna krem kecoklatan butiran kasar seragam	1.503	4,2	2.794
IIK	Warna krem kecoklatan butiran kasar seragam	1.506	4,8	3.187
IIIK	Warna krem kecoklatan butiran kasar seragam	1.502	5,8	3.856
OX	Warna putih krem butiran lembut seragam	1.506	2,6	1.726
BD	Warna krem butiran kurang halus seragam	1.507	3,2	2.123

Tabel 2. Hasil pengamatan penampilan media agar cair dan padat

Contoh agar	pH	Media agar cair		Media agar padat	
		Warna	Kekentalan	Warna	Konsistensi
IP	7-8	Warna krem keruh	Kental (+++)	Krem bening	Keras (+++)
IIP	7-8	Warna krem keruh	Kental (+++)	Krem bening	Keras (+++)
IIIP	7-8	Warna krem keruh	Kental (++++)	Krem bening	Keras (++++)
IK	7-8	Warna kecoklatan keruh	Kental (+++)	Krem bening	Keras (+++)
IIK	7-8	Warna kecoklatan keruh	Kental (+++)	Krem bening	Keras (+++)
IIIK	7-8	Warna kecoklatan keruh	Kental (++++)	Krem bening	Keras (++++)
OX	6-7	Warna putih krem keruh	Kental (++)	Krem lebih bening	Keras (+++)
BD	6-7	Warna kuning kecoklatan bening	Kental (++++)	Putih kekuningan lebih bening	Keras (++++)

Tabel 3. Hasil pengamatan media agar padat

Contoh agar	<i>Escherichia coli</i> (OD = 0,376)		<i>Lactococcus lactis</i> (OD = 0,327)		Ikan segar	
	Angka lempeng total (ALT) CFU/mL	Diameter koloni (mm)	Angka lempeng total (ALT) CFU/mL	Diameter koloni (mm)	Angka lempeng total (ALT) CFU/mL	Diameter koloni (mm)
IP	2,2 x 10 ⁶	1-5	8,3 x 10 ⁵	2-4	1,5 x 10 ⁶	2-5
IIP	2,3 x 10 ⁶	1-6	9,9 x 10 ⁵	2-6	1,5 x 10 ⁶	2-5
IIIP	2,0 x 10 ⁶	1-5	9,7 x 10 ⁵	2-5	1,7 x 10 ⁶	1-6
IK	2,0 x 10 ⁶	1-5	7,0 x 10 ⁵	2-5	1,5 x 10 ⁶	1-5
IIK	2,6x 10 ⁶	1-5	1,5 x 10 ⁶	2-5	1,8 x 10 ⁶	1-5
IIIK	2,7 x 10 ⁶	1-5	9,8 x 10 ⁵	2-5	2,2 x 10 ⁶	3-5
Ox	1,7 x 10 ⁶	2-5	1,9 x 10 ⁶	2-5	1,8 x 10 ⁶	2-6
BD	2,3 x 10 ⁶	2-5	1,3 x 10 ⁶	2-6	2,2 x 10 ⁶	2-6

kelembaban, dan lain-lain. Pada pengujian ini nutrisi yang dibutuhkan oleh bakteri berasal dari *Nutrient Broth* yang mengandung *Yeast extract*, peptone, dan sodium chloride sebagai sumber karbon, nitrogen dan yang lainnya.

Menurut Dwidjoseputro (1985), dari suatu percobaan dengan *Escherichia coli* dapat diketahui, bahwa bakteri ini tiap 20 menit mengadakan pembelahan, jika faktor-faktor luar seperti medium, kelembaban, pH, dan suhu tetap baik. Tetapi apabila keadaan medium memburuk karena perubahan pH atau sebab lainnya jumlah sel-sel yang segar akan menyusut, kecepatan membelah menjadi berkurang. Selain itu kemungkinan suhu dapat mempengaruhi pertumbuhan karena setiap jenis bakteri mempunyai suhu optimum yang berbeda (Lay, 1994).

