

KAJIAN UJI KONFRONTASI TERHADAP BAKTERI PATHOGEN DENGAN MENGGUNAKAN METODE SEBAR, METODE TUANG DAN METODE GORES

Study of Confrontation Test Pathogenic Bacteria Using Sowing Method, Casting Method, and Scratch Method

Seniati

Email: seniati.pasca@gmail.com

Jurusan Budidaya Perikanan, Politeknik Pertanian Negeri Pangkep
Jl. Poros Makassar-Parepare Km.83. Kec. Mandalle Kab. Pangkep 90655

Marbiah

Email: marbiah.jakariah@gmail.com

Jurusan Budidaya Perikanan, Politeknik Pertanian Negeri Pangkep
Jl. Poros Makassar-Parepare Km.83. Kec. Mandalle Kab. Pangkep 90655

Nurhayati

Email: nurhayatiahmad@ymail.com

Jurusan Budidaya Perikanan, Politeknik Pertanian Negeri Pangkep
Jl. Poros Makassar-Parepare Km.83. Kec. Mandalle Kab. Pangkep 90655

ABSTRAK

Peningkatan kualitas hasil pengujian konfrontasi terhadap bakteri pathogen maka dianggap perlu melakukan suatu penelitian di laboratorium untuk mengkaji lebih mendalam pengujian dengan metode sebar, metode tuang atau metode gores dengan menggunakan bahan serapan paper disk. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan tiga perlakuan yaitu : (A) Uji konfrontasi dengan metode tuang, (B) Uji konfrontasi dengan metode sebar dan (C) Uji konfrontasi dengan metode gores, masing-masing perlakuan dilakukan tiga kali pengulangan. Peubah yang diamati meliputi (1) Kerataan pertumbuhan bakteri pathogen di permukaan media, (2) Lama waktu mengkultur dan (3) Resiko kontaminasi dari setiap metode. Hasil penelitian menunjukkan bahwa uji konfrontasi dengan metode tuang adalah yang terbaik, dengan keunggulan sebagai berikut; permukaan bakteri lebih halus dan merata di seluruh permukaan media sehingga zona bening nampak lebih jelas dan pengukuran diameter lebih mudah, durasi waktu yang digunakan untuk mengkultur satu cawan petri lebih singkat dan resiko kontaminasinya lebih sedikit apabila dibandingkan dengan kolaborasi metode sebar dan gores. Dengan demikian metode tuang merupakan metode terbaik yang dapat diterapkan di laboratorium dalam melakukan uji konfrontasi terhadap bakteri pathogen.

Kata kunci: *uji konfrontasi; metode kultur; pathogen; paper disk.*

ABSTRACT

Improving the quality of results confrontation against pathogenic bacteria it is considered necessary conduct a study in the laboratory to study more in-depth testing of

the sowing method, casting method or scratch method using material paper disk absorption. The study used a completely randomized design with three treatments, namely: (A) Test confrontation with the casting method, (B) Test confrontation with dispersive method and (C) Test confrontation with the scratch method, each treatment was performed three repetitions. The parameters observed (1) Flatness growth of pathogenic bacteria on the surface of the media, (2) Length of time culturing and (3) The risk of contamination of each method. The results showed that the test of confrontation with the casting method is the best, with the advantages as follows; bacterial surface is more smooth and evenly across the surface of the media so that a clear zone appears clearer and easier measurement of the diameter, length of time used for culturing a petri dish shorter and less risk of contamination when compared with collaborative methods spread and scratch. Thus the casting method is the best method that can be applied in the laboratory to test the confrontation against pathogenic bacteria.

Keywords: *confrontation test; culture methods; paper disk; pathogen.*

PENDAHULUAN

Uji konfrontasi terhadap bakteri pathogen adalah salah satu persyaratan yang harus dilalui oleh suatu kandidat probiotik sebelum dinyatakan sebagai probiotik. Pengujian ini bertujuan untuk melihat kemampuan suatu mikroba dalam menghambat atau bahkan membunuh bakteri pathogen (Isnansetyo, 2005). Pelaksanaannya harus dilakukan dengan benar agar hasil yang didapatkan dapat terukur dengan jelas. Menurut Sumarsih (2011), pengujian konfrontasi terhadap bakteri pathogen dapat dilakukan dengan menggunakan metode tuang, metode sebar dan metode gores dengan bahan serapan bakteri uji berupa paper disk. Penerapan metode biasanya bergantung pada kebiasaan laboran dan ketersediaan sarana penunjang dalam laboratorium. Keberhasilan pengujian sangat bergantung penguasaan metode, lama waktu yang digunakan setiap metode serta banyak tidaknya sarana penunjang yang digunakan (Irianto, 2013).

