

PRINSIP DASAR TEORI MENGHITUNG MIKROORGANISME PADA CAWAN (BAGIAN 2)

Kisaran hitung

Seperti yang sampai saat ini diketahui (dan telah dijelaskan di depan) bahwa kisaran yang paling tepat dalam menghitung koloni pada cawan adalah 30-300 koloni/cawan atau 25-250 koloni/cawan. Permulaan penentuan kisaran ini berawal dari seorang mikrobiolog bernama Nersser (1895) yang menyimpulkan bahwa hitungan cawan yang paling baik adalah cawan yang memiliki 10.000 koloni/cawan yang perhitungannya dilakukan dengan mikroskop pada perbesaran rendah. Tiga tahun kemudian muncul pernyataan bahwa cawan yang mempunyai koloni lebih dari 100 koloni/cawan sebaiknya diabaikan. Selanjutnya pada tahun 1897, Hill menyarankan untuk tidak menghitung cawan yang terlalu banyak jumlah koloninya (*overcrowded*) karena tidak memberikan hasil yang sesuai dengan kenyataan. Kemudian tahun 1908, orang yang sama menyimpulkan tentang kisaran hitung 40-200 koloni/cawan yang digunakan sebagai landasan pelaporan. Kisaran ini diterima pada Comitee Standard Method of Bacteriology Water Analysis (1915) dan diubah menjadi 30-200 koloni/cawan.





Pencetus kisaran hitung 25-250 koloni/cawan dikemukakan oleh Breed dan Dotterer pada tahun 1916 yang mempublikasikan dalam seminarnya mengenai topik ini. Mereka menentukan kisaran ini berdasarkan alasan supaya hasil perhitungannya tidak menimbulkan kesalahan statistik yang serius. Mereka juga mencatat bahwa jenis bakteri dapat mempengaruhi ukuran koloni dan jumlah koloni yang tumbuh pada cawan. Selain itu komposisi nutrisi dan jarak antar koloni juga mempengaruhi jumlah koloni per cawan karena koloni tetangga mungkin dapat menghambat pertumbuhan atau menstimulus koloni didekatnya (seperti *B. bulgaricus* yang distimulus oleh adanya molds). Breed dan Dotterer memakai tiga kali plating tiap pengenceran (*triplicate plating*) dalam percobaannya dan memilih cawan yang masuk kisaran dari tiap pengenceran. Pada analisa ini cawan yang memiliki jumlah koloni <30 dan >400 dianggap tidak memenuhi syarat, sedangkan cawan yang memenuhi syarat itu sendiri berjumlah antara 50 dan 200 koloni/cawan. Pencetus lainnya adalah Tomasiewicz (1980) yang menyimpulkan bahwa kisaran hitung untuk *plate count* dengan ulangan 3 kali (*triplicate*) yaitu 25-250 koloni/cawan. Kesimpulan ini didapat dari data analisa susu (*raw milk*) pada tiga eksperimen yang berbeda (Sutton, 2006).

USP (*United States Pharmacopoeial*) merekomendasikan untuk menggunakan kisaran hitung antara 25 dan 250 koloni/cawan untuk bakteri pada umumnya dan *Candida albicans*. Sedangkan kisaran yang disarankan jika menganalisa jumlah *Aspergillus niger* adalah 8-80 koloni/cawan. ASTM (*American Standard Testing and Methods*, 1998) menyarankan untuk menggunakan kisaran hitung 20-80 koloni/membran jika menggunakan teknik filtrasi membran, 20-200 koloni/cawan untuk *spread plate* dan 30-300 koloni/cawan untuk *pour plate*. FDA BAM (*Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual*, 1998) merekomendasikan 25-250 koloni/cawan sebagai kisaran hitung secara keseluruhan.