Dari Gambar 3 dapat dilihat adanya pengenceran memberikan pengaruh terhadap jumlah dan ukuran koloni bakteri yang tumbuh pada suatu media. Dalam hal ini, semakin tinggi tingkat pengenceran berarti jumlah bakteri yang tumbuh di dalam suatu media semakin sedikit. Kemudian, semakin sedikit jumlah

koloni dalam suatu media, maka semakin besar peluang koloni bakteri tersebut mengonsumsi nutrisi yang ada untuk pertumbuhannya. Koloni yang tumbuh pada media dengan sumber nutrisi berlimpah akan menghasilkan ukuran koloni yang relatif lebih besar. Dengan kata lain, dalam kondisi jumlah nutrisi yang sama dari suatu media, semakin tinggi tingkat pengenceran maka semakin sedikit jumlah koloni bakteri yang tumbuh, namun ukurannya relatif lebih besar. Sebaliknya, semakin rendah tingkat pengenceran maka jumlah koloni bakteri yang tumbuh semakin banyak, namun ukurannya relatif kecil.

KESIMPULAN

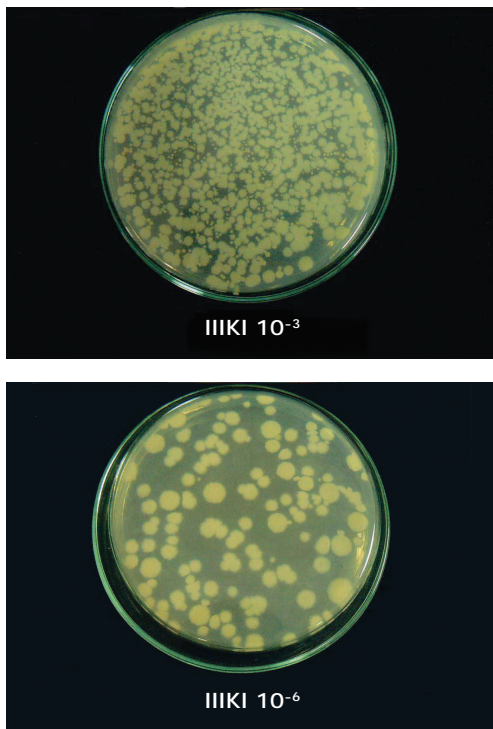
Delapan jenis agar hasil riset Kelompok Peneliti Pengolahan Produk Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan dapat digunakan sebagai media agar mikrobiologi. Angka Lempeng Total (ALT) yang dihasilkan berkisar antara $8,3 \times 10^5$ hingga $2,7 \times 10^6$. Contoh agar IIP dan IIK yang memiliki densitas kamba lebih tinggi, menghasilkan media agar cair yang lebih kental dan media agar padat yang lebih keras, dengan hasil Angka Lempeng Total (ALT) yang relatif sama dengan yang lain. Dalam hal ini penggunaan konsentrasi agar bubuk dari contoh ini kemungkinan dapat dikurangi (kurang dari 1,5%).

UCAPAN TERIMA KASIH

- Ucapan terima kasih ditujukan kepada Ibu Ir. Yusro Nuri Fawzya, M.Si. yang telah menyediakan waktunya dan memberikan pengarahan serta bimbingannya.
- Kepada Ibu Ir. Murdinah, M.S. yang telah memberikan izin sehingga terwujud tulisan ini.
- Kepada kelompok peneliti laboratorium Bioteknologi BBRP2B, Jakarta dan rekan-rekan teknisi atas dukungan dan motivasinya.

DAFTAR PUSTAKA

- Dwidjoseputro. 1985. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Penerbit Djambatan. p. 55—57.
- Fransiska, D. dan Murdinah. 2007. Prospek Produksi Agarosa Dan Agar Mikrobiologi di Indonesia. Buletin Pascapanen & Bioteknologi Kelautan dan Perikanan. Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan. Badan Riset Kelautan dan Perikanan. Departemen



Gambar 3. Diameter koloni kultur campuran pada pengenceran 10^{-3} dan 10^{-6}

- Kelautan dan Perikanan. *Squalen* 2(2): 37—72.
- Hadioetomo, R.S. 1990. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek*. Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor. PT Gramedia. Jakarta. 163 pp.
- Lay, B.W. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium Manajemen. PT Raja Grafindo Persada. 168 pp.
- Suriawiria, U. 1996. Mikrobiologi Air dan Dasar-Dasar Pengolahan Buangan Secara Biologis. 322 pp.
- Standar Nasional Indonesia. 2006. Cara Uji Mikobiologi-Bagian 3; Penentuan Angka Lempeng Total (ALT) Pada Produk Perikanan. Badan Standardisasi Nasional. 8 pp.