



# CARA CEPAT (PANDUAN) PRAKTIK DASAR PENGUJIAN MIKROBIOLOGI

EDISI PERTAMA

Sumartini, M.Sc  
Devi Wulansari, M.Si  
Susi Ratnaningtyas, M.Si  
Rika Sebtiana Kristantri, M.Si.  
Putri Wening Ratrinia, M.Si  
Azmi Nur Fauzia

AMaFRaD  PRESS



**CARA CEPAT (PANDUAN) PRAKTIK DASAR  
PENGUJIAN MIKROBIOLOGI**

©Hak cipta dilindungi Undang-undang nomor 28 Tahun 2014  
All Rights Reserved

# **CARA CEPAT (PANDUAN) PRAKTIK DASAR PENGUJIAN MIKROBIOLOGI**

Penulis :

Sumartini, M.Sc

Devi Wulansari, M.Sc

Susi Ratnanigtyas, M.Si

Rika Sebtiana Kristantri, M.Si

Putri Wening Rattrinia, M.Si

Azmi Nur Fauzia

AMaFRaD  PRESS

# CARA CEPAT (PANDUAN) PRAKTIK DASAR PENGUJIAN MIKROBIOLOGI

Penulis :

Sumartini, M.Sc

Devi Wulansari, M.Sc

Susi Ratnanigtyas, M.Si

Rika Sebtiana Kristantri, M.Si

Putri Wening Ratrinia, M.Si

Azmi Nur Fauzia

Editor :

Ir. Pujoyuwono Martosuyono, M.Si

Desain Cover dan Tata Letak sampul:

Sumartini, M.Sc

Halaman:

xiii + 102 halaman

Edisi/Cetakan :

Cetakan pertama, 2023

Diterbitkan oleh :

AMAFRAD Press-Badan Penyuluhan dan  
Pengembangan SDM Kelautan dan Perikanan

Gedung Mina Bahari III, Lantai 6,

Jln. Medan Merdeka Timur No. 16 – Jakarta Pusat

10110

(021) 3519070 FAKSIMILE (021) 3513287

Email: [amafradpress@gmail.com](mailto:amafradpress@gmail.com)

Nomor IKAPI: 501/DKI/2015

ISBN: 978-623-6464-76-2

e-ISBN : 978-623-6464-77-9 (PDF)

## KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim Puji syukur penulis panjatkan ke hadapan Tuhan Yang Maha Esa, Buku Cara Cepat Belajar Praktik Dasar Pengujian Mikrobiologi telah diselesaikan. Penuntun Cara cepat belajar praktik dasar pengujian mikrobiologi dengan tujuan memberikan materi dasar acuan kepada mahasiswa , akademisi, dan praktisi laboratorium serta bagi yang membutuhkan. Buku ini berisi tentang identifikasi dan pengujian mikrobiologi Disamping langkah dasar dalam mikrobiologi pada produk pangan. Buku ini juga memberikan gambaran sekilas tentang teknik dasar pengujian bakteri pembusuk dan patogen dengan berbagai metode pengujian yang terstandar. Akhirnya dengan segala kerendahan hati penyusun menyampaikan ucapan terimakasih yang sedalam dalamnya kepada pihak yang telah membantu dalam penyelesaian buku ini. Penyusun menyadari bahwa buku ini masih sangat jauh dari sempurna dan oleh karena itu segala saran dan bimbingan dari pembaca sangat diharapkan untuk penyempurnaan edisi berikutnya.

Tim Penulis

Januari, 2023



**Penulis**



## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada Ir. Pujoyuwono Martosuyono, M.Si, Dr. Ir. Nyoman Suyasa, M.S., Nur Azmi Setyawidati, S.T., M.Sc., Dr. Joni D. Haryadi, M.Sc, Dr. Heri Triyono, A.Pi, M.Kom, Dr. Maharini Yulisti, M. Si, yang telah mengoreksi dan memberikan masukan kepada tim penulis agar buku ini menjadi lebih lengkap dan penyajian materinya lebih baik.

Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Kepala BRSDMKP, Dr. I Nyoman Radiarta, M.Sc; Sekretaris BRSDMKP, Dr. Rudi Alek Wahyudi, S.Pi, M.Si;; Kapusdik KP, Dr. Bambang Suprakto, A.Pi., M.T.; Direktur Politeknik KP Dumai, Dr. Yaser Krisnafi, S.St.Pi., M.T; dan tim editor BRSDM serta semua pihak yang telah membantu dalam kelancaran penerbitan buku dimaksud.





## SINOPSIS

Buku “Cara cepat belajar praktik dasar pengujian mikrobiologi” berbasis pendekatan saintifik deskriptif dan visual ini merupakan panduan mahasiswa dan laboran mikrobiologi secara umumnya dalam melaksanakan praktikum matakuliah mikrobiologi dan diharapkan dengan adanya penuntun ini mahasiswa dan pembaca dapat lebih memahami konsep-konsep, prinsip dan teori mengenai mikrobiologi. Buku ini penulis sajikan dengan pendekatan saintifik, deskriptif dan visual. Pendekatan saintifik akan memotivasi pembaca agar terlibat aktif dalam menerapkan prosedur kerja ilmiah praktik dasar mikrobiologi. Pembaca dapat memahami konsep yang rumit, abstrak dan terlatih serta terampil dalam bekerja dengan prosedur ilmiah. Buku ini dilengkapi dengan penuntun praktikum secara visual sebagai bahan pengamatan untuk meningkatkan kemampuan diri dan disertai gambar yang mendukung teori pada materi yang akan dipraktikkan

## DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	i
UCAPAN TERIMA KASIH .....	iii
SINOPSIS.....	v
DAFTAR ISI .....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL .....	xii
BAB I PENDAHULUAN .....	1
BAB 2 Media Pembiakan Bakteri .....	2
2.1. Media Biakan Bakteri.....	2
2.2. Jenis-Jenis Media Biakan Bakteri.....	2
2.3. Cara Pembuatan Media Nutrient Agar .....	6
BAB 3 PENGECERAN SAMPEL .....	11
3.1. Pengenceran Bertingkat.....	11
3.2. Teknik pengenceran sampel .....	12
BAB 4 TEKNIK INOKULASI BAKTERI .....	15
4.1. Definisi Inokulasi bakteri .....	15
4.2. Teknik penanaman dari suspensi.....	16
4.3. Pembuatan Agar Miring .....	19
BAB 5 UJI ANGKA LEMPENG TOTAL (TOTAL PLATE COUNT).....	21
5.1. Definisi Pengujian <i>Total Plate Count</i> .....	21
5.2. Prosedur Pengujian TPC dengan metode agar tuang (Pour plate).....	22
5.3. Prosedur Pengujian TPC dengan metode Cawan Agar Sebar (Spread plate ).....	23
5.4. Pembacaan dan perhitungan koloni pada cawan petri .....	24
5.5. Pembacaan dan perhitungan koloni pada cawan petri/ <i>colony counter</i> .....	25
BAB 6 UJI COLIFORM .....	27
6.1. Definisi Pengujian Coliform.....	27
6.2. Tahap Presumptive Test pada pengujian <i>Coliform</i> .....	27
6.3. Tahap Confirmed Test pada pengujian Coliform .....	28
6.4. Pengujian Coliform, Coliform termotoleran (feses), dan <i>Escherichia coli</i> dengan berbagai metode .....	31
BAB 7 UJI SALMONELLA .....	33

7.1. Definisi Pengujian <i>Salmonella</i> .....	33
7.2. Homogenisasi sampel pada tahap pengujian <i>Salmonella</i> ambil sampel sesuai dengan teknik swab test.....	34
<b>BAB 8 UJI BACILLUS</b> .....	41
8.1. Definisi Pengujian <i>Bacillus</i> .....	41
8.2. Media pengujian <i>Bacillus</i> .....	42
8.3. Prosedur pengujian <i>Bacillus</i> .....	42
8.4. Identifikasi pengujian <i>Bacillus</i> .....	43
<b>BAB 9 UJI <i>Campylobacter jejuni</i></b> .....	45
9.1. Definisi Pengujian <i>Campylobacter jejuni</i> .....	45
9.2. Metode pengujian <i>Campylobacter jejuni</i> dengan metode Kultur langsung .....	46
9.3. Metode pengujian <i>Campylobacter jejuni</i> dengan metode Kultur pengayaan.....	47
9.4. Metode pengujian <i>Campylobacter jejuni</i> dengan metode Kultur pengayaan untuk isolasi sel yang cedera .....	48
9.5. <i>Clostridium perfringens</i> dan <i>clostridia</i> pereduksi sulfid lainnya ....	49
<b>BAB 10 UJI <i>E-Coli</i></b> .....	53
10.1. Definisi pengujian <i>E-Coli</i> .....	53
10.2. Metode pengujian <i>E-Coli</i> .....	53
<b>BAB 11 UJI <i>Vibrio cholerae</i></b> .....	59
11.1. Definisi pengujian <i>Vibrio cholerae</i> .....	59
11.2. Pesiapan Pengujian <i>Vibrio cholerae</i> .....	59
11.3. Pembuatan Media Pengujian .....	61
11.4. Tahapan Pengujian Bakteri <i>Vibrio cholerae</i> .....	63
<b>BAB 12 UJI JAMUR</b> .....	77
12.1. Definisi Pengujian Jamur.....	77
12.2. Prosedur Pengujian Jamur .....	77
12.3. Pengujian Jamur metode cawan agar tuang (Pour plate method).....	79
12.4. Metode cawan agar sebar ( <i>Spread plate method</i> ).....	79
12.5. Perhitungan koloni.....	80
12.6. Pelaporan hasil pengujian.....	80
<b>BAB 13 IDENTIFIKASI JAMUR</b> .....	82
<b>BAB 14 UJI <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....	85
14.1. Definisi Pengujian <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	85
14.2. Persiapan Pengujian <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	87

14.3. Pembuatan Media Pengujian .....	87
14.4. Preparasi Sampel .....	87
14.5. Tahapan Pengujian .....	87
<b>BAB 15 Pewarnaan Mikroba.....</b>	<b>95</b>
15.1 Bentuk Sel Bakteri.....	95
15.2 Pewarnaan Badan Inklusi .....	99
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>102</b>
<b>GLOSARIUM .....</b>	<b>106</b>
<b>PROFIL PENULIS .....</b>	<b>108</b>

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1 Bentuk media agar dan cair	2
Gambar 2 Media agar basal	3
Gambar 3 Media differensial	3
Gambar 4 Media selektif	4
Gambar 5 Media <i>enrichment</i>	4
Gambar 6 Media uji	5
Gambar 7 Skema pembuatan media biakan bakteri	6
Gambar 8 Pembuatan nutrisi agar tahap 1	7
Gambar 9 Pembuatan larutan media tahap 2	7
Gambar 10 Pembuatan larutan media tahap 3	8
Gambar 11 Pembuatan larutan media PCA	8
Gambar 12 Pembuatan larutan pengencer BPW	9
Gambar 13 Proses pembuatan larutan BGLB	9
Gambar 14 Larutan BGLB	10
Gambar 15 Pengenceran sampel	12
Gambar 16 Tahap-tahap proses pengenceran pada pengenceran pertama dan pengenceran selanjutnya berdasarkan interpretasi dari ISO 6887-1 (1999)	13
Gambar 17 Perbedaan perlakuan pengambilan homogenat pada pengenceran pertama untuk ditanam atau diencerkan lebih lanjut	14
Gambar 18 Perbedaan hasil pemisahan koloni bakteri pada perlakuan pengenceran	14
Gambar 19 Prosedur sterilisasi jarum ose	15
Gambar 20 Teknik inokulasi bakteri	16
Gambar 21 Teknik inokulasi bakteri dan contoh koloni	16
Gambar 22 Teknik inokulasi bakteri	17
Gambar 23 Metode agar tuang	17
Gambar 24 Penampakan koloni metode <i>spread</i> dan <i>pour plate</i>	18
Gambar 25 Penampakan koloni metode gores kuadran	19
Gambar 26 Penampakan koloni metode agar miring	19
Gambar 27 Sinopsis pengujian <i>Total Plate Count</i> (TPC)	21
Gambar 28 Dokumentasi tahapan pengujian TPC	23
Gambar 29 Pengujian TPC ( <i>Spread plate</i> )	24

Gambar 30	Pengujian TPC tahap presumptive test	27
Gambar 31	Pengujian TPC tahap confirmed test	28
Gambar 32	Tahapan pengujian <i>Salmonella</i>	33
Gambar 33	Tahapan homogenisasi dan pre-enrichment	34
Gambar 34	Tahap enrichment	34
Gambar 35	Tahap inkubasi bakteri	36
Gambar 36	Dokumentasi pengujian <i>Salmonella</i>	38
Gambar 37	Pembuatan larutan lactose broth pada pengujian <i>Salmonella</i>	39
Gambar 38	Pembuatan larutan tetrathionate broth pada pengujian <i>Salmonella</i>	39
Gambar 39	Koloni bakteri <i>Clostridium perfringens</i>	49
Gambar 40	Uji pendugaan pengujian <i>E-Coli</i>	55
Gambar 41	Uji penegasan pengujian <i>E-Coli</i>	57
Gambar 42	Dokumentasi Pengujian <i>E-Coli</i>	58
Gambar 43	Media TCBS untuk Isolasi Bakteri <i>Vibrio cholerae</i>	65
Gambar 44	Uji Biokimia	66
Gambar 45	Pengujian Oksidase	67
Gambar 46	Hasil Uji TSIA	68
Gambar 47	Hasil Uji Oksidasi Fermentatif	70
Gambar 48	Hasil Uji Hidrolisis Urea	71
Gambar 49	Hasil Uji Arginin, Lysine, dan Ornithyn	72
Gambar 50	Hasil Toleransi Garam	73
Gambar 51	Uji Pertumbuhan 42 °C	74
Gambar 52	Hasil Uji VP	75
Gambar 53	Hasil Uji Fermentasi Karbohidrat	75
Gambar 54	Isolasi sampel pada pengujian jamur	81
Gambar 55	Koloni jamur setelah diinkubasi	81
Gambar 56	Pembuatan <i>Slide Culture</i>	83
Gambar 57	Hasil pengamatan maksroskopis (koloni) dan mikroskopis kapang genus <i>Eupenicillium</i>	84
Gambar 58	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> memproduksi Pigmen Pioverdin yang memberikan warna kehijauan pada agar dan pigmen piosianin yang berwarna kebiru-biruan	86
Gambar 59	Koloni <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada media <i>Blood Agar Plate</i>	86
Gambar 60	Pertumbuhan bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada media <i>Pseudomonas Agar Base</i>	88

Gambar 61	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> dengan Pengecatan Gram	89
Gambar 62	Hasil Negatif Uji Indol pada mEdia SIM	90
Gambar 63	Motilitas Bakteri pada media SIM	90
Gambar 64	Hasil Uji pada Media MR-VP	91
Gambar 65	Hasil Uji pada Media Simon's Citrat	91
Gambar 66	Hasil Uji pada Media TSIA	92
Gambar 67	Bentuk-bentuk Sel Bakteri	95
Gambar 68	Flagela pada Bakteri	99
Gambar 69	Hasil Pewarnaan Gram	101



## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1 Tabel MPN seri tiga tabung	29
Tabel 2 MPN seri lima tabung	30
Tabel 3 Kultur kontrol pengujian <i>Bacillus</i>	42
Tabel 4 Identifikasi galur keracunan makanan <i>Bacillus</i> spp	43
Tabel 5 Kultur kontrol Pengujian <i>Campylobacter jejuni</i>	45
Tabel 6 Diferensiasi <i>Campylobacter</i> spp	46
Tabel 7 Kontrol kultur pengujian <i>Clostridium</i>	50
Tabel 8 Alat Penunjang Pengujian <i>Vibrio cholerae</i> dan Fungsinya	60
Tabel 9 Bahan Pengujian <i>Vibrio cholerae</i> dan Fungsinya	61
Tabel 10 Interpretasi Uji Media TSIA	92
Tabel 11 Komposisi Zat Pewarna Flagela Bakteri	97
Tabel 12 Contoh Bakteri dan Tipe Flagela Bakteri	98

# BAB 1

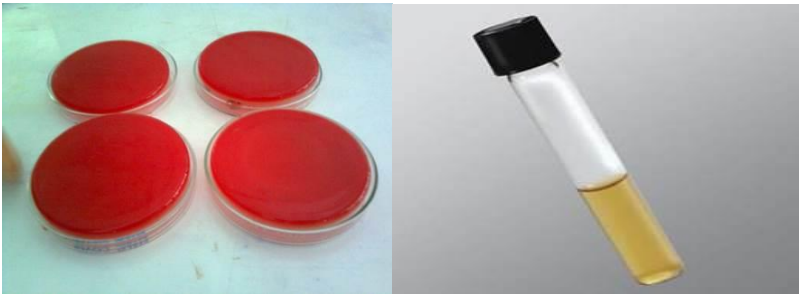
## PENDAHULUAN

Pangan merupakan salah satu kebutuhan pokok dalam kehidupan manusia, karena pangan menyediakan zat-zat gizi penting bagi tubuh manusia. Tubuh membutuhkan nutrisi untuk pertumbuhan, pemeliharaan dan regenerasi jaringan tubuh, mengatur proses tubuh dan menghasilkan energi untuk fungsi tubuh. Bahan makanan yang dibutuhkan tubuh harus sehat dan aman. Pangan atau ketahanan pangan menurut Undang-Undang Pangan Nomor 18 Tahun 2012 menyebutkan bahwa mutu pangan yang dikonsumsi harus memenuhi beberapa kriteria, seperti aman, bergizi, bermutu, dan terjangkau sesuai daya beli masyarakat. Aman artinya bebas dari pengotor biologi, mikrobiologi, kimia dan logam berat. Makanan adalah segala sesuatu yang berasal dari sumber biologis dan air, baik yang diolah maupun tidak diolah, yang ditujukan untuk konsumsi manusia. Mikroorganisme dalam industri makanan dapat bermanfaat dan juga merugikan.