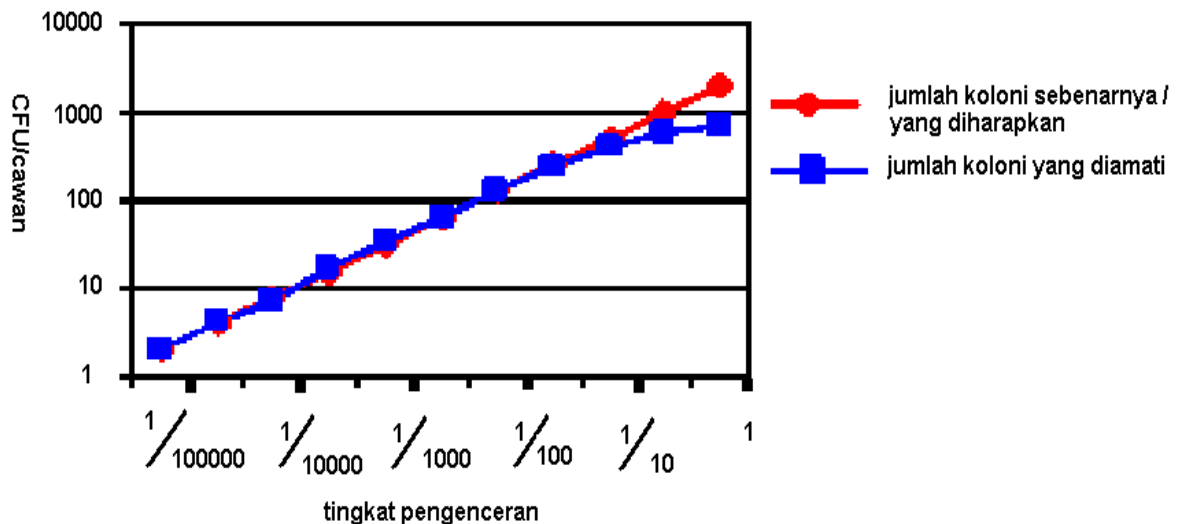
Batas atas kisaran hitung.

Istilah untuk menggambarkan jumlah koloni yang melebihi batas atas kisaran hitung adalah TNTC (*Too Numerous To Count*). ASTM menyarankan untuk melaporkan TNTC

sebagai lebih besar dari batas atas, misalnya >200 CFU pada cawan dari pengenceran 1/10, maka pelaporannya adalah >2000 CFU/ml(g). Penjelasan logika mengenai alasan adanya batas atas kisaran hitung dapat diperhatikan pada gambar berikut.

	jumlah koloni yang teramati	jumlah koloni sebenarnya / yang diharapkan
1/10000	 5	5
1/1000	 60	60
1/100	 531	542
1/10	 620	5400

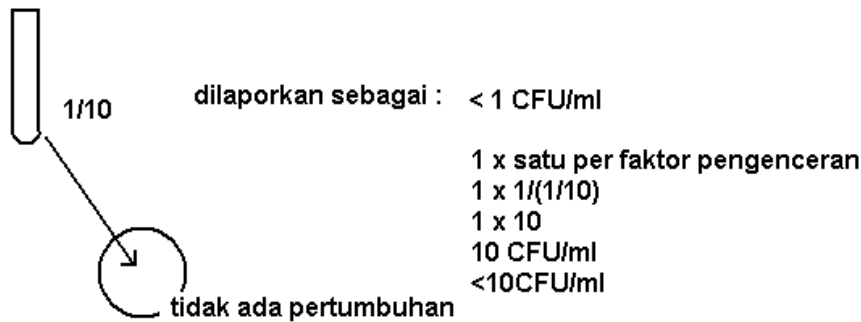
Kenapa pada pengenceran 1/10 jumlah koloni yang diamati lebih kecil dari pada jumlah koloni yang sebenarnya dalam satuan volum yang sama?. Hal ini karena pertumbuhan koloni yang terlalu penuh/banyak dalam cawan dengan diameter yang sama. Seperti yang telah dikemukakan bahwa semakin banyak koloni yang tumbuh pada permukaan agar, maka antar koloni dapat saling mempengaruhi baik menekan atau menstimulus pertumbuhan koloni tetangganya dan juga perebutan nutrisi dan tempat yang semakin ketat. Oleh karena itulah banyak koloni yang “hilang” sehingga menampilkan pengurangan koloni yang muncul pada cawan. Alasan inilah yang membatasi kisaran hitung pada 250 atau 300 koloni.



