



Research Articles

## Perhitungan jumlah bakteri di Laboratorium Mikrobiologi menggunakan pengembangan metode Spektrofotometri

Rosmania<sup>1\*</sup>, Fitri Yanti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Sriwijaya, Sumatera Selatan, Indonesia

<sup>2</sup>Jurusan Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Sriwijaya, Sumatera Selatan, Indonesia

Received 24 April 2020; Accepted 24 Mei 2020; Published 31 Mei 2020

<p><b>Keyword:</b> Spectrophotometer; Turbidity; <i>Escherichia coli</i>; <i>Staphylococcus aureus</i></p>	<p><b>ABSTRACT:</b> The used of spectrophotometry in this study was a fast way to count the number of bacteria in a solution. This study aims to determine the number of test bacteria whose absorbance values are equal to the McFarland 0.5 standard solution using the cup count method. This research was conducted in April-October 2019, at the Microbiology Laboratory, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Sriwijaya University, Indralaya. The research method used consisted of several stages, namely the making of media, sterilization, purification of test bacteria, rejuvenation of test bacteria, manufacture of McFarland 0.5 standard solutions, maked standard bacteria curves, making bacterial growth curves, maked test bacterial suspensions, measuring bacterial counts turbidity method, and measurement of the number of bacteria by the cup count method. The results of this study indicate that the value of the McFarland standard solution 0.5 made according to the value of the standard McFarland solution kit (Himedia) is around 0.08-0.1. So it is more economical and easy to obtain. The results of the calculation of the number of <i>Escherichia coli</i> cells is <math>1.3 \times 10^7</math> CFU/ml, the number of <i>Staphylococcus aureus</i> cells is <math>1.1 \times 10^7</math> CFU/ml. @2020 Published by UP2M, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Sriwijaya University</p>
<p><b>Kata Kunci:</b> Spektrofotometer; Turbidity; <i>Escherichia coli</i>; <i>Staphylococcus aureus</i></p>	<p><b>ABSTRAK:</b> Penggunaan spektrofotometri dalam penelitian ini merupakan cara yang cepat untuk menghitung jumlah bakteri dalam suatu larutan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan jumlah bakteri uji yang nilai absorban nya sama dengan larutan standar McFarland 0,5 dengan menggunakan metode hitungan cawan. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April-Oktober 2019, di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas sriwijaya, Indralaya. Metode penelitian yang digunakan terdiri dari beberapa tahapan, yaitu pembuatan media, sterilisasi, pemurnian bakteri uji, peremajaan bakteri uji, pembuatan larutan standar McFarland 0,5, pembuatan kurva standar bakteri, pembuatan kurva pertumbuhan bakteri, pembuatan suspensi bakteri uji, pengukuran jumlah bakteri secara metode turbidity, dan pengukuran jumlah bakteri secara metode hitungan cawan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa nilai larutan standar McFarland 0,5 yang dibuat sesuai dengan nilai larutan standar McFarland kit (Himedia) yaitu sekitar 0,08-0,1. Sehingga lebih ekonomis dan mudah didapat Hasil perhitungan jumlah sel <i>Escherichia coli</i> yaitu <math>1,3 \times 10^7</math> CFU/ml, jumlah sel <i>Staphylococcus aureus</i> yaitu <math>1,1 \times 10^7</math> CFU/ml. @2020 Published by UP2M, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Sriwijaya University</p>

\* Corresponding author.

E-mail address: [rosmaniana83@gmail.com](mailto:rosmaniana83@gmail.com)

## PENDAHULUAN

Perhitungan jumlah bakteri merupakan salah satu cara yang dilakukan untuk bisa mengetahui berapa banyak koloni bakteri yang terdapat pada suatu media, baik itu koloni sel yang hidup maupun koloni sel bakteri yang mati. Metode yang digunakan adalah perhitungan secara langsung dan perhitungan secara tidak langsung. Perhitungan jumlah bakteri secara langsung digunakan untuk menentukan jumlah bakteri keseluruhan baik yang mati maupun yang hidup. Sedangkan perhitungan bakteri secara tidak langsung digunakan untuk menentukan jumlah bakteri yang hidup saja.

Setiap perhitungan jumlah bakteri baik secara langsung maupun tidak langsung memiliki kelemahan masing-masing. Jumlah bakteri masih belum mendekati hasil maksimal dikarenakan perhitungan yang melibatkan sel hidup maupun sel mati bakteri, keterbatasan alat dan bahan saat perhitungan, keperluan persiapan alat dan bahan yang cukup panjang, ketelitian penelitian oleh peneliti dan lain-lain [1].

Perhitungan bakteri secara Turbidimetri (kekeruhan) dengan memakai alat spektrofotometer adalah contoh perhitungan jumlah bakteri secara tidak langsung. Fungsi alat Spektrofotometer dalam laboratorium adalah mengukur transmittan atau absorbans suatu contoh yang dinyatakan dalam fungsi panjang gelombang [2,3]. Oleh karena itu perlu dilakukan pengembangan metode spektrofotometer yang digunakan untuk perhitungan jumlah bakteri di laboratorium mikrobiologi.