Salah satu penyebab keracunan pangan adalah kontaminasi mikrobiologi. Penyakit ini merupakan penyebab utama kematian pada anak-anak dan orang dewasa. Penyakit menular atau penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme seperti bakteri merupakan penyakit yang umum terjadi di masyarakat. Dalam industri pangan, analisis mikrobiologi merupakan jaminan yang sangat penting terhadap keamanan pangan yang diproduksi. Analisis mikrobiologi diharapkan dapat membantu industri meningkatkan kualitas dan keamanan pangan baik pada saat pengolahan maupun pada akhir produksi. Selain itu, analisis mikrobiologi juga diperlukan untuk mengendalikan kualitas pangan yang ada di pasaran.

### 2.1. Media Biakan Bakteri

Media adalah bahan yang terdiri dari campuran nutrisi yang digunakan untuk pertumbuhan mikroba. Berbagai media dapat digunakan untuk isolasi, perbanyakan, pengujian sifat fisiologis dan pencacahan mikroba, serta pengangkutan sampel dari satu tempat ke tempat lain untuk studi mikrobiologi. Mikroorganisme memanfaatkan nutrisi dalam bentuk molekul kecil yang dirangkai membentuk komponen seluler. Dalam penelitian mikrobiologi, media penting untuk memungkinkan mikroba hidup dan menentukan bahwa mikroba yang diteliti benar-benar mikroba yang dicari atau diharapkan.

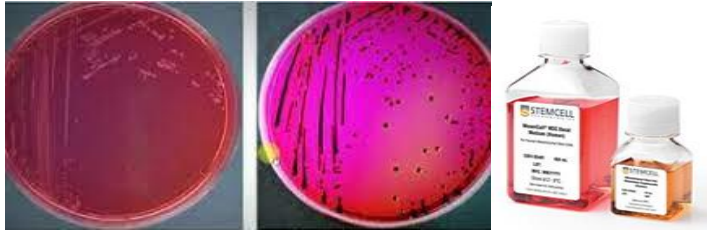


**Gambar 1.** Bentuk media agar dan cair

Sumber: <https://fk.uui.ac.id/mikrobiologi/materi/media/>

### 2.2. Jenis-Jenis Media Biakan Bakteri

**Media Basal** (media dasar) adalah media yang digunakan sebagai bahan dasar untuk membuat media lain yang lebih kompleks. Media ini dapat mendukung pertumbuhan hampir semua jenis mikrobia, contohnya adalah *nutrient broth*, kaldu pepton, dsb.



**Gambar 2.** Media agar basal

Sumber: <https://www.youtube.com/watch?v=suNU9xEHoDs>

**Media diferensial** adalah suatu lingkungan di mana, ketika berbagai mikroba tumbuh, mikroba-mikroba tersebut tumbuh dengan ciri-ciri khusus sehingga mereka dapat dibedakan. Misalnya: Triple Sugar Iron Agar (TSIA), Sufite-Indole Mobility Media (SIM) dan Differential Media adalah media yang ditambahkan bahan kimia atau reagen tertentu yang menyebabkan perubahan tertentu pada mikroba yang sedang tumbuh sehingga dapat dibedakan dengan jenis lainnya.



**Gambar 3.** Media differensial

Sumber: <https://www.youtube.com/watch?app=desktop&v=teq9zCfJal>

**Media selektif** adalah media yang memungkinkan satu jenis mikroba tumbuh dengan cepat sekaligus menghambat jenis mikroba lainnya. Misalnya: *Salmonella Shigella Agar (SSA)*, *Thiosulfate Citrate Bile Salt (TCBS)*, dll. Media selektif adalah media yang telah ditambahkan bahan tertentu yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba yang tidak

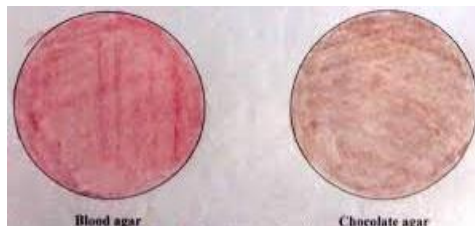
diinginkan dalam sampel. Inhibitor yang digunakan adalah antibiotik, garam dan bahan kimia lainnya.



**Gambar 4.** Media selektif

Sumber: <https://www.microbeholic.com/2022/09/komposisi-dan-cara-pembuatan-medium-salmonella-shigella-agar.html>

**Media diperkaya (enrichment)** adalah media yang dirancang untuk mendukung pertumbuhan mikroorganisme. Media ini mengandung nutrisi yang mendorong pertumbuhan mikroba tertentu. Misalnya: kaldu selenite atau kaldu tetratronat untuk isolasi *Salmonella typhosa* dari feses. Dan media yang diperkaya dengan tambahan beberapa bahan untuk merangsang pertumbuhan mikroba yang diinginkan. Hal ini dilakukan untuk merangsang pertumbuhan mikroba kecil dalam campuran mikroba yang berbeda, seperti media coklat dan ekstrak ragi agar kalium nitrat.



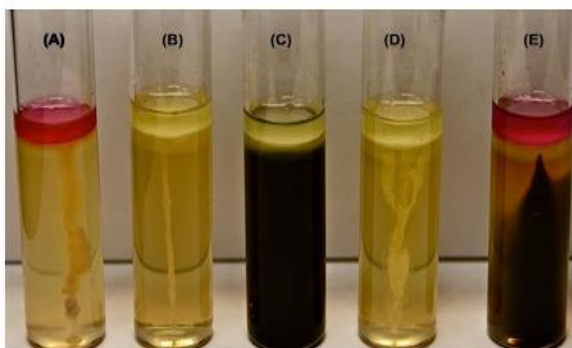
**Gambar 5.** Media *enrichment*

Sumber:

<https://www.medicofem.com/index.php/microbiology/microbiology-practical-aspects/culture-media/>

**Media uji (identifikasi)** adalah Media uji (identifier) adalah media yang digunakan untuk mendeteksi mikroba, media uji biasanya dilengkapi dengan zat-zat tertentu yang berfungsi sebagai indikator, misalnya media universal, bahan tambahan yang dirancang untuk merangsang pertumbuhan mikroba secara umum.

### SIM Medium (H<sub>2</sub>S, Indole, Motility) Test



**Gambar 6.** Media uji

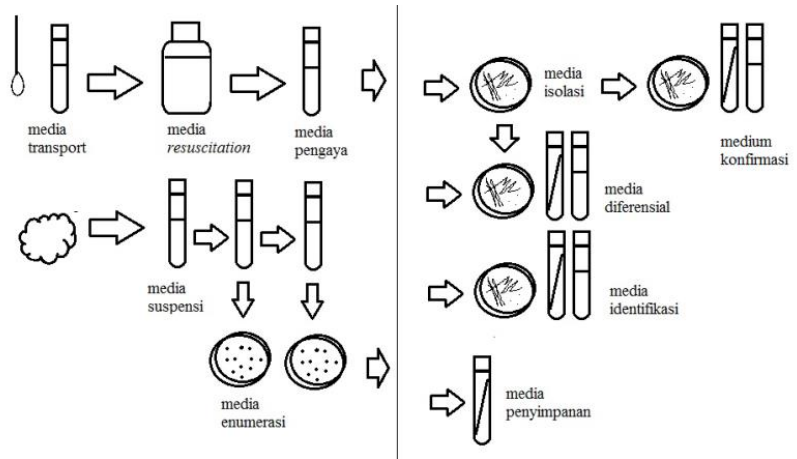
Sumber: <https://pdfcoffee.com/download/media-sulfide-indole-motilitydocx-pdf-free.html>

**Medium umum**, media yang bahan-bahannya ditambahkan untuk merangsang pertumbuhan mikroba secara umum. Contohnya adalah nutrition agar (NA) untuk merangsang pertumbuhan bakteri, potato dextrose agar (PDA) untuk merangsang pertumbuhan jamur.

**Medium khusus (spesifik)**, merupakan lingkungan yang digunakan untuk mengetahui jenis pertumbuhan mikroba dan kemampuannya melakukan perubahan kimia tertentu, misalnya lingkungan molase *Saccharomyces cerevisiae*.

**Medium penguji (Assay medium)**, yaitu media suatu senyawa tertentu yang digunakan untuk menguji senyawa tertentu dengan

menggunakan bakteri, seperti media untuk menguji vitamin, antibiotik, dan lain-lain.



**Gambar 7.** Jenis-jenis media biakan bakteri

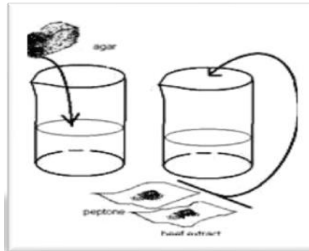
Sumber: <https://laboratoriumstandard.com/2020/04/05/jenis-jenis-media-pertumbuhan/>

### 2.3. Cara Pembuatan Media Nutrient Agar

Tahapan pembuatan media nutrient agar terdiri atas penimbangan bahan, pelarutan dan sterilisasi media. Komposisi media terdiri dari beef extract, peptone, agar dan pelarut akuades. Bahan-bahan tersebut ditimbang sesuai dengan ketentuan kemudian dilarutkan dengan akuadest. Larutan media yang sudah terbentuk kemudian disterilkan menggunakan autoclave.

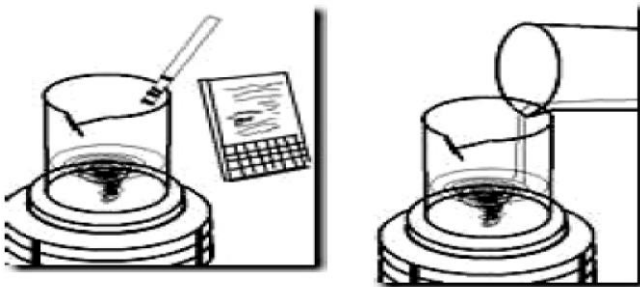
Langkah kerja dalam membuat media nutrient agar adalah sebagai berikut.

- a) Timbang komponen medium dengan menggunakan timbangan analitis untuk volume yang diinginkan sesuai dengan komposisi berikut:
  - Beef extract 3 g
  - Peptone 5 g
  - Agar 15 g
  - Akuades s.d 1000 ml



**Gambar 8.** Pembuatan nutrisi agar tahap 1  
 Sumber: Murtius (2018)

- b) 100 ml air suling dibagi menjadi dua bagian, satu bagian untuk melarutkan kaldu sapi dan pepton dan satu lagi untuk melarutkan agar-agar. Sebaiknya gunakan air untuk mengencerkannya agar tersisa lebih banyak
- c) Larutkan bagian agar-agar dalam air sambil diaduk dan dipanaskan secara konstan. Anda bisa menggunakan kompor gas atau stand mixer (jangan terlalu panas atau busa akan mengembang dan tumpah).



**Gambar 9.** Pembuatan larutan media tahap 2  
 Sumber: Murtius (2018)

- b) Sedangkan sebagian air sulingnya digunakan untuk melarutkan pepton dan daging sapi hanya dengan diaduk.
- c) Setelah keduanya larut, larutan dituangkan ke dalam larutan agar dan diaduk hingga homogen. PH medium kemudian diukur dengan



mencelupkan kertas indikator pH. Jika pH tidak netral dapat ditambahkan HCl/NaOH.

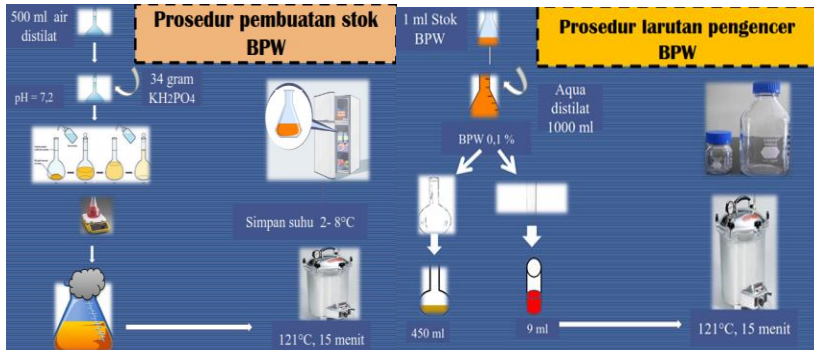
- d) Setelah itu media dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer dan disterilkan dalam autoklaf.
- e) Tuang media steril ke dalam cawan petri steril secara aseptik. Jika ingin bahannya vertikal atau miring pada langkah ke 5, bahan langsung dituangkan ke dalam tabung lalu disterilkan.



**Gambar 10.** Pembuatan larutan media tahap 3  
Sumber: Murtius (2018)



**Gambar 11.** Pembuatan larutan media PCA  
Sumber: Sumartini (2022)



**Gambar 12.** Pembuatan larutan pengencer BPW  
Sumber: Sumartini (2022)



**Gambar 13.** Proses pembuatan larutan BGLB  
Sumber: Sumartini (2022)

Homogenisasi adalah proses atau proses yang digunakan untuk menghomogenisasi suatu campuran. Homogenisasi juga bisa disebut pencampuran beberapa zat sejenis sehingga membentuk suspensi atau emulsi. Homogenisasi dilakukan bila konsentrasi suatu zat atau campuran bahan cukup tinggi untuk mencegah kondisi pencampuran yang seragam.

Alat yang digunakan untuk mendeteksi bakteri koliform (gram negatif) pada air, makanan dan produk lainnya. Lingkungan ini dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan mengaktifkan pertumbuhan bakteri koliform. Ada tidaknya koliform menunjukkan

terbentuknya asam dan gas akibat fermentasi laktosa oleh koliform. Media *Brilliant Green Lactose Broth* (BGLB) khusus digunakan untuk uji MPN coliform untuk mengetahui perkiraan terdekat jumlah koliform dan koliform dalam sampel 100 mL. Tahap pengujian penguat melibatkan penggunaan media BGLB. Media ini digunakan sebagai media kultur koliform dan sebagai media selektif untuk bakteri selain koliform. Komposisi medium yang mengandung laktosa dan garam empedu dapat mengaktifkan dan mendorong pertumbuhan koliform secara optimal.



**Gambar 14.** Larutan BGLB

Sumber: Sumartini (2022)

### 3.1. Pengenceran Bertingkat

Pengenceran bertingkat adalah langkah laboratorium yang melibatkan pengenceran jumlah mikroorganisme dalam suatu sampel (jika dianggap sangat pekat) dengan perbandingan pengenceran 1:9 sehingga setiap kadarnya adalah 1/10 pengenceran. diperoleh. Proporsi lain dapat digunakan, seperti 1:2 atau 1:5. Suspensi stok/pengenceran primer adalah suspensi, larutan atau emulsi yang diperoleh setelah menimbang atau mengukur sejumlah produk sebelum pengujian (atau sampel produk).). Ini dicampur dengan pengencer sembilan kali lipat sehingga partikel besar dapat diendapkan. Sedangkan pengenceran bertingkat berikutnya (pengenceran desimal tambahan) adalah suspensi atau larutan yang diperoleh dengan mencampurkan sembilan kali volume terukur pengenceran pertama dan mengulangi prosedur ini dengan pengenceran desimal berikutnya hingga diperoleh pengenceran yang sesuai untuk vaksinasi.