Kekurangan dan meningkatkan kualitas hasil pengujian konfrontasi terhadap bakteri pathogen diminimalisir dengan melakukan suatu penelitian di

laboratorium. Penelitian ini untuk mengkaji lebih mendalam pengujian dengan menggunakan metode sebar, metode tuang atau metode gores dengan menggunakan bahan serapan paper disk.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan satu metode yang terbaik dalam pengujian konfrontasi terhadap bakteri pathogen dengan indikator permukaan bakteri lebih halus, zona bening nampak lebih jelas, waktu yang digunakan dalam mengkultur lebih singkat serta resiko kontaminasinya lebih sedikit. Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat bagi para analis di laboratorium dalam meningkatkan kualitas hasil pengujian konfrontasi terhadap bakteri pathogen.

METODE PENELITIAN

Lokasi dan Lama Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kesehatan Ikan Politeknik Pertanian Negeri Pangkajene dan Kepulauan selama tiga bulan.

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan adalah inkubator, oven, autoclave, laminar air

flow, peralatan penunjang berupa jarum ose, stik kaca, mikropipet, cawan petri, bunsen dan hand spray. Bahan yang digunakan adalah bakteri patogen (*Aeromonas hydrophyla*), bakteri uji (probiotik hasil isolasi penelitian Hasniar (HS9), kapas, alkohol, akuades, media TSA dan TSB dan paper disk.

Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan tiga perlakuan yaitu: (A) Uji konfrontasi dengan metode tuang, (B) Uji konfrontasi dengan metode sebar dan (C) Uji konfrontasi dengan metode gores, masing-masing perlakuan dilakukan tiga kali pengulangan. Peubah yang diamati meliputi (1) Kerataan pertumbuhan bakteri patogen di permukaan media, (2) Lama waktu mengkultur dan (3) Resiko kontaminasi dari setiap metode.

Persiapan Biakan

Persiapan awal adalah membuat media kultur TSB, TSA plate dan TSA miring. Bakteri patogen (*Aeromonas hydrophyla*) dan bakteri uji diremajakan pada media TSB masing-masing 10 ml selama 24 jam sambil dishaker sesuai petunjuk Bibiana (2010). Pertumbuhan bakteri ditandai dengan keruhnya media tumbuh. Selanjutnya semua biakan dibuat dalam konsentrasi inokulum 10^7 dan siap untuk diujikan.

Pengujian konfrontasi terhadap bakteri patogen

a. Metode Tuang

Biakan *Aeromonas hydrophyla* diambil sebanyak 1 ml dan dituang ke dalam cawan petri kosong, lalu

dituangkan media TSA yang bersuhu ± 50 °C kurang lebih 15 ml. Cawan petri diputar ke arah kanan sebanyak 5-7 kali dan ke kiri 5-7 kali pula. Media dibiarkan mengeras, selanjutnya paper disk ditetesi dengan bakteri uji. Biarkan meresap lalu angkat dan masukkan ke dalam cawan petri yang telah berisi inokulum patogen. Lakukan pengulangan tiga kali. Cawan disegel dengan isolasi farafilm. Diinkubasi dalam inkubator selama 24 – 48 jam dengan posisi terbalik. Metode tuang mengacu pada penuntun praktikum oleh Sumanti (2008).

b. Metode Sebar

Siapkan media TSA plate, sebanyak 0,1 ml bakteri *Aeromonas hydrophyla* dikultur pada permukaan media dengan metode sebar. Gunakan stik kaca untuk penyebarannya. Selanjutnya paper disk ditetesi dengan biakan bakteri uji. Biarkan meresap lalu angkat dan masukkan ke dalam cawan petri yang telah berisi inokulum patogen. Dilakukan pengulangan tiga kali. Cawan disegel dengan farafilm kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 24 – 48 jam dengan posisi terbalik. Metode sebar mengacu pada Irianto (2007).

c. Metode gores

Siapkan media TSA plate, kultur bakteri *Aeromonas hydrophyla* di permukaan media dengan metode gores. Gunakan cotton swab untuk penyebarannya. Selanjutnya paper disk ditetesi dengan biakan bakteri uji. Biarkan meresap lalu angkat dan masukkan ke dalam cawan petri yang telah berisi inokulum patogen. Lakukan pengulangan tiga kali. Cawan disegel

dengan isolasi farafilm. Diinkubasi dalam inkubator selama 24 – 48 jam dengan posisi terbalik. Metode gores dengan cutton swab mengacu pada pengalaman selama bertugas di laboratorium.

Pengukuran Peubah

Peubah yang diamati meliputi (1) Kerataan pertumbuhan bakteri pathogen di permukaan media, (2) Lama waktu mengkultur dan (3) Resiko kontaminasi dari setiap metode.

Analisis Data

Data dianalisis secara deskripsi dengan cara membandingkan hasil analisa dari semua perlakuan, diinterpretasikan lalu disimpulkan.