Metode turbidimetri merupakan cara yang cepat untuk menghitung jumlah bakteri dalam suatu larutan dengan menggunakan alat spektrofotometer. Digunakan untuk uji antibakteri, dimana jumlah bakterinya dihitung dengan membandingkan kekeruhan suspensi bakteri dengan menggunakan larutan standar McFarland. Larutan McFarland standar digunakan sebagai referensi untuk menyesuaikan kekeruhan bakteri suspensi sehingga jumlah bakteri dalam kisaran yang diberikan untuk membakukan mikroba pengujian [4]. Contoh pengujian tersebut adalah antibiotik kerentanan pengujian oleh pengukuran konsentrasi penghambatan minimum yang secara rutin digunakan dalam medis mikrobiologi dan penelitian. Jika suspensi yang digunakan terlalu pekat atau terlalu encer, hasil yang salah (tahan palsu atau palsu rentan) untuk setiap agen antimikroba yang diberikan bisa terjadi.

Keakuratan jumlah bakteri standar McFarland dapat dilakukan dengan metode hitungan cawan. Metode ini termasuk metode

perhitungan bakteri secara tidak langsung. Prinsip metode hitungan cawan adalah jika sel mikroba yang masih hidup ditumbuhkan pada medium agar, maka sel mikroba tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dengan mata tanpa menggunakan mikroskop [5]. Metode hitungan cawan merupakan cara yang paling sensitif untuk menghitung jumlah mikroba karena hanya sel yang masih hidup yang dihitung dan beberapa jenis mikroba dapat dihitung sekaligus. Metode hitungan cawan memiliki kelemahan yaitu membutuhkan persiapan dan waktu inkubasi beberapa hari untuk menghitung pertumbuhan koloni bakteri [6]. Oleh karena itu, mahasiswa penelitian kebanyakan menggunakan metode turbidity saja untuk menentukan jumlah bakteri dalam suspensi bakteri uji yang akan digunakan. Untuk membuktikan bahwa metode spektrofotometri (turbidity) memberikan hasil yang valid maka perlu pengujian akurasi metode yang dibandingkan dengan metode hitungan cawan. Pada penelitian ini menggunakan bakteri *Escherichia coli* dan bakteri *Staphylococcus aureus* sebagai bakteri uji yang sering digunakan dalam uji aktivitas antibakteri dan konsentrasi hambat minimum.

Pada penelitian ini dilakukan pembuatan McFarland standard untuk mendapatkan keakuratannya sama dengan McFarland standard kit sebagai pengganti di laboratorium, sehingga mudah di dapat dan nilainya lebih ekonomis. Untuk itu dilakukan pembacaan nilai absorbansi kultur bakteri yang kekeruhannya sama dengan McFarland standard menunjukkan jumlah bakteri yang sama dengan McFarland standard. Penentuan jumlah bakteri yang nilai absorbansinya sama dengan larutan standar McFarland 0,5 dengan menggunakan metode hitungan cawan.

## METODE PENELITIAN

### Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April-Oktober 2019, di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sriwijaya, Indralaya.

### Prosedur Penelitian

#### Cara Kerja

1. Pembuatan Media Pemurnian, Peremajaan, Su-spensi dan Pengujian Bakteri [7];[8];[9].

- a. Media *Eosin Methylen Blue Agar* (EMBA). Ditimbang 36 gram dilarutkan dengan aquadest sebanyak 1 liter dalam Erlenmeyer 1000 ml kemudian dimasak sampai larut diatas *hot plate magnetic stirrer* yang ditandai dengan muncul nya gelembung air didasar erlenmeyer, alat dimatikan. Erlenmeyer diangkat dan mulutnya ditutup dengan kapas yang dibaluti dengan kain kasa dan ditutupi dengan aluminium foil.
  - b. Media *Brain Heart Infusion* (BHI) Agar. Ditimbang sebanyak 52 gram dilarutkan dengan aquadest sebanyak 1 liter dalam Erlenmeyer 1000 ml kemudian dimasak sampai larut diatas *hot plate magnetic stirrer*. Setelah larut yang ditandai dengan larutan jadi jernih ada gelembung didasar erlenmeyer, alat dimatikan. Erlenmeyer diangkat dan mulut nya ditutup dengan kapas yang dibaluti dengan kain kasa dan ditutupi dengan aluminium foil.
  - c. Media *Nutrient Agar* (NA). Ditimbang sebanyak 20 gram dilarutkan dengan aquadest sebanyak 1 liter dalam Erlenmeyer 1000 ml kemudian dimasak sampai larut diatas *hot plate magnetic stirrer*. Setelah larut yang ditandai dengan larutan jadi jernih ada gelembung didasar erlenmeyer, alat dimatikan. Erlenmeyer diangkat dan mulut nya ditutup dengan kapas yang dibaluti dengan kain kasa dan ditutupi dengan aluminium foil.
  - d. Media *Nutrient Broth* (NB). Ditimbang sebanyak 8 gram dilarutkan dengan aquadest sebanyak 1 liter dalam Erlenmeyer 1000 ml kemudian dimasak sampai larut diatas *hot plate magnetic stirrer*. Setelah larut yang ditandai dengan larutan jadi jernih ada gelembung didasar erlenmeyer, alat dimatikan. Erlenmeyer diangkat dan mulut nya ditutup dengan kapas yang dibaluti dengan kain kasa dan ditutupi dengan aluminium foil.
2. Sterilisasi [9]
 

Media yang sudah dibuat di sterilisasi bersama dengan alat-alat lain yang akan dipakai seperti cawan petri, tabung reaksi, tip mikropipet. Di sterilisasi pakai alat Autoklaf pada suhu 121 °C tekanan 15 lbs selama 15 menit.
  3. Pemurnian Bakteri Uji [9]
 