#### **Pengenceran pertama:**

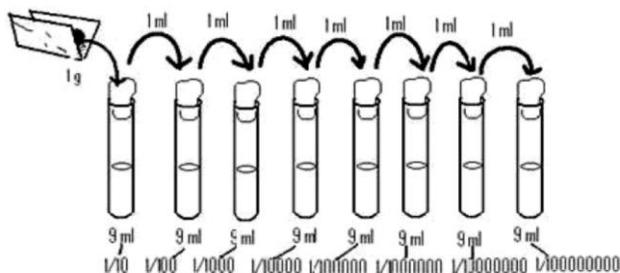
Sampel ditimbang ( $m$ ) atau dikumpulkan berdasarkan volume ( $V$ ) dalam plastik steril atau mangkuk steril dengan ketelitian  $\pm 5\%$ . Pengencer  $9 \times m$  (g) atau  $9 \times V$  (mL) ditambahkan ke sampel. Lebih dari satu pengencer dapat ditambahkan: 9 jika larutan pada pengenceran pertama masih terlalu pekat. Penambahan tersebut tentunya harus dimasukkan dalam perhitungan akhir. Selain itu, pengenceran pertama ini mempengaruhi LOD metode dan juga bergantung pada pilihan teknik inokulasi (spread plate atau pelat). Jika perlu, pengencer dapat ditambahkan sesuai kondisi 1:9 untuk meningkatkan batas deteksi. Volume pengencer yang berbeda ini harus dilaporkan dalam laporan akhir. Kerusakan mikroba akibat perubahan suhu yang tiba-tiba dapat dihindari dengan menyesuaikan suhu

pengencer dengan suhu ruangan. Partikel sampel yang besar harus dibiarkan mengendap. Jika perlu, Anda bisa menunggu hingga 15 menit.

### **Pengenceran bertingkat selanjutnya:**

Satu mL pengencer pertama dipipet (ketidakpastian pengukuran  $\pm 5\%$ ) ke dalam tabung berisi 9 mL pengencer pada suhu yang sesuai. Jika perlu, volume transfer dan volume pengenceran selanjutnya dapat ditingkatkan hingga 9 kali lipat. Pipet tidak boleh dimasukkan lebih dari 1 cm ke dalam pengencer pertama untuk mencapai akurasi optimal dan untuk menghindari kontak antara pipet yang berisi inokulum dan pengencer steril. Setelah penambahan, larutan dicampur dengan pengaduk mekanis (vortex) selama 5 sampai 10 detik hingga diperoleh pengenceran 1/100. Jika perlu, metode ini dapat diulangi hingga tingkat pengenceran yang sesuai tercapai. Waktu yang diperlukan untuk menyelesaikan penyiapan pengenceran pertama hingga inokulasi ke dalam media tidak lebih dari 45 menit. Sedangkan waktu yang disarankan untuk menyelesaikan langkah pengenceran pertama hingga akhir pengenceran multilangkah adalah 30 menit. Jika suhu lingkungan di laboratorium cukup tinggi, waktu pemrosesan harus dipersingkat (lihat Gambar 15). Batasan waktu pengenceran ini dilakukan untuk memastikan bakteri yang ada pada suspensi tidak bertambah atau berkurang.

### **3.2. Teknik pengenceran sampel**

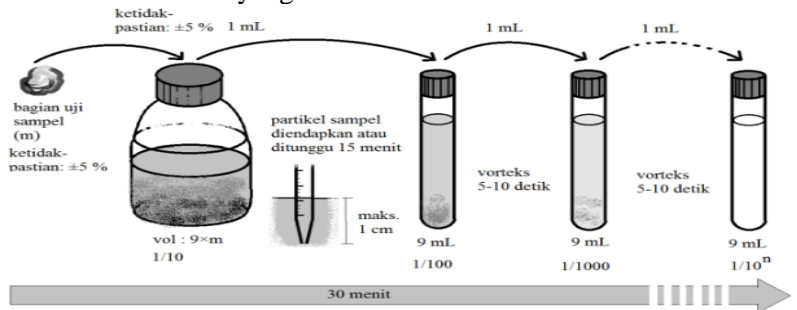


**Gambar 15.** Pengenceran sampel

Sumber: Utami *et al.*,(2018)

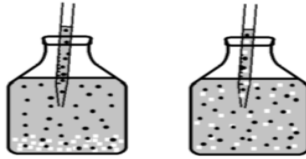
## Cara Kerja :

- a) Sampel yang mengandung bakteri dimasukkan secara aseptik ke dalam tabung pengenceran pertama ( $1/10$  atau  $10^{-1}$ ) (dari sediaan suspensi). Perbandingan massa sampel dengan volume tabung pertama adalah 1 : 9 dan ingat bahwa air suling digunakan saat menggunakan teknik pembilasan dan pembersihan yang mencakup pengencer  $10^{-1}$ .
- b) Setelah sampel dimasukkan, dilarutkan dengan cara diaduk (campuran sebenarnya dapat dilihat pada gambar sebaliknya): ambil 1 ml dari tabung  $10^{-1}$  dengan pipet ukur kemudian pindahkan ke tabung  $10^{-2}$  sekali jalan steril dan kocok. Ketukkan tabung ke telapak tangan Anda hingga halus. Proses pemindahan berlanjut hingga tabung pengenceran terakhir. Perlu diingat bahwa pipet ukur yang digunakan sebaiknya selalu diganti, yaitu menggunakan pipet ukur steril yang baru/berbeda untuk setiap kadar pengenceran. Biasanya, pipet tidak perlu diganti jika cairan dialirkan dari sumber yang sama.



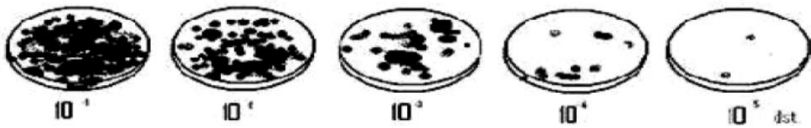
c)  
**Gambar 16.** Tahap-tahap proses pengenceran pada pengenceran pertama dan pengenceran selanjutnya berdasarkan interpretasi dari ISO 6887-1 (1999)

Sumber: <https://laboratoriumstandard.com/2019/04/12/pengenceran-bertingkat/>



**Gambar 17.** Perbedaan perlakuan pengambilan homogenat pada pengenceran pertama untuk ditanam atau diencerkan lebih lanjut

Sumber: <https://laboratoriumstandard.com/2019/04/12/pengenceran-bertingkat/>

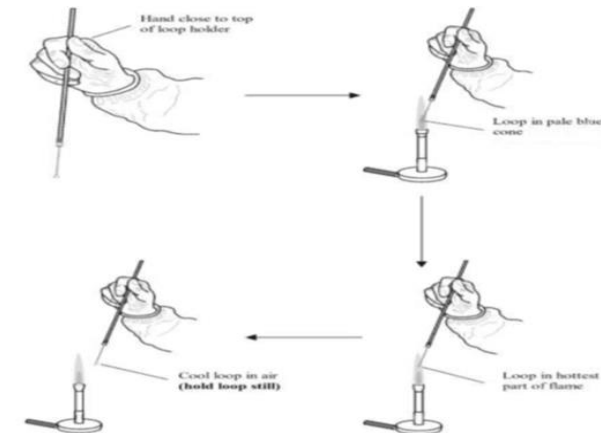


**Gambar 18.** Perbedaan hasil pemisahan koloni bakteri pada perlakuan pengenceran

Sumber: Utami *et al.*, (2018)

#### 4.1. Definisi Inokulasi bakteri

Kultur bakteri (inokulasi) merupakan pekerjaan memindahkan bakteri dari lingkungan lama ke lingkungan baru. Pekerjaan ini memerlukan ketelitian dalam kondisi steril, baik pada peralatan maupun ruangan yang digunakan untuk membiakkan bakteri di laboratorium.



**Gambar 19.** Prosedur sterilisasi jarum oose  
Sumber: Utami *et al.*,(2018)

Sebelum melakukan inokulasi, terlebih dahulu jarum oose disterilkan menggunakan sterilisasi kering, sterilisasi kering dilakukan dengan cara langsung membakar jarum oose diatas nyala bunsen untuk membunuh seluruh mikroba yang terdapat/mengkontaminasi jarum oose. Selanjutnya dapat dilanjutkan dengan menginokulasikannya pada media



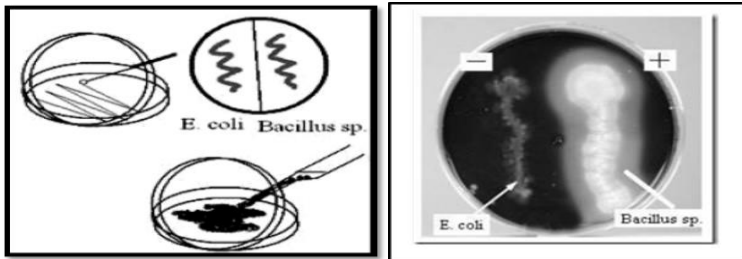
agar dengan sedikit membuka penutup media agar untuk menghindari kontaminasi dari lingkungan luar.



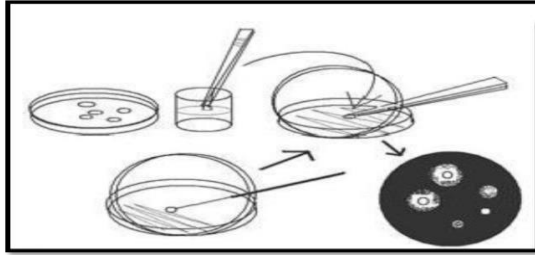
**Gambar 20.** Teknik inokulasi bakteri  
Sumber: Utami *et al.*,(2018)

#### 4.2. Teknik penanaman dari suspensi

Teknik budidaya ini merupakan kelanjutan dari pengenceran bertingkat. Sampel suspensi dapat diambil dari pengenceran apa pun, tetapi biasanya untuk isolasi (mendapatkan koloni tunggal), diambil tabung pengenceran akhir.



**Gambar 21.** Teknik inokulasi bakteri dan contoh koloni  
Sumber: Utami *et al.*,(2018)



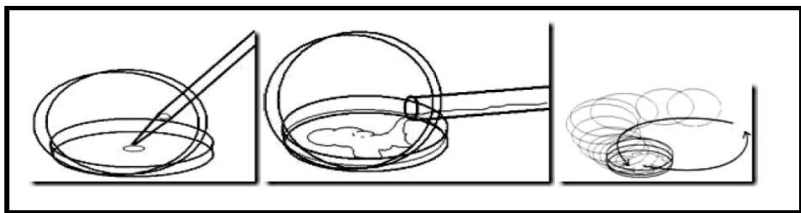
**Gambar 22.** Teknik inokulasi bakteri  
 Sumber: Utami *et al.*,(2018)

a. *Spread Plate* (agar tabur ulas)

*Spread Plate* adalah teknik kultur yang melibatkan penyebaran suspensi bakteri ke permukaan untuk mendapatkan kultur murni. Alur kerjanya dapat dilakukan sebagai berikut:

Ambil 0,1 ml suspensi cair dengan pipet ukur dan letakkan pada permukaan agar yang mengeras. Tongkat L atau tongkat obat diambil, kemudian dicelupkan ke dalam alkohol dan dibakar di atas bunsen beberapa saat, kemudian dibiarkan dingin dan tunggu beberapa detik. Batang berbentuk L digosokkan pada permukaan agar suspensi jatuh merata, pendistribusian akan lebih efektif jika cawan diputar. Intinya adalah batang berbentuk L yang terlalu panas dapat menyebabkan sel mikroba mati karena panas.

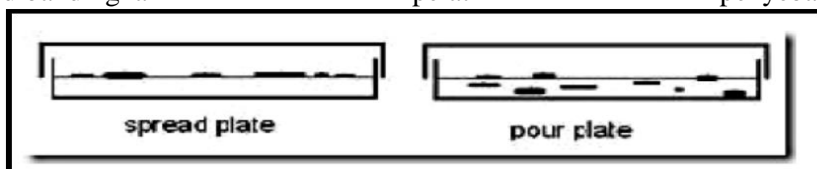
b. *Pour Plate* (agar tuang)



**Gambar 23.** Metode agar tuang  
 Sumber: Utami *et al.*,(2018)

Teknik ini memerlukan penuangan agar-agar yang tidak padat ( $>45^{\circ}\text{C}$ ) bersama dengan suspensi bakteri ke dalam cawan Petri yang diikuti dengan homogenisasi dan membiarkan agar-agar tersebut mengeras. Hal ini akan menyebarkan sel-sel bakteri tidak hanya pada permukaan agar-agar tetapi juga sel-sel yang terendam dalam agar-agar (di dalam agar-agar) sehingga ada sel-sel yang tumbuh pada permukaan agar-agar kaya  $\text{O}_2$  dan ada sel-sel yang tumbuh di dalamnya. Agar tidak mengandung banyak oksigen. Alur kerja dilakukan sebagai berikut:

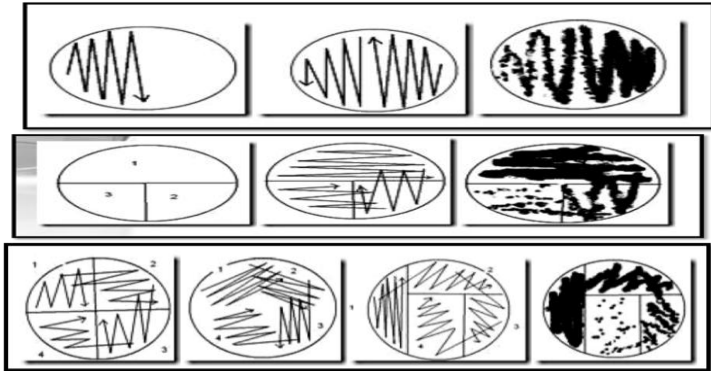
- Siapkan cawan steril, tabung pengenceran yang akan ditanam dan media padat yang masih cair ( $>45^{\circ}\text{C}$ )
- Teteskan 1 ml secara aseptis.suspensi sel kedalam cawan kosong
- Tuangkan media cair statis ke dalam gelas kimia, kemudian putar gelas kimia untuk menghomogenkan suspensi bakteri dan media, kemudian inkubasi. Alasan disisakannya 0,1ml bakteri untuk pelat penyebar dan 1ml untuk pelat penuang adalah karena pelat penyebar hanya tumbuh di permukaan, sedangkan pelat penuang memerlukan ruang pendistribusian yang lebih besar sehingga disediakan lebih banyak dibandingkan pelat penyebar.



**Gambar 24.** Penampakan koloni metode *spread* dan *pour plate*  
Sumber: Utami *et al.*,(2018)

c. Goresan Kuadran (*Streak quadrant*)

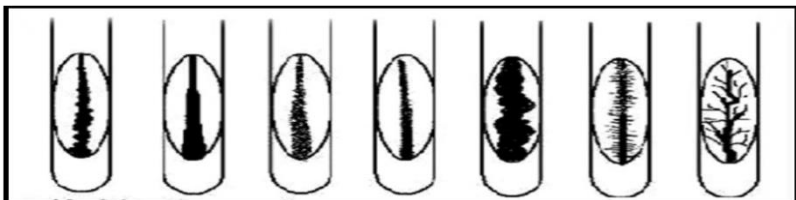
Hampir mirip dengan huruf T, namun memiliki jenis guratan yang berbeda yaitu terbagi menjadi empat. Area 1 merupakan awal awal sehingga masih banyak mengandung sel mikroba. Strip berikutnya dipotong atau disilangkan dari strip pertama sehingga jumlahnya menjadi lebih kecil dan akhirnya terpisah menjadi satu koloni.



**Gambar 25.** Penampakan koloni metode gores kuadran  
 Sumber: Utami *et al.*,(2018)

### 4.3. Pembuatan Agar Miring

Agar miring adalah media agar yang ditempatkan dalam tabung reaksi miring selama proses pendinginan. Agar miring ini merupakan cara sederhana untuk membiakkan bakteri dengan menggunakan tabung bulat dengan teknik pengikisan, sedangkan agar vertikal merupakan media agar tabung reaksi yang ditempatkan secara vertikal pada saat pendinginan, digunakan untuk stimulasi, mendukung pertumbuhan mikroorganisme pada kondisi oksigen rendah. Gunakan jarum dan pisau. Keuntungan dari lingkungan agar-agar miring ini adalah luas permukaannya kecil, sehingga risiko kontaminasi rendah dan area penggunaan strain murni dapat diperluas. Kelemahannya adalah hanya mengandung sedikit mikroorganisme.