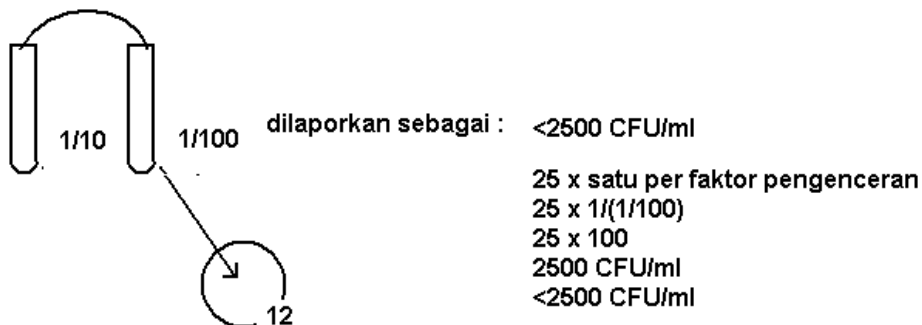
Batas bawah kisaran hitung.

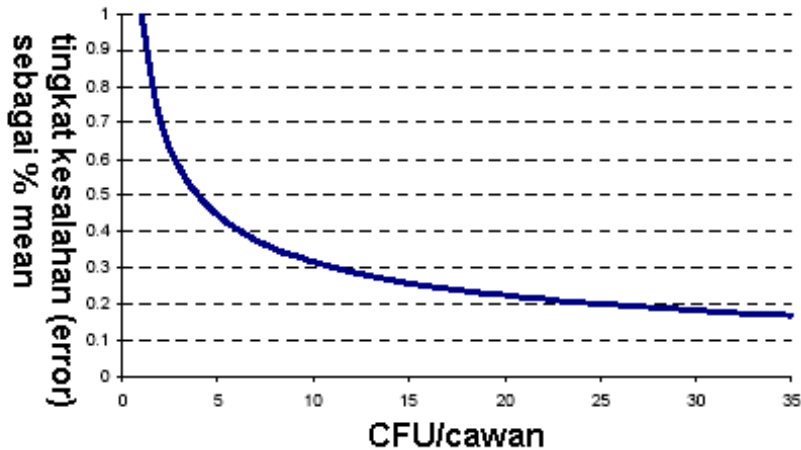
Titik konsentrasi pada batas bawah kisaran hitung ini berada pada pelaporan *Limit of detection* / LOD (1 CFU) dan *Limit of Quantification* / LOQ (<25 CFU atau <30 CFU). LOD adalah jumlah minimum koloni yang dapat dibedakan dari ketidakhadiran. Sedangkan LOQ adalah suatu batas jumlah koloni yang cukup/pantas untuk dapat dihitung dengan tingkat presisi dan akurasi yang dapat diterima. Di dalam teknik plate count secara sederhana dapat dijelaskan sebagai berikut: LOD menggambarkan ada atau tidak adanya sel mikroorganisme dalam suatu sampel, tapi pada konsentrasi ini, sampel sangat mungkin mengandung kontaminan (ketidakmurnian) dan terdapat separuh kemungkinan untuk bernilai nol dan separuh kemungkinan untuk bernilai 1. sedangkan LOQ menggambarkan batas yang memberikan kemungkinan minimal untuk salah memperkirakan jumlah sel yang sebenarnya dalam suatu sampel (Sutton, 2006). Jika jumlah koloni >LOD dan <LOQ maka densitas sel sebenarnya mungkin dapat dihitung dengan baik tapi masih sangat besar peluangnya untuk salah menghitung jumlah sel yang sebenarnya. Jumlah koloni yang baik seharusnya >LOQ dan >LOD.