Media yang sudah disterilisasi, biarkan suhunya turun sampai  $\pm 40$  °C pada suhu ruang. Setelah itu, dimasukkan kedalam cawan petri steril. Biarkan media padat dalam cawan petri  $\pm 20$  menit. Bakteri uji yang digunakan adalah *Escherichia coli* dan *Staphilococcus aureus*. Masing-masing bakteri diinokulasikan kedalam cawan petri secara kuadrant 4. setelah dinokulasikan bakteri, cawan petri dibungkus dengan kertas, dimasukkan ke dalam *incubator* secara terbalik pada suhu 37 °C selama 1x24 jam.
  4. Peremajaan Bakteri Uji [9]
 

Koloni tunggal yang tumbuh pada media cawan diambil dengan jarum ose, diinokulasikan ke dalam media miring dalam tabung reaksi secara zig zag. Pekerjaan ini dilakukan dengan aseptik dekat dengan api bunsen. Tabung reaksi dibungkus dengan kertas, diinkubasi dalam inkubator selama 1x24 jam.
  5. Pembuatan Larutan Standar McFarland 0,5 [10,11].
    - a. Pembuatan Larutan BaCl<sub>2</sub> 1 %. Ditimbang dengan teliti BaCl<sub>2</sub> sebanyak 1 gram. Dilarutkan kedalam labu ukur 100 ml dengan aquadest sampai tanda batas lalu homogenkan. Pindahkan larutan ke dalam botol *reagent* yang bertutup rapat dan gelap. Penyimpanan larutan BaCl<sub>2</sub> 1 % di dalam kulkas.
    - b. Pembuatan Larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 %. Disiapkan labu ukur 100 ml yang sudah diisi aquadest sebanyak  $\pm 50$  ml. Dipipet dengan hati-hati asam sulfat pekat sebanyak 1,02 ml, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml melalui dinding secara mengalir. Keluarkan cairan sampai habis. Paskan larutan dengan aquadest sampai tanda batas. Pindahkan larutan ke dalam botol *reagent* yang bertutup rapat. Penyimpanan larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 % pada suhu ruang.
    - c. Pembuatan Larutan McFarland 0,5. Dipipet larutan BaCl<sub>2</sub> 1 % sebanyak 0,05 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi tutup ulir. Kemudian dipipet juga larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

1 % sebanyak 9,95 ml. Dicampurkan kedalam tabung reaksi tutup ulir yang sudah berisi larutan BaCl<sub>2</sub> 1 %. larutan ini di vortex sampai tercampur sempurna. Penyimpanan larutan di dalam kulkas.

#### 6. Pembuatan Kurva Standar Bakteri [12,13]

Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang digunakan diambil masing-masing 2 ose, dimasukan dalam 25 ml media *Nutrient Broth* (NB) yang sudah disterilkan. Kemudian di inkubasi pada *shaker incubator* suhu 37 °C, 120 rpm selama semalaman, sehingga didapatkan kultur bakteri. Setelah itu, diukur nilai Absorban nya dengan alat Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 625 nm. Lalu dilakukan pengenceran kultur bakteri dengan pengenceran 1;1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 dengan larutan pengencer NaCl fisiologis (NaCl 0,85 %). Masing-masing pengenceran diukur nilai Absorban nya dan jumlah sel bakteri dengan metode hitungan cawan. Setelah diketahui nilai Absorban dan jumlah sel bakteri, maka dibuat kurva standar yaitu grafik hubungan antara Absorban pada sumbu y dengan jumlah sel bakteri pada sumbu x. Pada grafik akan didapatkan persamaan regresi linier yang akan digunakan untuk menghitung jumlah sel bakteri pada kurva pertumbuhan bakteri.

Rumus persamaan regresi linier :  $y = ax + b$

keterangan :

y = Absorban (OD)

a dan b = konstanta yang didapat dari garis linier

x = jumlah sel bakteri

#### 7. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri [14]

Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang digunakan diambil masing-masing 2 ose, dimasukan dalam 25 ml media *Nutrient Broth* (NB) yang sudah disterilkan. Kemudian di inkubasi pada *shaker incubator* suhu 37 °C, 120 rpm selama semalaman, sehingga didapatkan kultur bakteri. Setelah itu, diukur nilai Absorban nya dengan alat Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 625 nm. Lalu dilakukan pengenceran kultur bakteri dengan larutan pengencer NaCl fisiologis dengan nilai Absorban 0,08–1. Setelah didapatkan kultur bakteri yang Absorban nya

0,08–0,1, kemudian kultur ini dibagi ke dalam tabung reaksi steril sebanyak 8 tabung, masing – masing diisi 10 ml secara aseptis. Lalu di inkubasi pada *shaker incubator* pada suhu 37 °C, 120 rpm. Setiap 3 jam diukur nilai Absorban nya selama 24 jam.

#### 8. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang digunakan diambil masing-masing 1 ose, dimasukan dalam 25 ml media *Nutrient Broth* (NB) yang sudah disterilkan. Kemudian di inkubasi pada *shaker incubator* suhu 37 °C, 120 rpm selama waktu generasi terpendek nya. kemudian diukur nilai Absorban nya dengan alat Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 625 nm.