**Gambar 26.** Penampakan koloni metode agar miring  
 Sumber: Utami *et al.*,(2018)

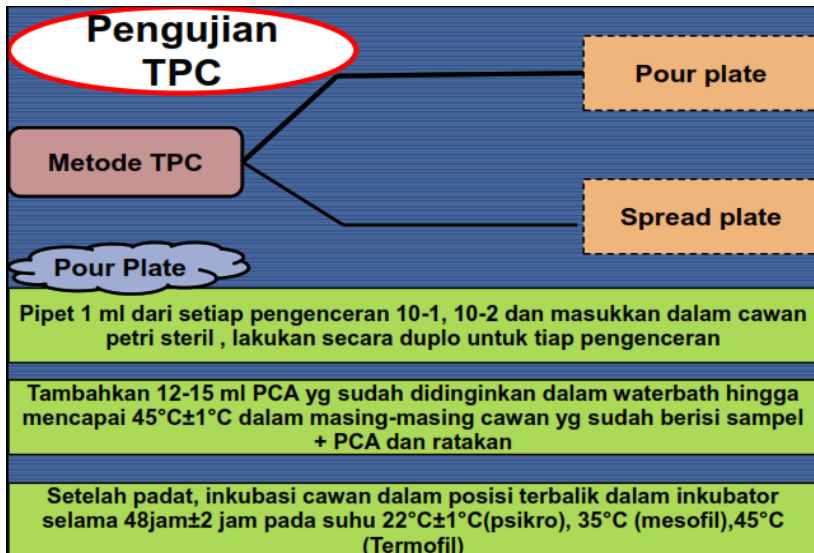


BAB  
5

UJI ANGKA LEMPENG TOTAL  
(TOTAL PLATE COUNT)

**5.1. Definisi Pengujian *Total Plate Count***

Uji Total Plate Count (TPC) dimaksudkan untuk menunjukkan jumlah bakteri yang ada pada suatu produk dengan menghitung koloni bakteri yang tumbuh pada media agar. Bakteri yang diukur dalam pengujian ini adalah bakteri total, baik bakteri pembusuk maupun bakteri patogen. Beberapa metode yang dapat digunakan untuk menguji TPC, seperti metode agar tuang (*Pour plate*), agar sebar (*Spread plate*), dan agar gores (*Streak plate*).



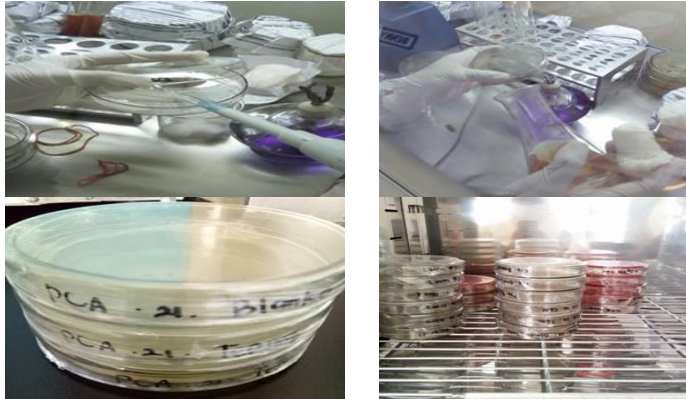
**Gambar 27.** Sinopsis pengujian *Total Plate Count* (TPC)  
Sumber: Sumartini *et al.*, (2018)

Coliform, coliform termotoleran (fecal) dan *Escherichia coli* telah lama digunakan sebagai organisme penanda (indikator dan indikator) dalam pengujian berbagai makanan. Organisme ini sensitif terhadap panas, sehingga kehadirannya dalam makanan yang diberi perlakuan panas menunjukkan kontaminasi pasca pengolahan. Kelompok coliform (*Coli-aerogenes*), yang didefinisikan sebagai anggota keluarga *Enterobacteriaceae* positif laktosa, sering digunakan oleh industri susu sebagai indikator kebersihan. Namun, kelompok ini tidak terdefinisi dengan baik dan pengujian untuk bakteri Gram-negatif yang tumbuh pada media yang mengandung garam empedu dan menghasilkan asam dari laktosa juga akan mencakup jenis bakteri yang sangat berbeda tergantung pada jenis bakteri tersebut, tergantung pada lingkungan dan kondisi inkubasi. Kriteria yang digunakan untuk membaca hasil. Mereka juga terkadang salah mengesampingkan organisme karena karakteristik biokimia yang tidak biasa atau jenis koloni yang tidak biasa. Istilah koliform fekal digunakan untuk menyebut koliform yang berasal dari feses dan koliform yang dapat tumbuh pada suhu 44°C disebut koliform fekal termotoleran. Namun, tidak semua koliform tahan panas berasal dari feses, dan tidak semua koliform tinja tahan panas. Oleh karena itu, pengujian yang menentukan keberadaan kelompok atau spesies yang terdefinisi dengan jelas jauh lebih berguna. Untuk makanan yang diolah demi alasan keamanan, pengujian terhadap seluruh kelompok *Enterobacteriaceae* merupakan pengujian pilihan namun terbatas.

## **5.2. Prosedur Pengujian TPC dengan metode agar tuang (Pour plate)**

- a. Gunakan pipet untuk mengambil 1 ml setiap pengenceran 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, dst. dan masukkan ke dalam cawan petri steril. Lakukan ini berulang kali untuk setiap pengenceran.
- b. Tambahkan 12 ml ke 15 ml PCA yang didinginkan dalam penangas air hingga mencapai suhu 45 °C ± 1 °C ke setiap gelas kimia. Untuk memastikan tercampur sepenuhnya sampel dan media PCA, putar gelas kimia maju mundur dan berdampingan.
- c. Ketika agar-agar menjadi padat, untuk mengidentifikasi mikroorganisme aerob, inkubasi pelat dalam posisi terbalik dalam inkubator selama 48 jam ± 2 jam pada suhu 22°C ± 1°C (psikofilik); 35°C (termofilik); 45°C (termofilik).

- d. Untuk mengidentifikasi mikroorganismen anaerob, inkubasi cawan dalam labu anaerobik dan masukkan ke dalam inkubator selama 48 jam  $\pm$  2 jam pada suhu  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (termofilik);  $35^{\circ}\text{C}$  (termofilik);  $45^{\circ}\text{C}$  (termofilik).



**Gambar 28 .** Dokumentasi tahapan pengujian TPC  
Sumber: Utami *et al.*,(2018)

### **5.3. Prosedur Pengujian TPC dengan metode Cawan Agar Sebar**

#### **(Spread plate )**

- Tuang 12 ml – 15 ml PCA ke dalam cawan-cawan petri steril dan dinginkan. Pipet 0,1 ml dari setiap pengenceran ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , dst) ke dalam cawan petri yang telah berisi media PCA diatas dan ratakan dengan menggunakan batang gelas bengkok. Lakukan secara duplo untuk setiap pengenceran. Masukkan semua tabung reaksi ke dalam inkubator pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam.
- Tuang 12 ml – 15 ml PCA ke dalam cawan-cawan petri steril dan dinginkan. Pipet 0,1 ml dari setiap pengenceran ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , dst) ke dalam cawan petri yang telah berisi media PCA diatas dan ratakan dengan menggunakan batang gelas bengkok. Lakukan secara duplo untuk setiap pengenceran. Masukkan semua tabung reaksi ke dalam inkubator pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam.
- Lakukan kontrol tanpa contoh dengan mencampurlarutan pengencer dengan media PCA.



**Spread Plate**

Tuang 12-15 ml PCA ke dalam cawan petri steril, dinginkan. Pipet 0,1 ml dari setiap pengenceran (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>) ke dalam cawan petri yang telah berisi media PCA diatas, ratakan menggunakan batang gelas (duplo)

Inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Setelah sampel meresap ke dalam agar (diamkan sekurang-kurangnya 1 jam). Anaerob : Inkubasi cawan dalam posisi terbalik pada anaerobik jar. Inkubasi 48 jam ± 2 jam. Lakukan kontrol tanpa sampel dengan mencampur pengencer+media PCA

<p>Koloni 25-250 N= <math>\Sigma c</math> <math>[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times (d)]</math></p>	<p>N= Jumlah koloni produk (koloni/ml/ atau kol/g)  <math>\Sigma c</math>= Jumlah koloni pada semua cawan yang dihitung  N1= Jumlah cawan pada pengenceran 1  N2= Jumlah cawan pada pengenceran 2</p>
---	---

**> 250 = TBUD**

**< 25 = jumlah koloni x 1/d**

**Gambar 29** . Pengujian TPC (*Spread plate*)  
 Sumber: Utami *et al.*,(2018)

#### 5.4. Pembacaan dan perhitungan koloni pada cawan petri

Cawan yang mengandung jumlah 25 koloni–250 koloni dan bebas spreader. Catat pengenceran yang digunakan dan hitung jumlah total koloni. Perhitungan Angka. Lempeng total sebagai berikut :

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

**dengan**

- N = jumlah koloni produk, dinyatakan dalam koloni per ml atau koloni per g;
- $\Sigma C$  = adalah jumlah koloni pada semua cawan yang dihitung;
- $n_1$  = jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung;
- $n_2$  = jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung;
- $d$  = pengenceran pertama yang dihitung.

## **5.5. Pembacaan dan perhitungan koloni pada cawan petri/ *colony counter***

Bila jumlah koloni per cawan lebih besar dari 250 pada seluruh pengenceran maka laporkan hasilnya sebagai terlalu banyak untuk dihitung (TBUD), tetapi jika salah satu pengenceran mempunyai jumlah koloni mendekati 250 laporkan sebagai perkiraan ALT. Sebagai Contoh

Pengenceran : 1 : 100 1 : 1000

Jumlah koloni : TBUD 640

Perkiraan ALT koloni per ml atau per g : 640.000

Spreader

Koloni penyebaran dibagi menjadi 3 jenis:

Rantai koloni, antara koloni yang saling berhubungan, tercipta oleh agregasi bakteri. Penyebar adalah lapisan air antara jeli dan dasar cangkir. Penyebarannya adalah lapisan air pada dinding/tepi cawan atau pada permukaan agar-agar. Jika pematangan mempunyai pertumbuhan penyebaran lebih dari 25%, laporkan sebagai penyebaran:

Penyebar tipe 1, bila hanya 1 rantai dilaporkan 1 koloni.

Jika satu atau lebih rantai tampaknya berasal dari sumber berbeda, laporkan setiap sumber sebagai 1 koloni.

Penyebar tipe 2 dan 3 seringkali berasal dari koloni yang berbeda dan melaporkannya setiap koloni sebagai 1 koloni. Jumlahkan penyebar dan koloni untuk menghitung "Angka Lempeng Total".

Jumlah koloni pada seluruh lempeng kurang dari 25 koloni atau pada lempeng tidak terdapat koloni. Jika diperoleh kurang dari 25 koloni dalam dua pengenceran yang digunakan, catat koloni yang ada tetapi nyatakan perhitungannya kurang dari 25 dan kalikan dengan 1/hari. , dimana d adalah faktor pengenceran pertama yang digunakan dan dilaporkan sebagai estimasi ALT. Misalnya

Pengenceran : 1:100 1:1000

Jumlah koloni : 18 dan 0 , 2 dan 0

Perkiraan ALT koloni per ml atau koloni per g : lebih kecil dari 2.500 lebih kecil dari 2.500.



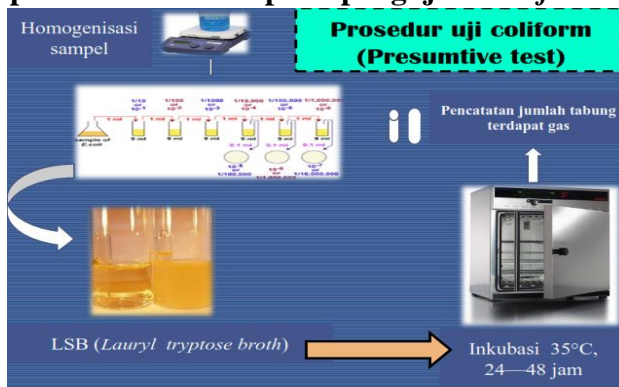
# BAB 6

# UJI COLIFORM

## 6.1. Definisi Pengujian Coliform

Pengujian bakteri koliform sering dilakukan pada badan air yang terkontaminasi karena kurang lebih 90 bakteri koliform keluar dari tubuh setiap harinya dan bakteri yang paling dominan ditemukan adalah *Escherichia coli* penyebab diare. Bakteri menunjukkan pencemaran air.

## 6.2. Tahap Presumptive Test pada pengujian *Coliform*



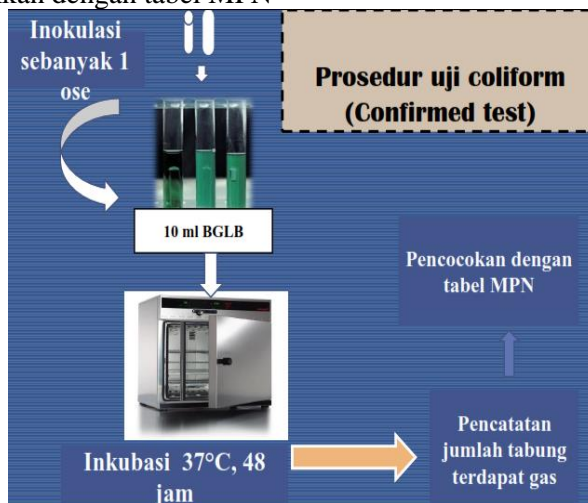
**Gambar 30** . Pengujian TPC tahap presumptive test  
Sumber: Utami *et al.*,(2018)

- Siapkan campuran sampel pada tahap homogenisasi.
- Pindahkan 1 ml larutan pengenceran 10-1 tersebut dengan pipet steril ke dalam larutan 9 ml BPW 0,1 % untuk mendapatkan pengenceran 10-2. Dengan cara yang sama seperti di atas dibuat pengenceran 10-3.
- Pipet masing – masing 1 ml dari setiap pengenceran ke dalam 3 seri

- tabung reaksi yang berisi 9 ml LSB yang didalamnya terdapat tabung durham terbalik.
- Masukkan tabung reaksi ke dalam inkubator pada suhu 35°C selama 24 - 48 jam.
  - Catat jumlah tabung yang membentuk gas pada masing-masing pengenceran. Hasil uji dinyatakan positif jika ada gas pada tabung durham tersebut.

### 6.3. Tahap Confirmed Test pada pengujian Coliform

- Inokulasikan sebanyak 1 ose dari tiap tabung yang membentuk gas pada setiap pengenceran (yang diwakili oleh 1 tabung) dan masukkan ke dalam tabung yang berisi 10 ml BGLB (Brilliant Green Lactose Bile) (masing-masing dari setiap pengenceran sebanyak 3 tabung reaksi).
- Masukkan semua tabung reaksi ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 48 jam. Adanya gas pada tabung BGLB memperkuat adanya bakteri coliform dalam sample.
- Catat jumlah tabung yang positif gas pada uji penegasan.
- Cocokkan dengan tabel MPN



**Gambar 31** . Pengujian TPC tahap confirmed test  
 Sumber: Utami *et al.*,(2018)

Penghitungan tabel MPN seritiga tabung dengan selang kepercayaan 95 % untuk kombinasi hasil positif dan tabung pengenceran yang digunakan (0,1ml;0,01ml dan 0,001ml) (BAM 2001 atau 2006) sesuai Tabel A.1 dan untuk seri lima tabung sesuai dengan Tabel A.2.

**Tabel 1.** Tabel MPN seri tiga tabung

Jumlah tabung positif (3 tabung )			MPN / g	Batas kepercayaan 95%	
0,1 g	0,01 g	0,001 g		Bawah	Atas
0	0	0	< 3,6	-	9,5
0	0	1	3	0,15	9,6
0	1	0	3	0,15	11
0	1	1	6,1	1,2	18
0	2	0	6,2	1,2	18
0	3	0	9,4	3,6	38
1	0	0	3,6	0,17	18
1	0	1	7,2	1,3	18
1	0	2	11	3,6	38
1	1	0	7,4	1,3	20
1	1	1	11	3,6	38
1	2	0	11	3,6	42
1	2	1	15	4,5	42
1	3	0	16	4,5	42
2	0	0	9,2	1,4	38
2	0	1	14	3,6	42
2	0	2	20	4,5	42
2	1	0	15	3,7	42
2	1	1	20	4,5	42
2	1	2	27	8,7	94
2	2	0	21	4,5	42
2	2	1	28	8,7	94
2	2	2	35	8,7	94
2	3	0	29	8,7	94
2	3	1	36	8,7	94
3	0	0	23	4,6	94

3	0	1	38	8,7	110
3	0	2	64	17	180
3	1	0	43	9	180
3	1	1	75	17	200
3	1	2	120	37	420
3	1	3	160	40	420
3	2	0	93	18	420
3	2	1	150	37	420
3	2	2	210	40	430
3	2	3	290	90	1.000
3	3	0	240	42	1.000
3	3	1	460	90	2.000
3	3	2	1.100	180	4.100
3	3	3	> 1.100	420	--

Sumber: Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. 8th edition, 1998

**Tabel 2 - MPN seri lima tabung**

Kombinasi/jumlah tabung yang positif	APM/100 ml	Kombinasi/jumlah tabung yang positif	APM/100 ml
0-0-1	<2	4-2-0	22
0-0-1	2	4-2-1	26
0-1-0	2	4-3-0	27
0-2-0	4	4-3-1	33
1-0-0	2	4-4-0	34
1-0-1	4	5-0-0	23
1-1-0	4	5-0-1	30
1-1-1	6	5-0-2	40
1-2-0	6	5-1-0	30
2-0-0	4	5-1-1	50
2-0-1	7	5-1-2	60
2-1-0	7	5-2-0	50
2-1-1	9	5-2-1	70

2-2-0	9	5-2-2	90
2-3-0	12	5-3-0	80
3-0-0	8	5-3-1	110
3-0-1	11	5-3-2	140
3-1-0	11	5-3-3	170
3-1-1	14	5-4-0	130
3-2-0	14	5-4-1	170
3-2-1	17	5-4-2	220
4-0-0	13	5-4-3	280
4-0-1	17	5-4-4	350
4-1-0	17	5-5-0	240
4-1-1	21	5-5-1	300
4-1-2	26	5-5-2	500
4-1-3	31	5-5-3	900
4-2-0	22	5-5-4	1600
4-2-1	26	5-5-5	1600
4-2-2	32	4-4-0	34
4-2-3	38	4-4-1	40
4-3-1	27	4-4-2	47
4-3-2	33	4-5-0	41
4-3-2	39	4-5-1	48

Sumber: Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. 8th edition, 1998

#### **6.4. Pengujian Coliform, Coliform termotoleran (feses), dan *Escherichia coli* dengan berbagai metode**

Ruang lingkup pengujian makanan segar seperti bahan salad. *Escherichia coli* berasal dari saluran pencernaan manusia dan hewan. Ini adalah entitas taksonomi jelas yang dapat digunakan sebagai penanda untuk menunjukkan bahwa kontaminasi tinja mungkin terjadi pada suatu saat selama produksi pangan. Pengujian tradisional didasarkan pada deteksi organisme yang menghasilkan indol dan gas dari laktosa pada suhu 44°C.