Hal ini sangat penting jika kita menganalisa sampel dengan spesifikasi pada kisaran yang kurang dari batas bawah kisaran hitung. ASTM (1998), menyarankan supaya analisis melaporkan <1 CFU/ml jika tidak ada pertumbuhan pada cawan dalam suatu pengenceran. Misalnya <10 CFU/ml untuk pengenceran 1/10. angka <1 didapatkan dari LOD yaitu 1 CFU.



FDA BAM menyarankan jika menghitung di bawah batas bawah kisaran hitung maka dilaporkan sebagai <LOQ (25).





Jika kita melaporkan perhitungan cawan yang memiliki jumlah koloni <25, maka analisa ini mempunyai tingkat akurasi yang rendah. Secara teoretis jika jumlah koloni /cawan dibawah 25 maka kesalahan statistik yang digambarkan dalam persentase mean akan meningkat pesat karena estimasi kesalahan (*error*) adalah akar kuadrat dari mean sehingga nilai persentase mean akan seperti pada grafik diatas (grafik derajat kesalahan pada jumlah koloni yang rendah).

Cara menghitung (Bacteriological Analytical Manual, 2001)

Khusus untuk *spread plate* (*aerobic plate count*).

1. Dipilih cawan yang mempunyai koloni 25-250 koloni atau 30-300 koloni. Lalu dihitung dengan rumus :

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

ΣC = jumlah total koloni dari semua cawan yang dihitung.

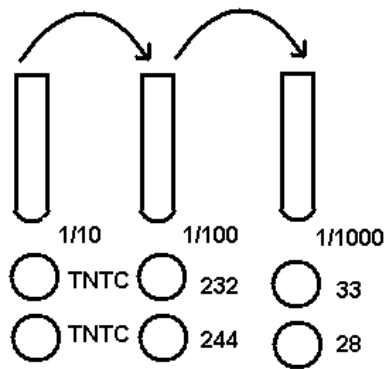
N = jumlah koloni per ml/gram

n_1 = jumlah cawan pada pengenceran pertama

n_2 = jumlah cawan pada pengenceran kedua

d = tingkat pengenceran yang diperoleh dari cawan yang pertama dihitung

Contoh 1



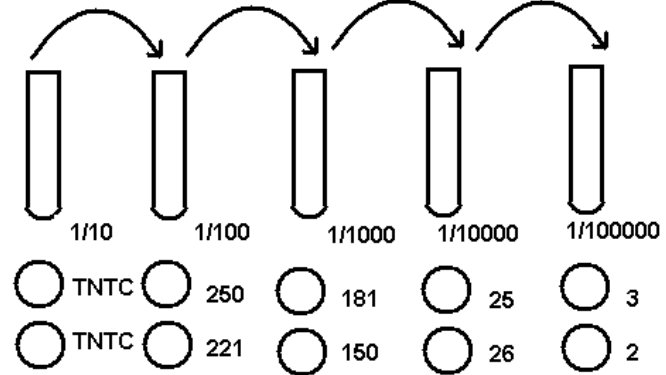
$$N = \frac{232+244+33+28}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2)] \cdot 10^2}$$

$$= \frac{537}{0,022}$$

$$= 24.409$$

$$= 24.000 \text{ CFU/ml}$$

Contoh 2



$$N = ?$$

www.ekmon-saurus.blogspot.com

Contoh 1

n1 = 2 cawan

n2 = 2 cawan

spread plate = 0,1 ml sampel

1/10	1/100	1/1000	APC/ml
TNTC	232	33	$\frac{(\sum C)}{(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times (d)}$ $((232+244+33+28) / ((1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 1/100)) \text{ CFU}/0,1\text{g}$ $(537/2,2) \times 100 \text{ CFU}/0,1\text{g}$ $244,09 \times 100 \text{ CFU}/0,1\text{g}$ $244.090 \text{ CFU}/0,1\text{g}$
TNTC	244	28	$2.440.900 \text{ CFU}/\text{g}$ $2.400.000 \text{ CFU}/\text{g}$ $2,4 \times 10^6 \text{ CFU}/\text{g}$