#### 9. Pengukuran jumlah bakteri secara metode turbidity (spektrofotometri)

Disiapkan larutan standar McFarland 0,5 dan suspensi bakteri uji yang akan diukur nilai Absorban nya. Yang pertama diukur, larutan McFarland 0,5 selanjutnya suspensi bakteri uji. Kalau nilai Absorban suspensi bakteri uji lebih besar, maka dilakukan pengenceran sehingga didapatkan nilai Absorban suspensi uji sama dengan larutan standar McFarland yaitu pada panjang gelombang 625 memberikan hasil nilai Absorban 0,08 – 0,1 [15].

#### 10. Pengukuran jumlah bakteri secara metode hitungan cawan [20]

Suspensi bakteri uji yang sudah ditentukan nilai absorban nya harus segera dihitung jumlah sel bakteri nya. Sebelum nya sudah disiapkan alat dan bahan steril untuk melakukan proses perhitungan bakteri. Suspensi bakteri uji diencerkan dari 10<sup>-1</sup> sampai 10<sup>-7</sup>, tujuan dari pengenceran bertingkat ini untuk mengurangi jumlah mikroba dalam cairan memudahkan dalam melakukan perhitungan. Penentuan tingkat pengenceran tergantung kepada perkiraan jumlah mikroba yang ada pada sampel. Suspensi bakteri 1 ml diambil dengan mikropipet lalu dimasukan pada tabung pertama (10<sup>-1</sup>) yang berisi 9 ml larutan NaCl fisiologi lalu di vortex sampai homogen. Selanjutnya diambil 1 ml lalu dimasukan ke dalam tabung kedua (10<sup>-2</sup>) di vortex sampai homogen. Ini dilakukan terus sampai tabung ketujuh (10<sup>-7</sup>). Setelah selesai


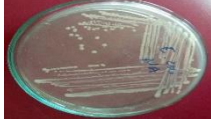


pengenceran bertingkat, lalu diambil seri pengenceran 2 terakhir masing-masing diambil 100  $\mu$ l dengan mikropipet dimasukkan kedalam cawan petri steril kemudian tuangkan media *Nutrient agar* (NA) steril yang suhunya  $\pm 40$  °C. homogenkan dengan cara memutar cawan diatas meja secara perlahan dengan gerakan seperti angka delapan. Biarkan  $\pm 15$  menit, kemudian cawan dibungkus dengan kertas dan di inkubasi dalam *incubator* secara terbalik suhu 37 °C selama 1x24 jam.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pemurnian Bakteri

Berdasarkan Tabel 1 didapatkan hasil pemurnian bakteri dengan metode cawan gores adalah biakan murni, dimana biakan murni adalah biakan yang sel-selnya berasal dari pembelahan satu sel tunggal. Prinsipnya adalah mengencerkan mikroorganisme sedemikian sehingga individu spesies dapat dipisahkan dari lainnya, dengan anggapan bahwa setiap koloni terpisah yang tampak pada cawan setelah inkubasi berasal dari satu sel tunggal [16]. emurnian bakteri dilakukan untuk mendapatkan isolat tunggal bakteri [17].

Tabel 1. Hasil Pemurnian Bakteri

No.	Jenis Bakteri	Jenis Media	Hasil	Keterangan
1.	<i>Escherichia coli</i>	EMB agar		Koloni tunggal yang terpisah berwarna hijau metalik,
2.	<i>Escherichia coli</i>	NA		Koloni tunggal yang terpisah berwarna krem, bentuk bulat besar
3.	<i>Staphylococcus aureus</i>	BHI agar		Koloni tunggal yang terpisah berwarna kuning muda, bentuk bulat kecil
4.	<i>Staphylococcus aureus</i>	NA		Koloni tunggal yang terpisah berwarna kuning, bentuk bulat kecil



### Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri dilakukan setelah didapatkan isolat tunggal bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Koloni tunggal yang tumbuh pada media cawan pada saat pemurnian diambil dengan menggunakan jarum ose kemudian diinokulasikan ke dalam media miring dalam tabung reaksi secara zig zag. Kultur bakteri ini diinkubasi dalam inkubator selama 1x24 jam. Hasil yang didapatkan pada proses peremajaan

bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dapat dilihat pada Tabel 2.

*Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif, berbentuk basil, panjang sekitar 2 mikrometer dan diameter 0,5 mikrometer. Bakteri ini bersifat anaerob fakultatif, biasanya dapat bergerak dan tidak membentuk spora. Bakteri ini umumnya hidup pada rentang 20-40 °C, optimum pada 37 °C. *Staphylococcus aureus* merupakan flora normal yang terdapat pada kulit manusia [18].

Tabel 2. Peremajaan Bakteri

No	Jenis Bakteri	Jenis Media	Hasil	Keterangan
1.	<i>Escherichia coli</i>	NA		Terbentuk goresan zig-zag murni.
2.	<i>Staphilococcus aureus</i>	NA		Terbentuk goresan zig-zag murni.

### Larutan Standar McFarland 0,5

Larutan McFarland 0,5 buatan merupakan kombinasi campuran larutan  $\text{BaCl}_2$  1 % 0,05 ml dan larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 % sebanyak 9,95 ml. Larutan standar McFarland 0,5 buatan diasumsikan setara dengan larutan Standar McFarland 0,5 Himedia, hal ini dapat dilihat pada Table 3. Larutan

McFarland 0,5 buatan digunakan sebagai referensi untuk menyesuaikan atau diasumsikan setara dengan kekeruhan bakteri suspensi sehingga jumlah bakteri dalam kisaran yang diberikan untuk membakukan mikroba pengujian [14,19].