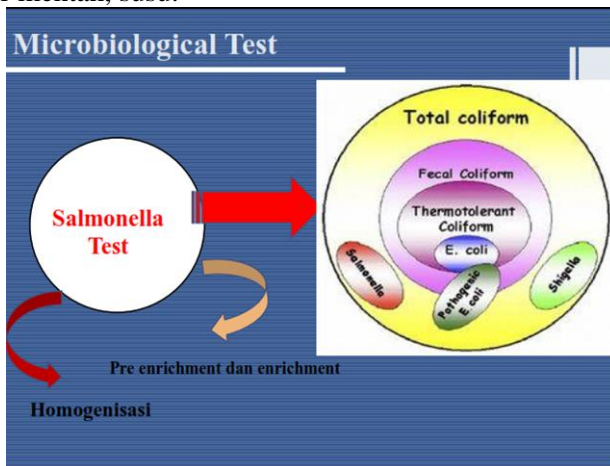
Namun, sebagian besar strain *E. coli* juga positif glukuronidase, dan metode baru-baru ini diperkenalkan untuk mendeteksi keberadaan organisme penghasil B-glucuronidase dengan membelah substrat fluoresen atau kromogenik seperti metilumbelliferil *BD*-glukuronida (*MUG*) dan 5-bromo-4-3-kloro-indolil Media *B-D*-glukuronida (*BCIG*). Strain patogen *E. Coli* seperti verocytotoxin yang memproduksi 0157 tidak disaring secara rutin tetapi hanya pada kasus makanan berisiko tinggi dan keracunan makanan.

# BAB 7

## UJI SALMONELLA

### 7.1. Definisi Pengujian *Salmonella*

*Salmonella* merupakan salah satu jenis bakteri yang dapat menimbulkan penyakit pada manusia yang biasa disebut bakteri patogen, berbentuk batang dengan dimensi 1-3,5  $\mu\text{m}$  x 0,5-0,8  $\mu\text{m}$ . Bakteri ini dapat hidup di air, es, debu, limbah, usus manusia dan hewan berdarah panas, bahkan pada makanan yang dimasak, dibekukan, atau tidak dimakan langsung. *Salmonella* masih hidup pada produk peternakan seperti daging ayam, telur mentah, susu.



**Gambar 32** . Tahapan pengujian *Salmonella*  
Sumber: Sumartini (2022)

## 7.2. Homogenisasi sampel pada tahap pengujian Salmonella

### Ambil sampel sesuai dengan teknik swab test

#### a. Sampel cair

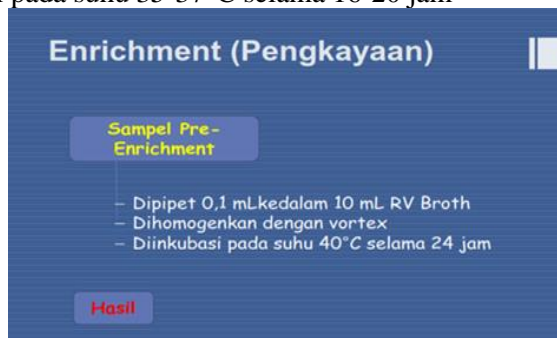
Pipet 25 ml sampel ke dalam Erlenmeyer yang berisi 250 larutan pengencer BPW (1:10). Dikocok beberapa kali hingga homogen. Dilakukan pengenceran sesuai yang diperlukan (10-1, 10-2 dan/atau 10-3)



**Gambar 33** . Tahapan homogenisasi dan pre-enrichment  
Sumber: Sumartini (2022)

#### Tahap pra pengkayaan

- Pindahkan sampel dari tahap homogenisasi ke dalam botol media 500 ml steril
- Inkubasi pada suhu 35-37°C selama 16-20 jam



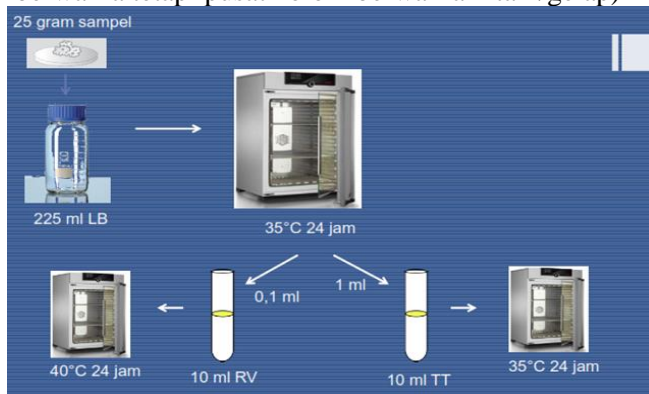
**Gambar 34** . Tahapan Enrichment  
Sumber: Sumartini (2022)

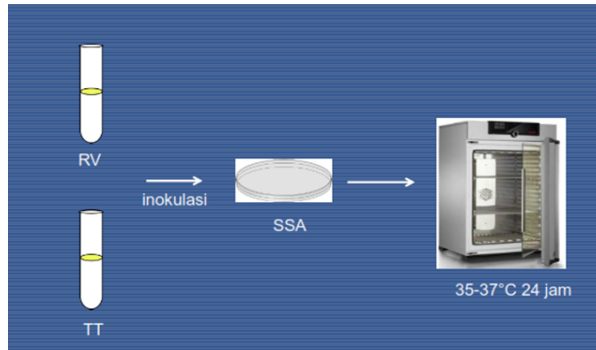
## Tahap pengkayaan

- Pipet 1 ml biakan pra-pengkayaan ke dalam 10 ml selenite cysteine broth
- Inkubasi pada suhu 35-37°C selama 24 jam
- Pipet 1 ml biakan pra-pengkayaan ke dalam 10 ml tetrathionate brilliant green broth (tetrathionate broth base)
- Inkubasi pada suhu 43°C selama 24 jam

## Penanaman pada perbenihan selektif

- Inokulasikan biakan pengkayaan kedalam media salmonella shiegella agar
- Goreskan masing-masing biakan pengkayaan dengan jarum ose (hoki glass) ke dalam cawan petri yang berisi SSA
- Inkubasi pada suhu 35-37°C selama 24 jam.
- Uji positif menunjukkan adanya koloni yang tumbuh dengan ciri-ciri tidak berwarna tetapi pusat koloni berwarna hitam/gelap)





**Gambar 35** . Tahap inkubasi bakteri  
 Sumber: Sumartini (2022)

### Uji penegasan

- a. Pilih 2-5 koloni dan goreskan pada permukaan nutrient agar dan inkubasikan pada suhu 37°C selama 20-24 jam
- b. Pindahkan koloni yang sudah diisolasi pada nutrient agar kedalam media:
  - TSI-agar  
 Goreskan koloni ke media miring TSI pada bagian miringnya dan menusuk bagian tegaknya. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam
  - Urea agar  
 Goreskan koloni pada permukaan urea agar miring. Inkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam
  - *Lysine Decarboxylation Broth*  
 Inokulasikan koloni pada LDB dan inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam
  - *Beta Galaktosidase reagent*  
 Suspensikan koloni kedalam 0,25 ml larutan saline dan tambahkan 1 tetes toluen. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Tambahkan 0,25 ml pereaksi beta galaktosidase dan dikocok. Inkubasikan kembali pada suhu 37°C selama 24 jam
  - VP Medium  
 Masukkan 1 sengkeli koloni kedalam 2 tabung reaksi yang berisi 0,2 ml media VP. Inkubasi tabung 1 pada suhu kamar sedangkan tabung 2 pada suhu 37°C selama 48 jam. Masing-masing tabung ditambah 2 tetes larutan creatine, 3 tetes larutan alphanol dan 2 tetes KOH. Lakukan pengocokan setiap penambahan pereaksi.

- *Indol Medium*

Masukkan 1 sengkeli koloni ke dalam tabung indol. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam lalu tambahkan 1 ml pereaksi indol.

**Uji Serologi (bila pada uji penegasan menunjukkan ada Salmonella)**

- Ambil 1 sengkeli biakan dari TSI-agar dan oleskan pada gelas sediaan atau tabung serologi.
- Teteskan antisera di samping biakan.
- Campur antisera dengan kultur hingga homogen
- Uji positif menunjukkan adanya koagulasi atau penggumpalan.

**Pengamatan pada uji penegasan:**

- TSI-agar

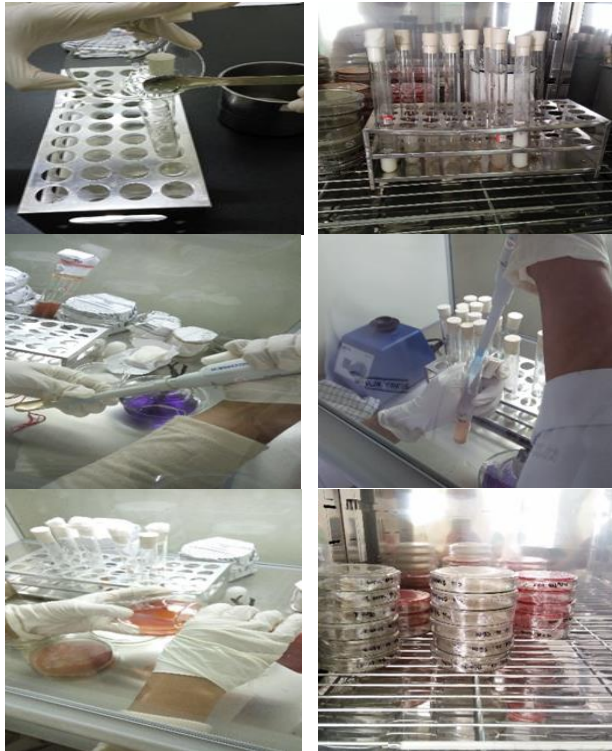
Bagian tegaknya: warna kuning dengan atau tanpa warna hitam (identifikasi adanya H<sub>2</sub>S)

Bagian miringnya: warna merah atau tidak berubah

- Urea agar: warna merah atau tidak berubah menunjukkan reaksi negatif
- Lystine decarboxylation: warna ungu menunjukkan reaksi positif
- Beta galaktosidae: warna tidak berubah menunjukkan reaksi negatif
- Vogel-Proskuer (VP): warna tidak berubah menunjukkan reaksi negatif

Uji indol: warna kuning kecoklatan menunjukkan reaksi negatif






**Gambar 36** . Dokumentasi pengujian *Salmonella*  
Sumber: Sumartini (2022)

### Lactose Broth

- Ditimbang 2,5 gram
- Dimasukkan ke dalam beaker glass 250 mL
- Ditambah aquades 200 mL
- Diaduk sampai homogen
- Ditutup dengan aluminium foil
- Dipanaskan dengan hot plate
- Dituang dalam tabung reaksi dan ditutup dengan aluminium foil
- Disterilkan mengggunakan steroclave
- Simpan dalam lemari es

Hasil



**Gambar 37 .** Pembuatan larutan *lactose broth* pada pengujian Salmonella  
 Sumber: Sumartini (2022)

### Tetrathionate Broth

- Ditimbang 77,4 gram
- Dimasukkan ke dalam beaker glass
- Ditambah aquades 980 mL
- Diaduk sampai homogen
- Ditutup dengan aluminium foil
- Dipanaskan dengan hot plate
- Dinginkan sampai suhu 45-50°C
- Ditambah 20 mL larutan iodine (6 gram iodine + 5 gram KI dalam 20 mL aquades)
- Dituang dalam tabung reaksi dan ditutup dengan aluminium foil
- Disterilkan mengggunakan steroclave
- Simpan dalam lemari es

Hasil

**Gambar 38 .** Pembuatan larutan tetrathionate broth pada pengujian Salmonella  
 Sumber: Sumartini (2022)





### 8.1. Definisi Pengujian *Bacillus*

*Bacillus* adalah genus bakteri gram positif berbentuk batang, bagian dari filum Firmicutes. Spesies *Bacillus* dapat bersifat aerobik obligat (tergantung oksigen) atau anaerobik fakultatif (mampu menjadi anaerobik tanpa adanya oksigen). Kelompok *Bacillus* mencakup sejumlah besar spesies pembentuk spora berbentuk batang gram positif dengan berbagai sifat. Genus ini heterogen secara taksonomi dan banyak karakter yang digunakan untuk identifikasi sangat bervariasi, termasuk reaksi Gram, motilitas, kemampuan tumbuh secara anaerobik, reaksi oksidase, dan metode pemecahan karbohidrat. *Bacillus* sp. merupakan bakteri aerobik obligat atau aerobik fakultatif dan positif terhadap uji enzim katalase.

Spesies *Bacillus* dibagi menjadi tiga kelompok berdasarkan uji biokimia tradisional, lokasi spora, dan morfologi. Spesies utama yang terlibat dalam penyakit bawaan makanan termasuk *B. cereus* (Kelompok I) dan kelompok *B. subtilis/licheniformis* (Kelompok III), meskipun beberapa spesies lain telah diduga. Anggota kelompok *Bacillus* ada dimana-mana, ditemukan secara luas di debu dan tanah dan sering diisolasi dalam jumlah yang bervariasi dari makanan yang berbeda, terutama yang mengandung sereal. Spora dapat bertahan dalam perlakuan panas dan karena jumlah yang banyak sering menyebabkan penyakit, jumlah yang sedikit pada makanan tidak dianggap signifikan. Metode pengayaan biasanya tidak diperlukan untuk menguji *Bacillus* spp. *Bacillus* spp mudah tumbuh pada media non-selektif, namun untuk keperluan identifikasi sebaiknya digunakan media selektif. Media yang ditentukan di bawah ini tidak memulihkan semua spesies *Bacillus*, namun memulihkan spesies yang diketahui menyebabkan gejala gastrointestinal. Suhu inkubasi yang disarankan adalah 30°C untuk memastikan deteksi *B. cereus*.

**Tabel 3.** Kultur kontrol pengujian bacillus

Kode	Jenis bakteri	Hasil pengujian
NCTC 7464	Bacillus cereus	Positif, pertumbuhan kuantitatif
NCTC 10400	Bacillus subtilis	Positif, pertumbuhan kualitatif
NCTC 9001	Escherichia coli	Negatif, pertumbuhan terhambat

## 8.2. Media pengujian Bacillus

*Polymyxin pyrivate* kuning telur manitol bromothymol blue agar (PEMBA) atau Agar polimiksin kuning telur merah fenol (agar MYP atau PREP). Kedua media tersebut mengandung manitol 1%, emulsi kuning telur 5% dan polimiksin 100IU/mL. Metode ISO yang sesuai (EN ISO 7932; BS 5763) menggunakan agar MYP yang diinokulasi dengan metode pelapisan permukaan. Namun, penelitian internasional gagal menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kinerja kedua media tersebut, dan banyak ahli mikrobiologi menganjurkan penggunaan PEMBA.