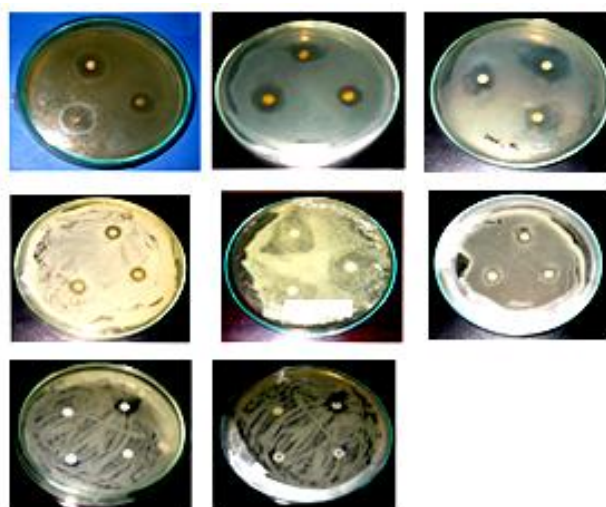
HASIL DAN PEMBAHASAN

Kerataan Pertumbuhan Bakteri Pathogen pada Permukaan Media

Hasil pengamatan dari semua perlakuan didapatkan kerataan pertumbuhan bakteri pada permukaan

media sangat berbeda-beda, ada yang permukaannya mulus dan menyebar dengan baik dan ada yang juga tidak menyebar dengan sempurna serta permukaannya tidak mulus. Hasil uji konfrontasi semua perlakuan ditunjukkan pada Gambar 1.

Berdasarkan hasil pengamatan terlihat bahwa perlakuan dengan metode tuang (A) memperlihatkan pertumbuhan bakteri merata di seluruh permukaan media. Terlihat lebih halus dan zona bening (daya hambat terhadap bakteri pathogen) di sekitar paper disk terlihat dengan jelas, sehingga pengukuran diameter zona bening akan lebih baik. perlakuan dengan metode sebar (B); nampak bahwa pertumbuhan bakteri tidak merata di seluruh permukaan media, beberapa bagian media nampak tidak ada bakteri yang tumbuh dan dibagian lainnya menebal sehingga zona bening bisa saja penampaknya tidak bagus. Sedangkan perlakuan dengan metode gores kelihatan pertumbuhan bakteri juga tidak merata. Bekas goresan terlihat jelas



Gambar 1. Penampakan hasil kultur pada cawan dengan metode tuang (barisan cawan paling atas), metode sebar (barisan cawan tengah), dan metode gores (barisan cawan paling bawah).

sehingga permukaan media kelihatan kurang baik, penampakan zona bening juga akan kurang baik.

Lama Waktu Mengkultur

Waktu yang dibutuhkan untuk mengkultur dari setiap perlakuan berbeda-beda. Pengukuran waktu berdasar pada proses mulai mengkultur biakan pada satu cawan petri hingga selesai. Hasil pengamatan ditunjukkan pada Tabel 1. Penggunaan metode tuang membutuhkan waktu $\pm 3,08$ menit untuk mengkultur pada satu cawan petri, sedangkan penggunaan metode gores membutuhkan waktu $\pm 3,69$ menit, dan penggunaan metode sebar membutuhkan waktu terlama yaitu $\pm 4,09$ menit sehingga apabila seorang analis yang melakukan uji konfrontasi di laboratorium dengan menggunakan metode tuang maka dalam satu jam akan mengkultur ± 20 cawan, dengan menggunakan metode gores akan mengkultur ± 16 cawan sedangkan dengan menggunakan metode sebar akan

mengkultur ± 14 cawan. Semakin sedikit waktu yang digunakan untuk mengkultur pada satu cawan petri maka semakin banyak jumlah petri yang dapat dikultur dalam satu jam, sehingga proses penelitian skala besar akan lebih cepat selesai dengan menggunakan metode tuang. Proses kultur yang terlalu lama akan memungkinkan konsentrasi teknisi berkurang karena kelelahan sehingga akan berdampak pada resiko kontaminasi atau hasil kultur yang kurang baik. Penggunaan metode sebar membutuhkan waktu terlama dalam mengkultur satu cawan petri, apabila dikaitkan dengan pengamatan kerataan permukaan bakteri, nampak bahwa ada hubungan korelasi antara keduanya. Semakin lama waktu yang digunakan untuk mengkultur satu cawan petri maka kerataan hasil kultur semakin berkurang.