Tabel 3. Larutan Standar McFarland 0,5

No.	Jenis Larutan	Hasil	Keterangan
1.	Larutan Standar McFarland 0,5 Himedia		Suspensi keruh, pembacaan Absorban pada panjang gelombang 625 adalah 0,08
2.	Larutan Standar McFarland 0,5 Skala Labortorium		Suspensi keruh, pembacaan Absorban pada panjang gelombang 625 adalah 0,085

### Kurva Standar Bakteri

Kurva standar bakteri merupakan suatu kurva untuk menghitung jumlah sel bakteri secara tidak langsung, dengan cara meregresikan nilai absorbansi dan jumlah koloni kedalam persamaan garis kurva standar  $y = ax + b$ , dimana  $y$  = jumlah koloni, dan  $x$  = besarnya nilai absorbansi. Setiap mikroorganisme bakteri memiliki kurva standar pertumbuhan bakteri [2]. Pada metode perhitungan jumlah sel bakteri *Escherichia coli* dan

*Staphilococcus aureus* yang digunakan dalam pembuatan kurva standar pada penelitian ini, adalah dengan menggunakan metode hitungan cawan [20] dan yang kedua dengan menggunakan spektrofotometer untuk melihat tingkat kekeruhan (*Optical Density*) yang terbaca melalui nilai absorbansi yang dihasilkan [21]. Sehingga dari data (Table 4 dan 5) menghasilkan kurva standar dengan persamaan pada Gambar 1.

Tabel 4. Data kurva standar jumlah sel *Escherichia coli*

No	Pengenceran (v/v)	Absorban (OD)	Jumlah sel (CFU/ml)	Log jumlah sel (CFU/ml)
1	1:1	2,021	$3,1 \times 10^9$	9,4
2	1:2	1,493	$1,3 \times 10^9$	9,1
3	1:4	1,087	$3,1 \times 10^8$	8,4
4	1:8	0,463	$1,1 \times 10^8$	8
5	1:16	0,237	$5,6 \times 10^7$	7,7

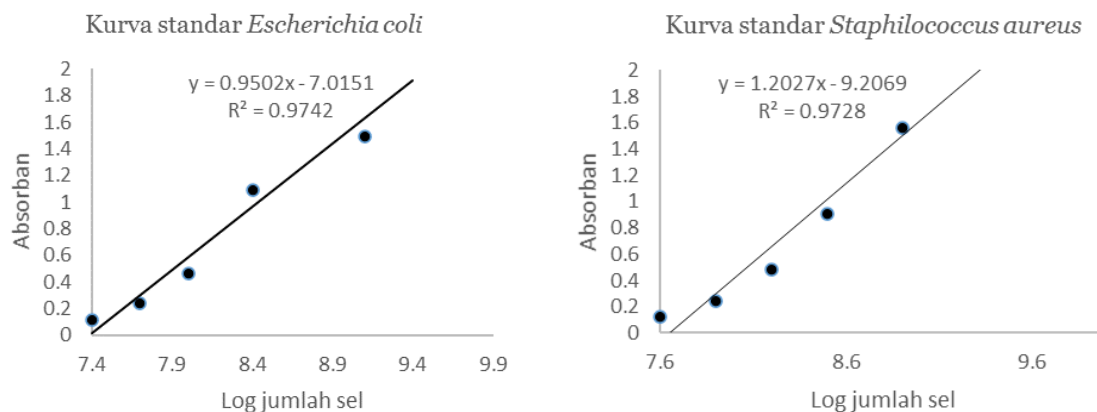
6	1:32	0,118	$2,8 \times 10^7$	7,4
---	------	-------	-------------------	-----

Tabel 5. Data kurva standar jumlah sel *Staphylococcus aureus*

No	Pengenceran (v/v)	Absorban (OD)	Jumlah sel (CFU/ml)	Log jumlah sel (CFU/ml)
1	1:1	2,173	$2,6 \times 10^9$	9,4
2	1:2	1,559	$8,1 \times 10^8$	8,9
3	1:4	0,906	$3,3 \times 10^8$	8,5
4	1:8	0,487	$1,6 \times 10^8$	8,2
5	1:16	0,246	$9,5 \times 10^7$	7,9
6	1:32	0,124	$4,5 \times 10^7$	7,6

Kurva standar bakteri uji dihitung dengan menggunakan metode turbidimetri dengan memakai alat Spektrofotometer UV-vis dan hitungan cawan. Dari data tabel 4 dan 5 diatas akan dibuat kurva standar yaitu grafik hubungan antara Absorban pada sumbu y dengan log jumlah sel bakteri pada sumbu x. Pada grafik akan

didapatkan persamaan regresi linier yang akan digunakan untuk menghitung jumlah sel bakteri pada kurva pertumbuhan bakteri. Pada gambar 1 didapatkan garis persamaan linear: *Escherichia coli*,  $y = 0,9502x - 7,0151$ ; *Staphylococcus aureus*,  $y = 1,2027x - 9,2069$

Gambar 1. Kurva standar bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

### Kurva pertumbuhan bakteri

Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang digunakan diambil masing-masing 2 ose, dimasukan dalam 25 ml media *Nutrient Broth* (NB) yang sudah disterilkan. Kemudian di inkubasi pada shaker incubator suhu 37 °C, 120 rpm selama semalaman, sehingga didapatkan kultur bakteri. Setelah itu, diukur nilai Absorbannya dengan alat Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 625 nm. Lalu dilakukan pengenceran kultur bakteri dengan larutan pengencer NaCl fisiologis dengan nilai Absorbannya 0,08–1. Setelah didapatkan kultur bakteri yang Absorbannya 0,08–0,1, kemudian kultur ini dibagi

ke dalam tabung reaksi steril sebanyak 8 tabung, masing – masing diisi 10 ml secara aseptis. Lalu di inkubasi pada shaker incubator pada suhu 37 °C, 120 rpm. Setiap 3 jam diukur nilai Absorbannya selama 24 jam.