## 8.3. Prosedur pengujian Bacillus

- Siapkan pengenceran desimal serial dan homogenat 10-1 dari sampel makanan dijelaskan dalam Bagian 4.2 dan 4.3.
- Pilih metode penghitungan permukaan dari Bagian 5 (misalnya: 5.4–5.6), dan hitung menggunakan agar PEMBA atau MYP.
- Inkubasi secara aerobik pada suhu 30°C selama 24 jam; jika koloni tidak terlihat jelas diinkubasi 30°C selama 24 jam. Jika PEMBA digunakan dan akan ada noda diperlukan setelah inkubasi media harus diinkubasi pada suhu 37 ° C untuk yang pertama 24 jam diikuti dengan 24 jam berikutnya pada suhu kamar.
- Periksa cawan untuk koloni yang khas, yang akan berukuran besar (diameter 3–7 mm) dan membosankan. Koloni *B. cereus* tampak berwarna biru kehijauan/merak pada agar-agar PEMBA dan lanjut merah muda pada agar MYP karena tidak adanya fermentasi manitol, dan biasanya dikelilingi oleh zona opasitas karena presipitasi lesitin terhidrolisis

- e. Sebagian besar anggota kelompok *Bacillus* lainnya adalah mannitol positif, muncul sebagai koloni hijau atau kuning dan tidak menghasilkan lecithinase. Jika makanan yang diuji bersifat asam atau jika plate mengandung banyak koloni yang memfermentasi manitol, warna biru khas (PEMBA) atau merah muda (MYP) karena tidak adanya fermentasi manitol dapat tertutupi. Selanjutnya subkultur koloni dituang ke PEMBA atau MYP untuk membantu identifikasi.
- f. Pilih cawan yang mengandung hingga 150 koloni untuk dihitung. Hitung dan catat jumlah koloni dengan morfologi menyerupai spesies *Bacillus* untuk memberikan hitungan dugaan. Jika *B. cereus* juga dicari hitung dan catat biru (PEMBA) atau koloni merah jambu (MYP) dengan dan tanpa zona lecithinase.

Catatan: Beberapa anggota Enterobacteriaceae, seperti *Proteus* dan banyak strain *Staphylococcus Aureus*, mampu tumbuh pada media selektif ini. Namun, mereka dapat dengan mudah dibedakan berdasarkan morfologi kolonial dan penampilan umum, serta warna kuningnya, tidak seperti endapan kuning.

#### 8.4. Identifikasi pengujian *Bacillus*

Lakukan pewarnaan Gram jika perlu untuk memastikan morfologi sel (basil Gram positif berukuran besar, dengan atau tanpa spora yang terlihat). Subkultur minimal lima koloni, ketikkan koloni pada agar darah, dan inkubasi selama 18 hingga 24 jam pada suhu 30°C. Koloni *B. cereus* bersifat b-hemolitik, yang berarti koloni tersebut menyebabkan hilangnya seluruh sel darah merah di sekitar koloni yang sedang tumbuh. Konfirmasikan identitas yang dimaksud *B. cereus* dan dikarakterisasi berdasarkan perbedaan morfologi dari strain *Bacillus* lainnya melalui uji biokimia yang sesuai. Tabel berikut membantu membedakan beberapa strain *Bacillus* paling umum yang menyebabkan keracunan makanan.

**Tabel 4.** Identifikasi galur keracunan makanan *Bacillus spp.*

	<i>B.cereus</i>	<i>B.pumilis</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>B.licheniformis</i>
Glucose (ASS)	+	+	+	+
Arabinose (ASS)	-	+	+	+

Mannitol (ASS)	-	+	+	+
Xylose (ASS)	-	+	+	+
Nitrate reduction	+	-	+	+
Pertumbuhan bakteri anaerob	+	-	-	+

ASS, ammonium salt sugars

Rincian uji biokimia untuk memeriksa pertumbuhan bakteri anaerob adalah sebagai berikut:

Kultur darah ke dalam dua cawan agar; Inkubasi satu cawan secara aerobik dan cawan lainnya secara anaerobik pada suhu 30°C selama  $22 \pm 2$  jam, kemudian periksa pertumbuhan bakteri pada kedua cawan tersebut. Hitung jumlah total *Bacillus* spp. atau *B. cereus* per g makanan. Jika makanan uji bersifat asam atau jika piring mengandung banyak koloni yang memfermentasi manitol, karakteristik warna biru (PEMBA) atau merah muda (MYP) karena kurangnya fermentasi manitol mungkin tersamarkan. Subkultur selanjutnya dari koloni yang dicurigai KONBA atau MYP akan menyelesaikan masalah ini dan memfasilitasi identifikasi.

### 9.1. Definisi Pengujian *Campylobacter jejuni*

Bakteri aerobik *Campylobacter* yang tahan panas baru diketahui sebagai penyebab penting penyakit radang usus pada manusia sejak awal tahun 1970. *Campylobacter jejuni* bertanggung jawab atas sebagian besar penyakit ini, dimana *C. Coli* menyebabkan satu miliar persentase kecil kasus dan spesies lain yang terkadang terisolasi. *Campylobacter* adalah sel bakteri aerobik, gram negatif, kecil, vibrioid atau berbentuk spiral dengan kemampuan bergerak maju mundur dengan cepat. Mereka mereduksi nitrat, tidak dapat mengoksidasi ferrokardohidrat dan terutama mereduksi nitrit. *C. Jejuni*, *C. Coli*, *C. Upsaliensis* dan *C. Lari* bersifat termotoleran dan tumbuh pada suhu 42°C tetapi tidak pada suhu 25°C. *Campylobacter* dapat menginfeksi manusia setelah kontak langsung dengan hewan atau secara tidak langsung melalui air, susu, atau daging yang terkontaminasi.

Banyak sampel makanan akan diuji keberadaan *Campylobacter* spp. akan dianggap pemanasan, pembekuan atau pendinginan. Perawatan ini dapat menyebabkan kerusakan non-fatal pada organisme, yang menyebabkan peningkatan sensitivitas terhadap antibiotik tertentu dan berkurangnya resistensi terhadap suhu inkubasi yang tinggi.

**Tabel 5.** Kultur kontrol Pengujian *Campylobacter jejuni*

Kode	Jenis bakteri	Hasil pengujian
NCTC 11322	<i>Campylobacter jejuni</i>	Negatif, pertumbuhan terhambat
NCTC	<i>Bacillus subtilis</i>	Positif, pertumbuhan kualitatif
NCTC 9001	<i>Escherichia coli</i>	Negatif, pertumbuhan terhambat

Metode kultur pengayaan yang dijelaskan di bawah ini memungkinkan resusitasi dan pemulihan organisme yang terluka. Menanam makanan segar secara langsung, terutama unggas, juga bisa efektif. Pencacahan *Campylobacter* biasanya tidak dilakukan karena tujuan tes adalah untuk menentukan keberadaan organisme.

## 9.2. Metode pengujian *Campylobacter jejuni* dengan metode Kultur langsung

Prosedur ini mungkin paling bermanfaat untuk sampel seperti kulit ayam.

### Media

Agar selektif: misalnya Agar cefoperazone charcoal deoxycholate agar (CCDA) yang dimodifikasi darah bebas, Exeter, Preston atau Skirrow.

### Prosedur

- Ambil swab sampel makanan dan inokulasikan ke permukaan agar selektif yang sesuai.
- Inkubasikan pelat pada suhu 37°C selama 4 jam dan kemudian pada suhu 41,5°C selama 44-68 jam lagi dalam atmosfer nitrogen yang mengandung 5-15% karbon dioksida dan 5-10% oksigen.
- Periksa lempeng untuk mencari koloni yang khas, yang memiliki ciri-ciri sebagai berikut:

Koloni *C. Jejuni* (dan *C. Lari*): pipih, mengkilat, berbunga, cenderung menyebar sepanjang garis inokulasi. Koloni-koloni yang berjarak sama terlihat seperti tetesan cairan. Pada agar-agar basah terlihat lapisan tipis menyebar. Saat inkubasi berlanjut, koloni menjadi rendah dan cembung dengan permukaan kusam. Kilau logam pada akhirnya akan berkembang, dengan karakteristik permukaan yang sering kali tetap berkilau.

**Tabel 6.** Diferensiasi *Campylobacter* spp

	Hippurate hydrolysis	Nalidixic acid sensitivity
<i>C. jejuni</i>	+	S

C.Coli	-	S
C.lori	-	R

R, Resisten , S, Sensitive

### 9.3. Metode pengujian *Campylobacter jejuni* dengan metode Kultur pengayaan

Kaldu pengayaan yang cocok mengandung suplemen FBP (ferrous sulfate, sodium metabisulfite dan sodium pyruvate, masing-masing dengan konsentrasi 0,025%) untuk meningkatkan aerotoleransi dan memungkinkan inkubasi aerobik. Campuran antibiotik juga diperlukan untuk mencegah pertumbuhan berlebih oleh organisme pesaing dan termasuk dalam formulasi kaldu Preston Exeter dan Bolton. Kaldu Preston didasarkan pada formulasi agar Preston. Kaldu Exeter serupa tetapi juga termasuk cefoperazone untuk selektivitas yang lebih besar. Kaldu exeter telah terbukti menghasilkan tingkat isolasi yang lebih baik daripada kaldu Preston. Kepekaan terhadap beberapa bahan yang ditunjukkan oleh *Campylobacter* yang terluka secara subletal dapat diatasi dengan menginkubasi kaldu pada suhu 37°C. Kaldu Bolton telah dikembangkan untuk mengoptimalkan pemulihan sel yang cedera

#### Media

Exeter *campylobacter*-selektif media dari komposisi berikut:

Kaldu nutrisi (Oxoid No. 2)	1000mL
Darah lisis	50ml
Trimethoprim	10mg
Rifampisin	10mg
Cefoperazone	15mg

FBP dapat dibuat sebagai larutan gabungan 2,5% dari setiap aditif dalam air. Sepuluh mililiter Untuk piring tambahkan 15 g agar-agar. Ini kemudian dapat ditambahkan ke 1L media. Buang larutan stok setelah 7 hari. Antibiotik harus dibuat sebagai solusi terpisah.



Agar selektif: c.g. CCDA yang dimodifikasi bebas darah, Preston, Exeter atau Skirrow

## **Prosedur**

- (a) Homogenkan 25 g sampel makanan dalam 225 ml kaldu pengayaan Exeter. Kaldu harus pada suhu kamar saat inokulasi. Pindahkan homogenat ke Stoples dengan tutup sekrup menyisakan ruang kepala yang sangat sedikit, dan tutup bagian atas dengan rapat.
- (b) Inkubasi pada suhu 37°C selama 18-48 jam sebaiknya dalam inkubator berbantuan kipas untuk memperoleh perpindahan panas yang cepat. Sesuaikan periode inkubasi sesuai dengan tingkat kontaminasi sampel yang diharapkan: untuk sampel seperti kulit ayam, inkubasikan pada suhu 37°C selama 18 jam; untuk sampel air, dimana sel akan rusak parah, inkubasi selama 48 jam.
- (c) Subkultur ke agar selektif yang sesuai.
- (d) Inkubasi cawan pada suhu 41,5°C selama 24-48 jam dalam atmosfer mikroaerobik (lihat langkah (b) dari metode 1).
- (e) Lanjutkan seperti yang dijelaskan dalam langkah (c)-(e) dari metode 1.

## **9.4. Metode pengujian *Campylobacter jejuni* dengan metode Kultur pengayaan untuk isolasi sel yang cedera**

Sejumlah perubahan telah diusulkan untuk versi ISO 10272 saat ini. Versi baru (dalam persiapan) berisi metode yang lebih nyaman untuk pemulihan sel *Campylobacter* yang tertekan, seperti yang mungkin ditemukan dalam makanan beku. Metode baru diulas di bawah ini.

## **Media**

Kaldu pengayaan: Kaldu Bolton

Agar selektif: CCDA termodifikasi bebas darah dan agar selektif pilihan kedua.

## Prosedur

- a. Homogenkan 25 g sampel dalam 225 mL kaldu Bolton. Pindahkan homogenat ke stoples berulir dengan menyisakan sedikit ruang kepala, dan tutup bagian atas dengan rapat.
- b. Inkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam; transfer ke 41,5 ° C selama 42-44 jam lebih lanjut.
- c. Subkultur ke agar CCDA yang dimodifikasi dan satu agar pilihan lainnya.
- d. Inkubasi cawan pada suhu 41,5°C selama 40-48 jam.
- e. Lanjutkan seperti yang dijelaskan dalam metode langkah (c)-(e)

### 9.5. *Clostridium perfringens* dan *clostridia* pereduksi sulfit lainnya

*Clostridium perfringens* umumnya ditemukan pada kotoran manusia dan hewan dan tersebar luas di lingkungan tanah, debu, lalat dan tumbuh-tumbuhan. Karena praktik penyembelihan saat ini, sulit untuk mendapatkan bangkai hewan yang bebas dari kontaminasi usus; Oleh karena itu, organisme ini merupakan kontaminan umum pada daging dan unggas.



**Gambar 39** . Koloni bakteri *Clostridium perfringens*

Hal itu dikaitkan dengan diare sejak tahun 1895 dan laporan pertama tentang perannya dalam keracunan makanan mulai dari tahun 1943. Ini adalah anggota gram positif, non-motil berujung persegi, anaerobik (tetapi oksigen relatif toleran) dari genus *Clostridium*.

Bentuknya oval, spora sentral jarang terlihat dalam kultur kecuali media yang diformulasikan secara khusus digunakan. Spora mudah terbentuk di usus; enterotoksin diproduksi pada sporulasi di usus *C. Perfringens* menghasilkan kapsul, mengurangi sulfid dan nitrat dan menghasilkan lecithinase (aktivitas B-toxin). Reaksi gula mungkin tidak teratur tetapi fermentasi laktosa dapat membantu membedakan organisme dari *C. Sordelli* dan *C. novyi*, sementara kurangnya motilitas dan ketidakmampuan untuk bersporulasi secara bebas dapat digunakan untuk memisahkan *C. perfringens* dari *C. bifermentans* dan juga *C. sordelli*. yang terkait secara antigenik.

Makanan yang terkontaminasi sel vegetatif *C. perfringens* dalam jumlah besar dapat menimbulkan penyakit yang ditandai dengan diare dan sakit perut. Sel-sel vegetatif sangat sensitif terhadap pendinginan dan pembekuan, dan hanya bentuk spora yang dapat bertahan dalam makanan dingin dan beku. Clostridia pereduksi sulfid lainnya terlibat dalam pembusukan makanan, terutama makanan kaleng yang diproses dengan buruk.

**Tabel 7.** Kontrol kultur pengujian *Clostridium*

Kode	Jenis bakteri	Hasil pengujian
NCTC 8273	<i>Clostridium perfringens</i>	Positif, pertumbuhan kuantitatif
NCTC 9001	<i>Escherichia coli</i>	Negatif, pertumbuhan terhambat
NCTC 10975	<i>Proteus mirabilis</i>	Negatif, pertumbuhan terhambat
NCTC 532	<i>Clostridium sporogenes</i>	Positif, pertumbuhan kuantitatif

Metode pertama yang dijelaskan untuk pencacahan langsung akan mendeteksi hampir semua klostridia pereduksi sulfid dan mampu memulihkan sel vegetatif dan spora dengan baik. Metode kedua berguna untuk menyelidiki wabah keracunan makanan, tetapi mungkin tidak memulihkan beberapa strain.

## Metode 1 Pencacahan langsung

Metode ini didasarkan pada BS EN 13401 dan ISO 7937. Perbedaan kedua metode internasional ini terletak pada teknik konfirmasi. Revisi ISO 7937 akan memungkinkan salah satu metode digunakan sebagai pengganti media laktosa sulfat saja.

### Media

Agar sikloserin triptosa sulfat (TSC): basis agar perfringens ditambah D-sikloserin (400 mg/L); untuk pembusukan clostridia yang sensitif terhadap sikloserin, gunakan basis agar perfringens yang mengandung kanamisin sulfat (12 mg/L) dan polimiksin B (30 000 IU/L). Bakteri yang menghasilkan koloni hitam dalam media TSC, tidak bergerak, mereduksi nitrat menjadi nitrit, menghasilkan asam dan gas dari laktosa dan mencairkan gelatin dalam 48 jam dianggap sebagai *C. perfringens*. Namun, uji konfirmasi yang dijelaskan di atas tidak akan membedakan antara *C. perfringens* dan *Clostridium* spp. seperti *C. parapfringens* dan *C. Absonum*.

### Metode laktosa sulfat

- a. Inokulasi setiap koloni terpilih ke dalam media tioglikolat cair dan inkubasi anaerob pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- b. Segera setelah inkubasi, gunakan pipet steril untuk memindahkan lima tetes biakan tioglikolat ke media laktosa sulfat yang berisi tabung Durham terbalik, yang telah dikukus dan didinginkan sesaat sebelum digunakan.
- c. Inkubasi pada suhu 46°C selama 18-24 jam dalam bak air.
- d. Tabung media LS yang mengandung endapan hitam dan dengan tabung Durham lebih dari seperempat penuh gas dianggap positif. Jika tabung Durham, dalam media yang menghitam, kurang dari seperempat penuh gas, pindahkan lima tetes pertumbuhan dari tabung ini ke tabung media LS selanjutnya dan inkubasi pada suhu 46°C.
- e. Baca seperti yang dijelaskan di atas. Koloni yang memberikan tampilan khas pada media TSC dan konfirmasi positif dengan media LS dianggap sebagai *C. perfringens*.