Pada contoh 2 ini tidak dapat dimasukkan ke dalam rumus karena terdapat kesalahan dalam teknik menganalisisnya. Pada rumus terdapat n1 dan n2. kenapa tidak ada n3? Karena setiap pengenceran diencerkan 1/10-nya sedangkan kisarannya adalah 25-250 koloni. Pada kasus diatas pada pengenceran 1/100 (250) diencerkan 1/10-nya didapat 181. seharusnya sekitar 25 koloni, sehingga tidak mungkin ada n3.

2. Jika dijumpai cawan yang memiliki koloni diluar kisaran 25-250 maka dipilih cawan yang mempunyai jumlah koloni yang paling mendekati. Jika dijumpai cawan dengan jumlah koloni <25 maka dilaporkan <25x1/d.

1/100	1/1000	EAPC/ml
18	2	<2500 CFU/ml

Jika dijumpai cawan dengan jumlah koloni >250 maka dipilih cawan yang berjumlah paling mendekati batas atas kisaran tersebut.

1/100 1/1000 EAPC/ml
 (TNTC) (640) 640.000 CFU/ml

*EAPC (*Estimated Aerobic Plate Count*) atau jumlah yang diperkirakan.

3. Koloni yang menyebar dan berukuran besar (*spreader*) pada umumnya memiliki dua sebab yang berbeda yaitu

- 1). Kumpulan dari banyak koloni yang menjadi satu pada permukaan agar yang kering,
- 2). Koloni menyebar yang timbul karena terdapat lapisan tipis air pada permukaan agar, pinggiran agar atau permukaan bagian bawah agar yang berhimpitan dengan cawan.

Semua cawan yang memiliki pertumbuhan koloni yang menyebar di permukaan agar >25% dari luas cawan atau >50% dari luas cawan dilaporkan sebagai koloni menyebar (*spreader/ SPR*). Sedangkan koloni *spreader* yang tidak melebihi 25% luas cawan dihitung satu koloni dan jika koloni *spreader* tersebut (terutama karena sebab pertama) masih dapat dibedakan antar koloninya maka dihitung jumlah koloni yang membentuknya. Perhitungan koloni *spreader* ini dapat dikombinasikan dengan perhitungan koloni normal lainnya.

4. Semua cawan yang memiliki koloni rata-rata >100CFU/cm² dilaporkan dengan > 100 x luas cawan x tingkat pengenceran tertinggi.

Misal didapat rata-rata 110 CFU/cm²

1/100	1/1000	EAPC/ml	Keterangan
TNTC	7.150 a	>6.500.000 CFU/ml	a, Menggunakan cawan dengan luas 65 cm ²
TNTC	6.490 b	>5.900.000 CFU/ml	b, Menggunakan cawan dengan luas 59 cm ²

misalnya didapat rata-rata
110CFU/cm²

1/100 1/1000 EAPC/ml
 TNTC 7.150^a >6.500.000
 TNTC 6.490^b >5.900.000

$$a = 110 \times 65 \text{ cm}^2 \times 1000$$

$$= 7.150.000$$

tapi dilaporkan >6.500.000

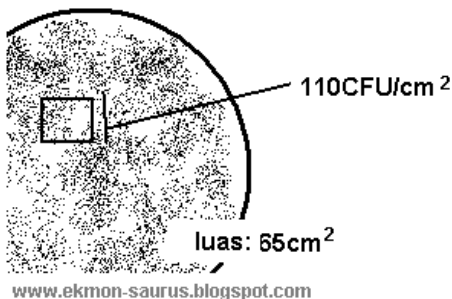
digunakan cawan dengan luas area 65cm²

$$b = 110 \times 59 \text{ cm}^2 \times 1000$$

$$= 6.490.000$$

tapi dilaporkan >5.900.000

digunakan cawan dengan luas area 59cm²



Tata cara diatas digunakan khusus untuk *plate count* dengan teknik *spread plate* atau yang disebut *Aerobic Plate Count*. Untuk teknik plating dengan *pour plate* atau filtrasi

membran pada dasarnya prinsip-prinsip mengenai perhitungannya adalah sama, hanya disesuaikan dengan kisaran hitung yang telah dipersyaratkan.