Kurva pertumbuhan bakteri uji dihitung dengan menggunakan metode turbidimetri dengan memakai alat Spektrofotometer UV-vis. Metode turbidimetri memiliki kelebihan, yaitu cepat, tidak destruktif, dan tidak mahal [22]. Pada tabel 6 dan 7 dapat dilihat interval waktu yang digunakan untuk mengukur kurva pertumbuhan adalah setiap 3 jam selama 24 jam.

Tabel 6. jumlah sel *Escherichia coli* saat kurva pertumbuhan

No	Waktu (jam)	Absorban (OD)	Log Jumlah sel (CFU/ml)
1	0	0,094	7,4
2	3	0,510	7,9
3	6	0,703	8,1
4	9	0,964	8,4
5	12	1,073	8,5
6	15	1,391	8,8
7	18	1,881	9,4
8	21	0,968	8,4
9	24	0,862	8,3

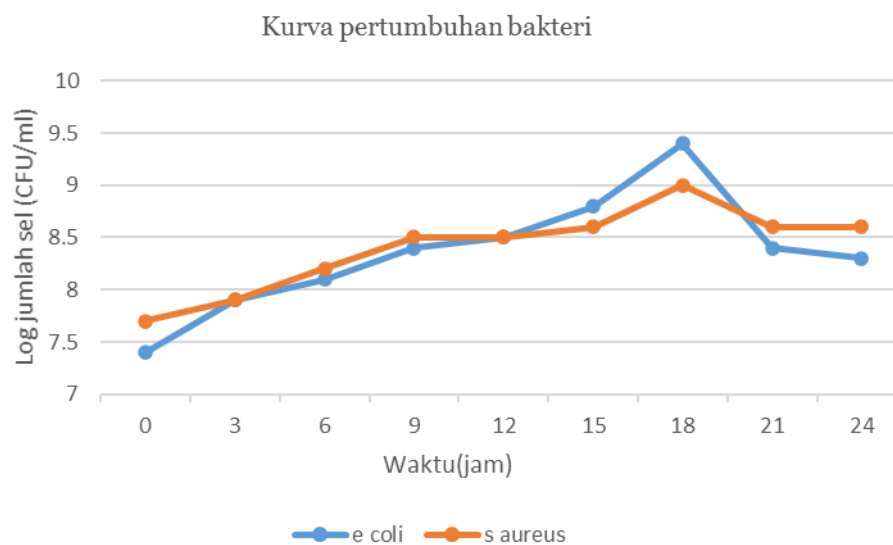
Tabel 7. Jumlah sel *Staphylococcus aureus* saat kurva pertumbuhan

No	Waktu (jam)	Absorban (OD)	Log Jumlah sel (CFU/ml)
1	0	0,090	7,7
2	3	0,344	7,9
3	6	0,596	8,2
4	9	0,988	8,5
5	12	1,038	8,5
6	15	1,1861	8,6
7	18	1,641	9
8	21	1,151	8,6
9	24	1,137	8,6

Pada Gambar 2, kurva pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dilakukan untuk mengetahui fase pertumbuhan biakan bakteri tersebut. Fase pada kurva pertumbuhan terdiri dari beberapa fase yaitu fase lag (adaptasi), fase eksponensial (fase log), fase stasioner (fase stagnan) dan fase kematian [21,23-26].

Fase lag pada *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* tidak tampak, mungkin

terjadi pada jam ke 0 hingga jam ke 3. hal ini terjadi dikarenakan bakteri tersebut tumbuh pada media yang sama dengan media pada saat pembuatan inokulum sehingga penyesuaian diri dengan lingkungan yang baru berlangsung cepat. Menurut [27-29] menyatakan bahwa Jika medium dan lingkungan pertumbuhan sama seperti medium dan lingkungan sebelumnya, mungkin tidak diperlukan waktu adaptasi.

Gambar 2. Kurva pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*



Fase log atau fase ekponensial *Escherichia coli* terjadi pada jam ke 0 hingga jam ke 18. Pada *Staphylococcus aureus*, fase log nya sama yaitu pada jam ke 0 hingga jam ke 18. fase stasioner *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* pada kurva pertumbuhan tidak tampak. Pada fase kematian *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* sama yaitu setelah jam ke 18.

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa waktu yang efektif untuk melakukan uji aktivitas antibakteri kurang dari jam ke 18, karena bakteri masih mengalami pertumbuhan yang baik [30].

### Perhitungan Jumlah Bakteri Uji

Metode yang dipakai adalah metode hitungan cawan (SPC) dengan membandingkan kekeruhan suspensi bakteri dengan larutan standar McFarland 0,5. Pada tabel 8. didapatkan

hasil yaitu jumlah sel *Escherichia coli* adalah  $1,3 \times 10^7$  CFU/ml dan jumlah sel *Staphylococcus aureus* adalah  $1,1 \times 10^7$  CFU/ml, sedangkan hasil larutan standar McFarland 0,5 pada pembacaan panjang gelombang 625 nm memberikan nilai Absorban 0,08 - 0,1 yang ekuivalen dengan jumlah bakteri  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml.