Koloni dapat dipastikan sebagai *C. perfringens* tipe A dengan reaksi Nagler, yaitu dengan menunjukkan kemampuan antitoksin *C. perfringens* tipe A untuk menghambat produksi lecithinase duksi menggunakan agar kuning telur. Beberapa strain tidak menghasilkan lesitinase. Namun, kehati-hatian harus diambil untuk tidak mengacaukan reaksi dengan yang dihasilkan oleh orang lain secara dekat spesies terkait Clostridia seperti *C. bifermentans* dan *C. sordelli*.

## **Metode 2 Kultur pengayaan**

Metode ini dapat digunakan untuk menentukan ada atau tidaknya *Clostridia* ketika jumlah sel cenderung kecil atau hanya ada spora.

### **Prosedur**

- a. Timbang dua sampel 1 g makanan ke dalam botol terpisah bertutup ulir yang berisi 25 ml. volume media daging matang atau media klostridial yang diperkuat yang telah direbus untuk mengeluarkan oksigen dan segera didinginkan sebelum digunakan.
- b. Panaskan satu botol pada suhu 60-65°C selama 15 menit untuk menyetrum spora. Jangan panaskan botol satunya.
- c. Inkubasi kedua botol pada suhu 37°C selama 20-24 jam.
- d. Subkultur kedua botol ke dalam agar selektif yang sesuai untuk mengkonfirmasi keberadaan clostridia seperti yang dijelaskan pada langkah (a)-(1) dari metode 1. (Botol media *Clostridia* yang diperkuat yang telah menumbuhkan clostridia akan menghitam.)

Media daging yang dimasak dan media clostridial yang diperkuat dapat digunakan untuk menghitung clostridia dengan metode multiple tube (jumlah yang paling mungkin).

### 10.1. Definisi pengujian *E-Coli*

Dalam dunia mikrobiologi, *Escherichia coli* (*E. Coli*) tergolong bakteri gram negatif berbentuk batang dan termasuk dalam famili Enterobacteriaceae. Dalam sebagian besar literatur, bakteri *Escherichia coli* menghuni saluran usus bagian bawah hewan berdarah panas, termasuk manusia.

*Escherichia coli* adalah bakteri gram negatif. Secara umum bakteri yang ditemukan oleh Theodor *Escherich* terdapat di usus besar manusia. Kebanyakan *E. coli* tidak berbahaya, namun ada beberapa jenis seperti *E. coli*. *E.coli* tipe O157: H7, dapat menyebabkan keracunan makanan parah pada manusia, termasuk diare berdarah akibat produksi eksotoksin yang disebut verotoksin

### 10.2. Metode pengujian *E-Coli*

- a. Untuk contoh dengan berat lebih kecil atau sama dengan 1 kg atau 1 l sampai dengan 4,5 kg atau 4,5 l timbang contoh padat sebanyak 25 g atau contoh cair sebanyak 25 ml dari contoh yang akan diuji , kemudian masukkan dalam wadah atau plastik steril dan tambahkan 225 ml larutan Butterfield's Phosphate Buffered.
- b. Untuk contoh dengan berat lebih besar dari 4,5 kg atau 4,5 l timbang contoh padat sebanyak 50 g atau contoh cair sebanyak 50 ml , kemudian masukkan dalam wadah atau plastik sterildan tambahkan 450 ml larutan Butterfield's Phosphate Buffered.
- c. Homogenkan selama 2 menit. Homogenat ini merupakan larutan dengan pengenceran 101

### ***Presumptive test Coliform (Uji pendugaan)***

- a. Siapkan pengenceran  $10^2$  dengan cara melarutkan 1 ml larutan  $10^1$  ke dalam 9 ml larutan pengencer Butterfield's Phosphate Buffered. Lakukan pengenceran selanjutnya sesuai dengan pendugaan kepadatan populasi sample. Pada setiap pengenceran dilakukan pengocokan minimal 25 kali.
- b. Pindahkan dengan menggunakan pipet steril, sebanyak 1 ml larutan dari setiap pengenceran ke dalam 3 seri atau 5 seri tabung *lauryl tryptose Broth* (LTB) yang berisi tabung durham.
- c. Inkubasi tabung-tabung tersebut selama 48 jam  $\pm$  2 jam pada suhu  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ . Perhatikan gas yang terbentuk setelah inkubasi 24 jam dan inkubasikan kembali tabung-tabung negatif selama 24 jam. Tabung positif ditandai dengan kekeruhan dan gas dalam tabung durham.
- d. Lakukan "Uji penegasan coliform" untuk tabung-tabung positif.
- e. Catat jumlah tabung yang membentuk gas pada masing-masing pengenceran. Hasil uji dinyatakan positif jika ada gas pada tabung durham tersebut.

### ***Confirmed Test (Uji Penegasan Coliform)***

- a. Inokulasikan tabung-tabung LTB yang positif ke tabung-tabung BGLB Broth yang berisi tabung durham dengan menggunakan jarum ose,. Inkubasi BGLB Broth yang telah diinokulasi selama 48 jam  $\pm$  2 jam pada suhu  $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .
- b. Periksa tabung-tabung BGLB yang menghasilkan gas selama 48 jam  $\pm$  2 jam pada suhu  $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . Tabung positif ditandai dengan kekeruhan dan gas dalam tabung durham.
- c. Tentukan nilai angka paling memungkinkan (APM) berdasarkan jumlah tabung-tabung BGLB yang positif dengan menggunakan Angka Paling Memungkinkan (APM). Nyatakan nilainya sebagai "APM/g coliform"
- d. Cocokkan dengan tabel MPN.



**Gambar 40.** Uji pendugaan pengujian E-Coli

**Uji pendugaan *Escherichia coli* (faecal coliform, presumptive *Escherichia coli*)**

- a. Inokulasikan dari setiap tabung LTB yang positif ke tabung-tabung EC Broth yang berisi tabung durham dengan menggunakan jarum ose,. Inkubasi EC Broth dalam waterbath sirkulasi selama 48 jam ± 2 jam pada suhu 45oC ± 0,5oC. Waterbath harus dalam keadaan bersih, air di dalamnya harus lebih tinggi dari tinggi cairan yang ada dalam tabung



- yang akan diinkubasi.
- b. Periksa tabung-tabung EC Broth yang menghasilkan gas selama 24 jam  $\pm$  2 jam, jika negatif inkubasikan kembali sampai 48 jam  $\pm$  2 jam. Tabung positif ditandai dengan kekeruhan dan gas dalam tabung durham.
  - c. Tentukan nilai angka paling memungkinkan (APM) berdasarkan jumlah tabung-tabung EC yang positif dengan menggunakan Angka Paling Memungkinkan (APM). Nyatakan nilainya sebagai “APM/g faecal coliform”.

### **Uji penegasan *Escherichia coli* (confirmed *Escherichia coli*)**

- a. Dari tabung-tabung EC Broth yang positif dengan menggunakan jarum ose gores ke LEMB agar. Inkubasi selama 24 jam  $\pm$  2 jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C} + 1^{\circ}\text{C}$ .
- b. Koloni *Escherichia coli* terduga memberikan ciri yang khas (*typical*) yaitu hitam pada bagian tengah dengan atau tanpa hijau metalik.
- c. Ambil lebih dari satu koloni (*typical*) *Escherichia coli* dari masing-masing cawan LEMB dan goreskan ke media PCA miring dengan menggunakan jarum tanam. Inkubasi selama 24 jam  $\pm$  2 jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C} + 1^{\circ}\text{C}$ .
- d. Jika koloni yang khas (*typical*) tidak ada, pindahkan 1 atau lebih koloni yang tidak khas (*typical*) *Escherichia coli* ke media PCA miring

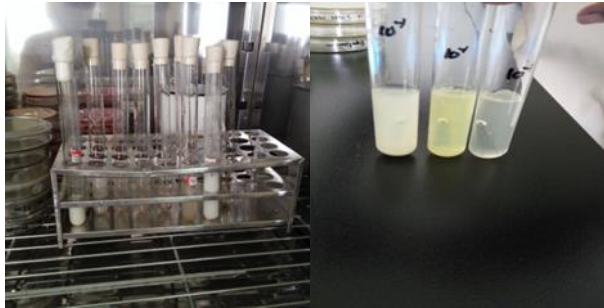


e.

**Gambar 41.** Uji penegasan pengujian *E-Coli*  
Sumber: Sumartini (2022)

Lakukan uji morfologi dengan pewarnaan Gram untuk setiap koloni yang diduga *Escherichia coli*. Kultur dikumpulkan pada PCA dan diinkubasi selama 24 jam. Di bawah mikroskop, bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif, berbentuk seperti batang pendek atau kokus.





**Gambar 42.** Dokumentasi pengujian *E-Coli*  
Sumber: Sumartini (2022)

### 11.1. Definisi pengujian *Vibrio cholerae*

Bakteri *Vibrio cholerae* merupakan patogen yang berbahaya bagi manusia. Bakteri *Vibrio cholerae* diketahui menyebabkan kolera, gastroenteritis ringan, dan septikemia pada manusia. Penyakit yang disebabkan oleh *Vibrio cholerae* sering dikaitkan dengan faktor virulensi seperti toksin hemolisin-sitolisin, koleragen, neuraminidase, disulfida isomerase dan protease.

Meskipun sebagian besar strain *Vibrio cholerae* yang bersifat patogen pada manusia tidak dapat dikaitkan dengan hewan akuatik, toksin yang dihasilkan oleh *Vibrio cholerae* yang diisolasi dari hewan akuatik masih dianggap bersifat patogen dari hewan (Co *et al.*, 2015).

### 11.2. Pesiapan Pengujian *Vibrio cholerae*

#### 1. Persiapan Peralatan Pengujian

Persiapan peralatan pengujian merupakan salah satu kegiatan awal yang harus diambil sebelum pengujian. Kegiatan persiapan alat uji meliputi pembersihan alat uji, sterilisasi alat uji, dan penyiapan alat uji sebelum melakukan proses pengujian, seperti penataan alat di tempat pengujian. Kegiatan penyiapan peralatan kemudian dilanjutkan dengan proses sterilisasi.

Proses sterilisasi terbagi menjadi dua jenis, yaitu sterilisasi basah dan sterilisasi kering. Sterilisasi basah menggunakan autoklaf, sedangkan sterilisasi kering menggunakan oven. Proses sterilisasi bertujuan untuk mensterilkan peralatan dan kendaraan yang digunakan pada saat pengujian. Alat-alat yang tidak dapat disterilkan dengan autoklaf dapat disterilkan dengan cara menyemprotkan alkohol pada alat-alat seperti rak tabung, gerobak, penjepit, dan lain-lain. Alat yang digunakan untuk membantu

pengumpulan data dalam mengidentifikasi bakteri *Vibrio cholerae* disajikan pada (Tabel 1).

**Tabel 8.** Alat Penunjang Pengujian *Vibrio cholerae* dan Fungsinya

<b>No.</b>	<b>Nama Alat</b>	<b>Fungsi</b>
1.	<i>Stomacher</i>	Digunakan untuk menghomogenkan media analisa atau sampel
2.	Cawan Petri	Digunakan untuk tempat perkembang biakan bakteri
3.	Tabung Reaksi	Digunakan untuk tempat mereaksikan dua larutan/bahan atau lebih
4.	Gelas Ukur	Digunakan untuk pembuatan media
5.	Timbangan Analitik	Digunakan untuk menimbang bahan pembuatan media pengujian
6.	Inkubator	Digunakan untuk menginkubasi atau membiakkan bakteri pada suhu yang terkontrol
7.	Botol Schott	Digunakan untuk menyimpan media larutan APW
8.	Jarum Ose Tanam & Jarum Ose Tusuk	Digunakan untuk membantu memindahkan biakan ke media baru saat penanaman bakteri
9.	Bunsen	Digunakan untuk memanaskan alat agar tetap steril
10.	<i>Hotplate</i>	Digunakan untuk memanaskan serta menghomogenkan larutan yang akan digunakan sebagai media
11.	Alat Pengocok ( <i>Vortex Mixer</i> )	Digunakan untuk menyeragamkan atau menghomogen cairan dalam volume kecil
12.	Autoclave	Digunakan untuk menghindari hasil pertumbuhan mikroorganisme
13.	<i>Oven</i>	Digunakan untuk memanaskan dan mensterilkan cawan petri yang berisi bakteri
14.	Mikroskop	Digunakan untuk mengamati bakteri

15.	Mikro pipet	Digunakan untuk memasukkan sampel cairan ke dalam tabung reaksi dan compact dry
16.	<i>Biology Safety Cabinet</i>	Digunakan untuk meminimalisir kontaminasi virus/bakteri saat melakukan inokulasi
17.	<i>Disecting set</i>	Digunakan untuk membedah sampel uji di ruang Nekropsi
18.	<i>Erlenmeyer flask</i>	Digunakan untuk pembuatan media

### 11.3. Pembuatan Media Pengujian

Produksi media uji meliputi produksi media pertumbuhan bakteri, serta media uji dugaan dan konfirmasi dalam pengujian mikrobiologi. Produksi media dibedakan menjadi dua jenis, yaitu produksi media agar dan produksi media cair. Dalam proses pembuatan media diperlukan ketelitian agar hasilnya dapat sesuai dengan ketentuan standar SOP.

Media yang dihasilkan disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C untuk mensterilkan media dari kontaminasi bakteri yang tidak diinginkan. Media yang sudah disterilkan dapat langsung digunakan atau disimpan di lemari es untuk mengawetkan bahan siap pakai. Media agar yang digunakan untuk mendeteksi bakteri *Vibrio cholerae* disajikan pada (Tabel 8).

**Tabel 9.** Bahan Pengujian *Vibrio cholerae* dan Fungsinya

No.	Bahan	Fungsi
1.	APW ( <i>Alkaline Pepton Water</i> )	Digunakan untuk media pengkaya bakteri dalam pertumbuhan bakteri
2.	TCBS ( <i>Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose</i> )	Digunakan untuk pembiakan/pertumbuhan bakteri yang dibiakan
3.	TSA ( <i>Trypticase Soy Agar</i> )	Digunakan untuk media agar miring saat pemurnian
4.	<i>Bactident oksidase</i>	Digunakan untuk uji oksidase pada biokimia pendahuluan

5.	Vibriostat 150 µg dan 10 µg	Digunakan untuk uji sensitifitas pada uji biokimia pendahuluan
6.	<i>Tiple Sugar Iron (TSI) Agar</i>	Digunakan untuk uji TSI dan KIA pada uji biokimia pendahuluan
7.	ONPG ( <i>Ortho Nitrophenyl Physiological Saline</i> )	Digunakan untuk uji ONPG pada uji biokimia Pendahuluan
8.	<i>Oksidatif Fermentatif (OF)</i>	Digunakan untuk media uji OF pada uji biokimia pendahuluan
9.	<i>Arginin, Lysine, dan Omithin</i>	Digunakan untuk media uji biokimia lanjutan
10.	TSB ( <i>Trypticase Soy Borth</i> )	Digunakan untuk media uji biokimia lanjutan yang dituangkan pada T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> -T <sub>1</sub> N <sub>10</sub>
11.	MR-VP	Digunakan untuk media uji Voges-Proskuer pada uji biokimia lanjutan
12.	<i>Sucrose, lactose, D-mannitol, dan Arabinosa</i>	Digunakan untuk media uji fermentasi karbohidrat pada uji biokimia lanjutan.
13.	Urea	Digunakan untuk media uji hidrolisis urea pada uji biokimia lanjutan
14.	Parafin cair steril	Digunakan untuk pengondisian/ fermentasi lanjutan anaerob
15.	TSA bertingkat (T <sub>1</sub> N <sub>1</sub> -T <sub>1</sub> N <sub>10</sub> )	Digunakan untuk media uji toleransi garam pada uji biokimia lanjutan
16.	Alkohol 70%)	Digunakan untuk mensterilkan alat yang telah digunakan
17.	Kapas	Digunakan untuk menutup tabung reaksi
18.	<i>Aquades</i>	Digunakan untuk mensterilkan alat yang telah digunakan
19.	<i>Crystal violet</i>	Digunakan untuk pewarna pada proses pewarnaan gram

20.	Lugol	Digunakan untuk membasuh warna pada proses pewarnaan gram
21.	<i>Sarfanine</i>	Digunakan untuk pewarna pada proses pewarnaan gram

## 11. Preparasi sampel

Persiapan sampel disesuaikan dengan pengujian yang akan dilakukan. Setelah menentukan pengujian mana yang akan dilakukan, tuliskan kode sampel sesuai ketentuan agar sampel mudah dikenali. Spesimen uji dinekropsi dengan cara mengeluarkan organnya untuk digunakan sebagai spesimen untuk pengujian mikrobiologi atau lainnya. Selama proses ini, sampel harus dibekukan untuk menghindari kontaminasi dan mencegah pertumbuhan bakteri pada sampel. Sampel dapat dikemas dalam plastik transparan dan higienis untuk memudahkan pengangkutan. Setiap sampel harus memiliki tempat penyimpanan sampel untuk pengujian ulang jika diperlukan di masa mendatang.