Pembulatan dan merata-ratakan.

Pembulatan diperlukan jika dijumpai hasil perhitungan dengan tiga digit angka signifikan. Menurut USP dan ASTM, pembulatan dibulatkan keatas jika digit ketiga adalah ≥ 5 dan pembulatan dibulatkan ke bawah jika digit ketiga adalah < 5 . sedangkan menurut BAM dibulatkan ke atas jika digit ketiga ≥ 6 (6,7,8,9) dan dibulatkan ke bawah jika ≤ 4 (4,3,2,1). Bila digit ketiga adalah 5 maka dibulatkan ke atas jika digit kedua adalah ganjil dan dibulatkan ke bawah jika digit kedua adalah genap.

USP dan ASTM		BAM			
dari	menjadi	dari	menjadi	dari	menjadi
13900	14000	13900	14000	12900	13000
13800	14000	13800	14000	12800	13000
13700	14000	13700	14000	12700	13000
13600	14000	13600	14000	12600	13000
13500	14000	13500	14000	12500	12000
13400	13000	13400	13000	12400	12000
13300	13000	13300	13000	12300	12000
13200	13000	13200	13000	12200	12000
13100	13000	13100	13000	12100	12000

↓ ganjil
↓ genap

www.ekmoh-saurus.blogspot.com

E. Indra Pradhika, 2009

Referensi :

Anonim. Dilution Theory and Problems. <http://www.bio.fsu.edu/courses/mcb4403L/dilution.pdf>. diakses pada 2 Oktober 2009

Anonim. Dilution and Spread Plate Technique (For obtaining isolated cultures and estimating cell number in a sample) <http://a-s.clayton.edu/furlong/BIOL3250>. diakses pada 2 Oktober 2009

Beishir, Lois. 1991. Microbiology in Practice : A Self Instructional Laboratory Course. Harper Collins Publisher Inc., New York.

Capuccino, J. G. and Natalie S. 2000. Microbiology A Laboratory Manual. Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., Menis Park, California.

Cowhx, N. D., dan M. D. Morisetti. 1969. Microbiological Techniques - Some Statistical Aspects. National College of Food Technology, Surrey. Joint Symposium on Bacterial Standards, Food and Microbiology Groups.

Maturin, Larry and J. T. Peeler. 2001. Aerobic Plate Count. BAM (Bacteriological Analytical Manual), Chapter 3. Food and Drug Administration.

- Niemi, R. M. dan S. I Niemelä. 2001. Measurements Uncertainty in Microbiological Cultivation Methods. Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement, Springer Berlin Vol 6. No 8 372-375.
- Robert J. Blodgett. 2007. Mathematical Treatment of Plates With Colony Counts Outside The Acceptable Range. Journal of Food Microbiology, Vol 25, June 2008, 633.
- Sutton, Scott. 2006 Counting Colonies. [http://www. microbiol.org/white. papers/ WP.count . colony.htm](http://www.microbiol.org/white_papers/WP.count_colony.htm). diakses pada 2 Oktober 2009.
- Sutton, Scott. 2006. Harmonization of The Microbiological Limit Test – Enumeration. <http://www.microbiol.org/white.papers/WP.count.colony.htm>. diakses pada 2 Oktober 2009
- Plate Counting Methods. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC526601/> diakses pada 2 Oktober 2009
- Tortora, G.J., B.R. Funkee and C.L. Case. Microbiology An Introduction. Addison Wesley Longman Inc., New York.