Jumlah sel bakteri uji yang digunakan tidak sama jumlahnya dengan larutan standar McFarland 0,5 ini mungkin disebabkan oleh faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri yaitu nutrisi, suhu, pH dan kelembaban [31]. *E. coli* memiliki suhu optimum 37 °C, pH optimum untuk pertumbuhannya adalah pada 7-7,5. Nilai  $A_w$  (kadar air) minimum untuk pertumbuhan *E. coli* adalah 0,96 [32] Suhu optimum untuk pertumbuhan *S. aureus* yaitu 35 °C - 40 °C [33].

Tabel 8. data jumlah sel bakteri uji

No.	Jenis Larutan	Absorban (OD)	Jumlah Sel Bakteri (CFU/ml)
1.	Standar McFarland 0,5	0,080	$1,5 \times 10^8$
2.	Suspensi <i>Escherichia coli</i>	0,098	$1,3 \times 10^7$
3.	Suspensi <i>Staphylococcus aureus</i>	0,095	$1,1 \times 10^7$

Menurut [34], pertumbuhan pada dasarnya adalah hasil metabolisme, suatu reaksi kimia terarah yang berlangsung di dalam sel yang dikatalisis oleh enzim, dengan meningkatnya suhu maka reaksi kimia akan meningkat. Peningkatan suhu menyebabkan peningkatan energi kinetik reaktan, maka peningkatan suhu akan menyebabkan peningkatan pertumbuhan hingga suatu saat peningkatan suhu tidak diikuti dengan meningkatnya pertumbuhan. Penentuan pengaruh pH awal penting untuk dilakukan karena pH awal kultur bakteri yang berpengaruh pada laju pertumbuhan spesifik.

### KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Mendapatkan hasil pembacaan nilai absorban larutan standar McFarland yang dibuat sesuai dengan nilai larutan standar McFarland kit (Himedia) yaitu 0,083. sehingga lebih ekonomis dan mudah didapat.

2. Jumlah *Escherichia coli* adalah  $1,3 \times 10^7$  CFU/ml dan jumlah sel *Staphylococcus aureus* adalah  $1,1 \times 10^7$  CFU/ml.
3. Metode spektrofotometri ini lebih mudah dikerjakan dan cepat dalam penentuan jumlah bakteri pada kurva pertumbuhan bakteri.
4. Kinerja alat spektrofotometer bagus kinerjanya, dengan memberikan hasil pembacaan nilai Absorban McFarland standar kit (Himedia) yaitu 0,08.

### REFERENSI

- [1] Wibowo, A.P.W., dan Andrivani, R. 2016. Perhitungan Jumlah Bakteri *Escherichia coli* dengan Pengolahan Citra Melalui Metode Thresholding dan Counting Morphology. *Jurnal Ilmiah Teknologi Informasi Terapan*, 2(3): 235-243.
- [2] Khoiroh, Z. 2014. Bioremediasi logam berat timbal (Pb) dalam lumpur Lapindo menggunakan campuran bakteri (*Pseudomonas pseudomallei* dan *Pseudomonas*