Resiko kontaminasi

Kontaminasi merupakan salah satu faktor yang sangat menentukan keberhasilan pengujian. Banyak hal yang

Tabel 1. Durasi waktu mengkultur untuk satu cawan petri

No	Perlakuan	Ulangan (menit)						Rata-rata
		1	2	3	4	5	6	
1	A. Metode tuang	3,20	3,05	3,01	3,00	3,12	3,08	3,08
2	B. Metode sebar	4,24	4,38	4,17	3,55	4,00	4,01	4,09
3	C. Metode gores	3,52	4,07	3,49	3,44	3,57	4,04	3,69

Tabel 2. Hasil pengamatan kontaminasi dari perbedaan penguasaan metode dan durasi waktu mengkultur.

Perlakuan	Peralatan penunjang	Parameter Peubah		
		Penguasaan metode (%)	Durasi waktu (menit)	Kontaminasi (%)
A. Metode tuang	Mikropipet, tip	80	3,08	0,00
B. Metode sebar	Mikropipet, tip, stik kaca	71,67	3,98	1,67
C. Metode gores	Cutton swab	78,33	3,69	1,67

dapat menimbulkan kontaminasi, diantaranya adalah penguasaan metode, peralatan dan lama waktu yang digunakan. Hasil analisa dari enam praktikan yang melakukan ketiga perlakuan diperoleh rata-rata yang ditunjukkan pada Tabel 2.

Hasil analisa secara deskriptik data pada Tabel 2, dinyatakan bahwa penguasaan metode dan durasi waktu berpengaruh terhadap kontaminasi hasil kultur. Semakin menguasai teknik/metode maka semakin kecil peluang terjadinya kontaminasi. Begitu pula halnya dengan waktu, semakin lama waktu yang digunakan untuk mengkultur pada satu cawan petri maka semakin tinggi peluang terjadinya kontaminasi. Hal serupa juga disampaikan oleh Waluyo (2007) bahwa semakin kecil waktu yang digunakan dalam mengkultur bakteri maka semakin kecil munculnya resiko kontaminasi. Penggunaan metode tuang memiliki nilai penguasaan metode yang tertinggi serta durasi waktu yang terendah, dan nilai kontaminasi dinyatakan nol (tidak terkontaminasi).

Hal lain yang menjadi faktor resiko kontaminasi adalah peralatan penunjang yang digunakan. Semakin banyak jenis peralatan penunjang yang digunakan memberi peluang terjadinya kontaminasi (Arifanto, 2008). Penerapan metode sebar menggunakan mikropipet, tip dan stik kaca, resiko kontaminasi berada pada saat pengambilan biakan dan sterilisasi stik kaca yang mungkin tidak maksimal. Metode gores memberi peluang kontaminasi pada saat mencelupkan cutton swab di media kultur, sehingga membutuhkan kehati-hatian saat melakukan kegiatan ini. Lain

halnya dengan metode tuang, kegiatan ini lebih simpel, sekali pengambilan sampel dengan menggunakan mikropipet lalu dituang ke semua semua cawan petri, selanjutnya dituangkan media bersuhu suam-suam kuku ke dalam masing-masing cawan sebanyak ± 15 ml. Penggunaan mikropipet boleh dibilang hanya sekali sehingga mengurangi resiko kontaminasi.

KESIMPULAN

Pengujian konfrontasi terhadap bakteri pathogen dengan menggunakan metode tuang merupakan metode terbaik apabila dibandingkan dengan metode sebar dan metode gores. Keunggulan metode tuang adalah hasil kultur menunjukkan permukaan bakteri lebih halus dan merata di seluruh permukaan media sehingga zona bening nampak lebih jelas, dan pengukuran diameter akan lebih mudah, durasi waktu yang digunakan untuk mengkultur satu cawan petri lebih singkat dan resiko kontaminasinya lebih sedikit. Dengan demikian metode tuang merupakan metode terbaik yang dapat diterapkan di laboratorium dalam melakukan uji konfrontasi terhadap bakteri pathogen.

DAFTAR PUSTAKA

- Arifanto. 2008. Menghitung Mikroba pada Bahan Makanan. Farmasi FMIPA. ITB. Bandung.
- Bibiana. 2010. Analisis Mikroba di Laboratorium. PT. Raya Grafindo Persada. Jakarta.
- Irianto, K. 2007. Mikrobiologi Umum. CV Yrama Widya. Bandung.
- Irianto, K. 2013. Mikrobiologi Jilid I. Yrama Widya. Bandung.

- Isnansetyo, A. 2005. Bakteri Antagonis Sebagai Probiotik untuk Pengendalian Hayati pada Akuakultur. *Jurnal Perikanan*: Vol. VII(I): 1-10.
- Sumanti. 2008. Penuntun Praktikum Mikrobiologi Pangan. Universitas Padjajaran. Jatinangor.
- Sumarsih. 2011. Mikrobiologi Umum. UI Press. Jakarta.
- Waluyo, L. 2007. Mikrobiologi Umum. UPT Penerbitan UMM. Malang.