- aeruginosa*). Tesis. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, 41-55.
- [3] Lester, J.N., dan J.W.Birket. (1999). *Microbiology and Chemistry For Environmental Scientists and Engineers*. London: Taylor and Francis Group. Hal. 71-73.
- [4] Fitri K, S.A., Agung, M.U.K., dan Meika, J. 2015. Larutan McFarland standar digunakan sebagai referensi untuk menyesuaikan kekeruhan bakteri suspensi sehingga jumlah bakteri dalam kisaran yang diberikan untuk membakukan mikroba pengujian. *Jurnal Akuatika*, 6(2): 128-139.
- [5] Nurtjahyani, S.D., dan Shyntya, D. 2014. Efektivitas Pengenceran terhadap Pertumbuhan Koloni Mikroba pada Saus Tomat. *Jurnal Saintek*, 11(2): 65-68
- [6] Nurhayati, Samallo, I.M. 2013. Analisis Degradasi Polutan Limbah Cair Pengolahan Rajungan (*Portunus pelagicus*) Dengan Penggunaan Mikroba Komersial. *Jurnal Ilmiah Fakultas Teknik*, 9(1): 1-13.
- [7] Harijani, N., Rahadi, U.S.E., Nazar, D.S. 2013. Isolasi *Escherichia coli* pada Daging yang Diperoleh dari Beberapa Pasar Tradisional di Surabaya Selatan. *Veterinaria Medika*, 6(1): 39-44.
- [8] BHI agar. 2016. *Technical Product Information*. Notheast Laboratory Services, China. 1-3.
- [9] Lizayana, Mudatsir, Iswadi. 2016. Densitas Bakteri Pada Limbah Cair Pasar Tradisional. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Pendidikan Biologi*, 1(1): 95-106.
- [10] Sutton, S. 2011. Measurement of Microbial Cells by Optical Density. *Journal of Validation Technology*. 17: 46-49.
- [11] Haris, A., Arniati, Werorilangi, S. 2013. Uji Antibakteri Patogen Ekstrak Sponge Menggunakan Metode High Throughput Screening (HTS) dengan indikator MTT (3-[4,5-dimethylthiazol2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide). *Artikel Penelitian Unggulan*. Universitas Hasanudin, 1-14.
- [12] Hadisoetomo, R.S. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek: Teknik dan Prosedur Dasar laboratorium*. Jakarta: Gramedia.
- [13] Rizqi, H.D. 2016. Pengaruh Penambahan Bakteri Terhadap Biodegradasi Ddt Oleh *Daedalea dickinsii*. Tesis. Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya: 1-100.
- [14] Sharah, A., Karnila, R., Desmelati. 2015. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat Yang Diisolasi Dari Ikan Peda Kembang (*Rastrelliger* sp.). JOM, <https://media.neliti.com/media/publications/203144-none.pdf>. 1-19
- [15] Septiani, V., Choirunnisa, A., dan Syam, A.K. 2017. Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Karuk (*Piper sarmentosum* Roxb.) terhadap *Streptococcus mutans* dan *Candida albicans*. *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 5(1): 7-14.
- [16] Munawar, Hary, W., Elisa, N., dan Merieska, V. 2016. *Buku Penuntun Praktikum Mikrobiologi*. Indralaya : Universitas Sriwijaya.
- [17] Oktavia, N., dan Pujiyanto, S. 2018. Isolasi dan Uji Antagonisme Bakteri Endofit Tapak Dara (*Catharanthus Roseus*, L.) terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Berkala Bioteknologi*, 1(1): 1-7.
- [18] Dwidjoseputro, D. (1990). *Dasar – Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Djambatan. Hal. 187-192.
- [19] Hariyadi, R.D., dan Cynthia. 2014. Inaktivasi Bakteri Patogen Planktonik dan Biofilm oleh Sanitaiser Komersial. *Jurnal Mutu Pangan*, 1(2): 110-117.
- [20] Yunita, M., Yusuf, H., Yulianingsih, R. 2015. Analisis Kuantitatif Mikrobiologi Pada Makanan Penerbangan (*Aerofood ACS*) Garuda Indonesia Berdasarkan TPC (*Total Plate Count*) Dengan Metode *Pour Plate*. *Jurnal Keteknik Pertanian Tropis dan Biosistem*, 3(3): 237-248.

- [21] Septiani, Dewi, E.N., dan Wijayanti, I. 2017. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Lamun (*Cymodocea rotundata*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Saintek Perikanan*, 13(1): 1-6.
- [22] Iswadi. 2016. Fage Litik Spesifik *Escherichia coli* Pada Limbah Cair Pasar Tradisional di Kota Banda Aceh. *Jurnal Biotik*, 4(2): 95-99.
- [23] Wahyuningsih, N., dan Zulaika, E. 2018. Perbandingan Pertumbuhan Bakteri Selulolitik Pada Media *Nutrient Broth* dan *Carboxy Methyl Cellulose*. *Jurnal Sains dan Seni ITS*. 7(2):E36-E38.
- [24] Sutiknowati, L.I. 2016. Bioindikator Pencemar, Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Oseana*. 41(4): 63-71.
- [25] Ratnadewi, A.A.I., Alidion, M.Y., Santoso, A.B., dan Oktavianawati, I. 2017. Eksplorasi Kaldu Usus Ayam Potong Sebagai Media Pertumbuhan *Escherichia coli* BL21 pET-Endo Penghasil Enzim Endo- $\beta$ 1,4-D-Xilanase. *Jurnal Penelitian Kimia*, 13(2): 191-204.
- [26] Ristiati, N.P. 2015. Uji Bioaktivitas Forbazol E terhadap Hambatan Pertumbuhan Pada *Staphylococcus Aureus*. *Jurnal Sains dan Teknologi*, 4(1): 566-577.
- [27] Yuliana, N. 2008. Kinetika Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat Isolat T5 yang Berasal dari Tempoyak. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. 13(2):108-116.
- [28] Widiastuti., dan Fitria, A. 2008. Penetapan Kadar Besi (Fe) pada Bayam Hijau, Bayam Raja dan Bayam Duri di Pasar Mojosongo. *Jurnal Analisis Kimia*. 1(1): 31-44.
- [29] Fardiaz, S. (1993). *Analisis Mikrobiologi Pangan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor. Hal. 35-39.
- [30] Mahmudah, F.L., dan Atun, S. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak Etanol Temukunci (*Boesenbergia pandurata*) Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans*. *Jurnal Penelitian Saintek*. 22(1): 59-66.
- [31] Maftuhah, A., Bintari, S.H., dan Mustikaningtyas, D. 2015. Pengaruh Infusa Daun Beluntas (*Pluchea indica*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *Unnes Journal of Life Science* 4 (1) : 60-65
- [32] Faridz, R., Hafiluddin, dan Anshari, M. 2007. Faktor Lingkungan yang Mempengaruhi Pertumbuhan Bakteri yaitu Nutrisi, Suhu, pH dan Kelembaban. *Embryo*, 4(2): 94-106.
- [33] Pelczar, M.J., dan Chan, E.C.S. (2005). *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Press. Viii+443 hlm.
- [34] Subagiyo, Margino, S., Triyanto, Setyati, W.A. 2015. Pengaruh pH, Suhu Dan Salinitas Terhadap Pertumbuhan dan Produksi Asam Organik Bakteri Asam Laktat Yang Diisolasi Dari Intestinum Udang Penaeid. *Ilmu Kelautan*, 20(4): 187-194.