### 11.4. Tahapan Pengujian Bakteri *Vibrio cholerae*

Selama melakukan pengujian, terapkan teknis aseptis dan lakukan pengujian di ruangan atau *Biological Safety Cabinet (BSC)* yang terkontrol. Hal ini bertujuan untuk meminimalisir terjadinya kontaminasi selama proses pengujian.

#### 1. Persiapan Sampel

Persiapan sampel dilakukan dengan penanganan sampel dinekropsi yaitu mengambil organ target untuk dijadikan sampel dalam pengujian bakteri. Untuk sampel ikan secara umum dapat diambil bagian dagingnya. Dalam penanganan dan nekropsis sampel hendaknya dilakukan secara cepat dan keadaan beku agar terhindar dari kontaminasi dan mencegah tumbuhnya bakteri. Selanjutnya sampel di timbang dan dihomogenisasi dengan media pengencer atau pelarut.

Pada pengujian bakteri *Vibrio cholerae*, media yang digunakan yaitu media APW (*Alkaline Pepton Water*) dengan perbandingan 1:9 yaitu sebanyak 25 gram sampel dengan penambahan 225 ml larutan APW yang kemudian dihomogenisasikan menggunakan alat *stomacher* selama 2-3 menit hingga menjadi homogenat. Fungsi APW pada pengujian ini yaitu



untuk menurunkan jumlah bakteri lainnya dikarenakan pH tinggi merupakan keadaan yang buruk bagi bakteri lain untuk tumbuh (Venkateswaran, 1999). Penggunaan alat *stomacher* pada tahap ini adalah untuk menghomogenkan sampel uji dengan media APW.

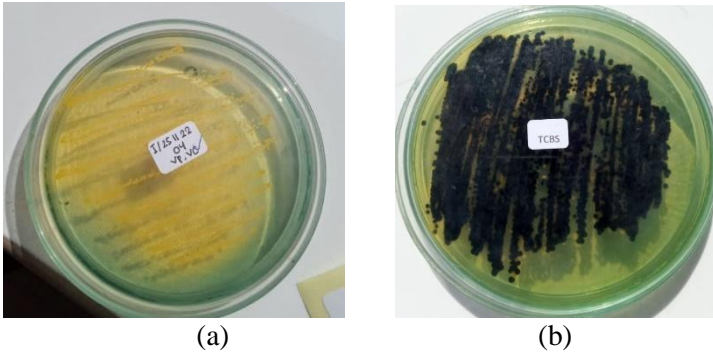
## 2. Pengkayaan Sampel

Proses pengkayaan bakteri *Vibrio cholera* dilakukan dengan cara melarutkan 1 ml homogenat kedalam 9 ml APW menggunakan mikropipet. Setelah itu diinkubasi dalam incubator pada suhu  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  selama 16-24 jam. Tujuan dari penggunaan suhu  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  yaitu karena bakteri *Vibrio cholerae* merupakan bakteri patogen yang berbahaya bagi manusia, sehingga suhu pertumbuhannya mengikuti suhu tubuh manusia. Pertumbuhan bakteri akan ditandai dengan berubahnya larutan APW dalam tabung reaksi yang semula jernih menjadi keruh. Hal ini disebabkan karena adanya aktivitas pertumbuhan bakteri yang terdapat pada media APW. Media APW merupakan media penyubur untuk memberikan nutrisi dan kesempatan tumbuh bagi *V. cholerae*.

## 3. Isolasi Bakteri *Vibrio cholerae*

Isolasi bakteri dilakukan dengan mengambil hasil pengkayaan sebanyak 1 ose dari setiap tabung reaksi APW yang keruh dengan cara mencelupkan jarum ose sedalam  $\pm 1$  cm dari permukaan cairan tanpa mengocok larutan APW pada tabung reaksi. Kemudian melakukan isolasi pada bakteri atau penanaman bakteri pada media TCBS (*Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose*). Media TCBS (*Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose*) merupakan media agar selektif yang berfungsi untuk menumbuhkan bakteri yang diinginkan dengan menghambat bakteri kompetitif. Media ini mengandung komponen selektif yakni garam empedu, thiosulfate, sodium cholat, citrate dan pH 8,6. Adanya komponen selektif ini memiliki tujuan untuk menghambat bakteri lainnya, seperti sodium cholat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan garam empedu menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif selain *Vibrio* sp. (Stam & Smiley, 2014). Isolasi bakteri ini dilakukan dengan metode streak plate larutan APW keruh menggunakan jarum ose pada media TCBS untuk

diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (Ihsan & Retnaningrum, 2017).



**Gambar 43.** Media TCBS untuk Isolasi Bakteri *Vibrio cholerae* (a) (+) terduga bakteri *Vibrio cholerae* (b) (–) bakteri *Vibrio cholerae*  
Sumber : dokumentasi pribadi

Tahapan selektif media agar ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri *Vibrio sp.* yang terdapat pada APW sebelumnya. Berdasarkan ketentuan pada SNI 01-2332.4:2006 koloni bakteri terindikasi *Vibrio cholerae* yang tumbuh adalah memiliki ciri-ciri seperti koloninya berukuran bulat besar berukuran  $\pm 2$  mm, permukaan halus, agak datar, bagian tengah buram dan bagian pinggir terang, berwarna kuning (sukrosa positif). Koloni kuning pada media TCBS diakibatkan karena bakteri ini mampu memfermentasi sukrosa dan mampu menurunkan pH media TCBS sehingga media berubah menjadi berwarna kuning (Mawengkang, 2010). Koloni bakteri terduga *Vibrio cholerae* yang tumbuh sesuai dengan ciri-ciri pada SNI 01-2332.4:2006 akan dilanjutkan pada tahap pemurnian dan uji biokimia lanjutan.

#### **4. Pemurnian Bakteri *Vibrio cholerae***

Pemurnian bakteri dilakukan dengan cara mengambil koloni terduga *Vibrio cholerae* yang tumbuh pada media TCBS agar kemudian ditanam dengan cara digoreskan pada media TSA (*Trypticase Soy Agar*) miring dengan penambahan NaCl 1,5%. Untuk bakteri yang diduga *Vibrio cholerae* akan tumbuh pada media ini. Setelah dilakukan penanaman pada media TSA+1,5 % NaCl kemudian diinkubasi selama 18-24 jam dengan

suhu  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Pemurnian bakteri ini bertujuan untuk menghilangkan sifat-sifat selektif dari media TCBS agar sehingga didapat koloni bakteri target yang sudah siap untuk dilanjutkan pada uji biokimia pendahuluan.

## 5. Uji Biokimia Pendahuluan

Uji biokimia pendahuluan pada proses identifikasi bakteri *Vibrio cholerae* digunakan sebagai uji persumptif sebelum digunakan uji konfirmasi pada uji biokimia lanjutan.



**Gambar 44.** Uji Biokimia

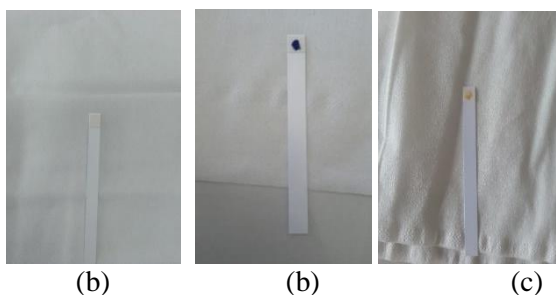
Sumber : dokumentasi pribadi

Uji biokimia pendahuluan untuk mengidentifikasi *Vibrio cholerae* antara lain uji oksidase, uji kerentanan vibriostat 0/129, agar besi tiga arah (TSI) dan agar besi Kligger (KIA), uji ONPG, uji fermentasi oksidatif (OF) dan pewarnaan Gram.

### a. Uji Oksidase

Uji biokimia pendahuluan yang pertama adalah uji oksidase. Uji oksidase dapat dilakukan dengan menyebarkan agar T1N1 atau TSA + NaCl 1,5% atau media fermentasi non karbohidrat lainnya ke dalam cawan Petri yang berisi agar TSA. Inkubasi pada suhu  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  selama 18 – 24 jam. Teteskan 2 sampai 3 tetes reagen oksidase pada koloni bakteri dan amati reaksinya. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua pada koloni. Uji oksidase juga dapat dilakukan dengan menggunakan kertas oksidase dengan cara mengikis koloni T1N1 atau TSA + NaCl 1,5% pada permukaan kertas oksidase dengan tusuk gigi (jangan menggunakan tusuk gigi nikel atau kromium).

Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua secara cepat. Tujuan dari pengujian ini adalah untuk menentukan bakteri tersebut menghasilkan enzim sitokrom oksidase atau tidak, pada oksidase strip mengandung N, N-dimetil-1,4-fenil diammonium klorida dan 1-naftol. Kandungan tersebut akan bereaksi dengan adanya oksigen pada enzim oksidase sehingga menghasilkan *idophenol blue* yang mengakibatkan warna *test strip* menjadi biru (Marlina, Wibowo, & Andalas, 2008).



**Gambar 45.** Pengujian *Oksidase* (a) semula (b) positif (c) negatif  
 Sumber : dokumentasi pribadi

#### b. Pengujian Gram

Pengujian gram dilakukan dengan menggunakan KOH3% pada siolat bakteri yang ditaruh pada *objek glass* dengan reaksi menghasilkan lender yang menandakan bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri gram negatif. Pada pengujian menggunakan KOH3% menyebabkan lender, hal ini disebabkan pecahnya dinding sel bakteri karena KOH3%. Dinding sel bakteri gram negatif yang lebih tipis dari bakteri gram positif, sehingga akan lebih mudah didestruksi oleh KOH3%.

#### c. Uji Sensitifitas terhadap 0/129 Vibriostat

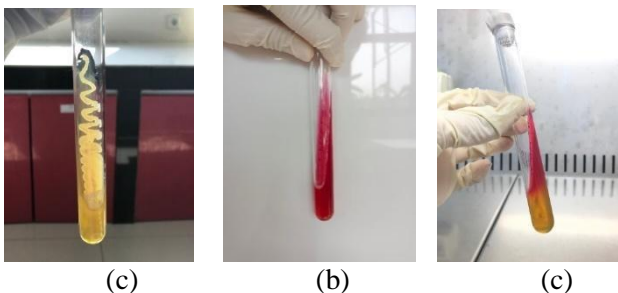
Uji biokimia pendahuluan selanjutnya adalah uji sensitivitas 0/129 vibrostat yang dilakukan dengan cara menggoreskan 1 scoop agar T1N1 atau 1,5% TSA + NaCl secara cepat ke dalam cawan Petri yang berisi TSA dengan kapas aseptik. Tempatkan pelat 0/129 10 µg dan 150 µg ke dalam strip yang paling rapat dan inkubasi pada suhu 36°C ± 1°C selama 18 – 24 jam. Amati pertumbuhan di sekitar disk. Respon sensitif ditunjukkan dengan terbentuknya zona di sekitar cakram (S), sedangkan respon resisten

ditunjukkan dengan tumbuhnya zona di sekitar cakram (R). ay. kolera rentan terhadap 0/129 10  $\mu\text{g}$  dan 150  $\mu\text{g}$ . Vibrioligen O/129, yang merupakan turunan pteridine, diketahui menghambat sebagian besar *Vibrio* sp., meskipun beberapa menunjukkan resistensi (Cowan & Steel, 1974).

d. Uji TSIA dan KIA

Uji biokimia pendahuluan selanjutnya adalah uji TSIA (Triple Sugar Iron) dan KIA (Kliger Iron Agar). Uji Triple Sugar Iron Agar (TSIA) merupakan metode yang digunakan untuk menguji kemampuan mikroorganisme dalam memfermentasi gula. Medium TSIA mengandung tiga jenis gula yaitu glukosa, laktosa dan sukrosa, serta indikator fenol merah dan  $\text{FeSO}_4$  yang menunjukkan terbentuknya  $\text{H}_2\text{S}$  yang ditandai dengan adanya endapan berwarna hitam. Konsentrasi glukosanya 1/10 dari konsentrasi laktosa atau sukrosa, sehingga hanya terlihat fermentasi glukosa.

Media TSIA diinokulasi dengan memasukkan lingkaran  $\frac{3}{4}$  jauh ke dalam media dan kemudian menggoreskannya pada permukaan miring media. Jika mikroorganisme hanya dapat memfermentasi glukosa, maka bagian bawah medium akan berwarna kuning (asam) dan bagian yang miring akan berwarna merah (basa). Jika mikroorganisme dapat memfermentasi laktosa atau sukrosa atau kedua-duanya maka kemiringan dan media perebusan akan berwarna kuning (asam) dan media perebusan kadang-kadang akan terpisah akibat terbentuknya gas seperti  $\text{H}_2$  dan  $\text{CO}_2$ .



**Gambar 46.** Hasil Uji TSIA (a) positif (b) negatif (c) negative

Sumber : dokumentasi pribadi

Uji KIA bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasikan glukosa dan laktosa serta kemampuan memproduksi hydrogen sulfida. Hasil positif pada uji KIA, tidak terbentuk gas, dengan *slant* (bagian permukaan media) berwarna merah (bersifat basa) dan *butt* (bagian dasar media) berwarna kuning (bersifat asam). Pengujian ini menggunakan inkubasi pada suhu  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  selama 18 jam – 24 jam. *V. cholerae* menghasilkan asam (warna kuning) pada agar miring, asam (warna kuning) pada agar tegak dan tidak menghasilkan gas serta H<sub>2</sub>S.

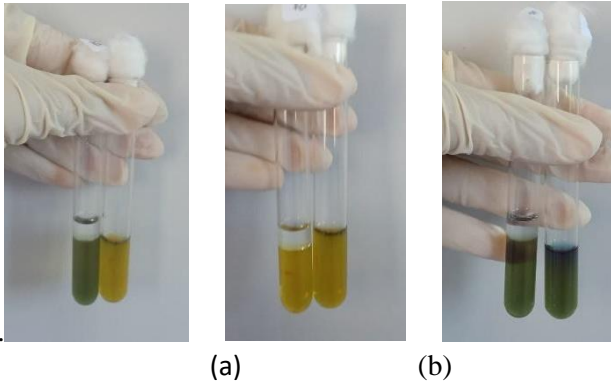
e. Uji ONPG

Pengujian biokimia pendahuluan dilanjutkan dengan pengujian ONPG. Untuk pengujian ONPG, gunakan kultur dari TSI atau media lain yang mengandung laktosa. Uji ONPG dilakukan dengan memasukkan 1 loop kultur TSI ke dalam tabung berisi 0,5 ml saline fisiologis. Masukkan 1 pelat ONPG dan inkubasi pada suhu  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit hingga 1 jam. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning pada medium yang terdapat dalam tabung. Tes ini mendeteksi kemampuan memecah laktosa. Enzim yang biasanya memecah laktosa adalah  $\beta$ -galaktosidase. Penambahan 5% laktosa ke dalam medium menghasilkan pengasaman yang cepat dan menghasilkan endapan kuning di dalam medium (Cowan & Steel, 1974).

f. Uji *Oksidatif-Fermentatif*

Uji fermentasi oksidatif, pengujian ini dilakukan dengan menginokulasi 2 tabung ke dalam media OF yang ditambah glukosa yang dicampur dengan agar T1N1 atau media kultur TSA + NaCl 1,5%. Tambahkan 1 cm hingga 2 cm minyak mineral steril/parafin steril ke salah satu tabung. Inkubasi pada suhu  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  selama 1 hingga 2 hari.

Reaksi oksidasi ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning (reaksi asam) pada tabung yang belum ditambahkan minyak mineral, sedangkan reaksi fermentasi ditandai dengan terbentuknya warna kuning pada tabung yang ditambahkan minyak mineral



**Gambar 47.** Hasil Uji Oksidatif Fermentatif (a) Reaksi Oksidatif (b) Reaksi Fermentatif (c) Non Reaksi  
 Sumber : dokumentasi pribadi

Asam mengubah medium dari hijau menjadi kuning. Tujuan penggunaan medium OF adalah untuk mengetahui apakah bakteri uji memecah karbohidrat melalui oksidasi atau melalui fermentasi yang menghasilkan asam dari pemecahan karbohidrat. Kehadiran asam dalam proses dekomposisi menyebabkan indikator (bromtimol biru) berubah warna menjadi kuning sedang (Cowan & Steel, 1974).

**g. Pewarnaan Gram**

Uji biokimia pendahuluan terakhir sebagai uji persumptif bakteri *Vibrio cholerae* adalah pewarnaan gram. Proses pewarnaan gram dilakukan dengan cara membuat pewarnaan gram dari setiap koloni terduga *V. cholerae*. Kultur diambil dari T1N1 agar miring atau TSA miring + NaCl 1,5 % yang telah diinkubasikan selama 24 jam. Pengujian pewarnaan gram dilakukan dengan cara menggunakan 4 reagent yaitu *crystal violet*, lugol, *decolorization*, dan sarfanin. Bakteri *V. cholerae* termasuk gram-negatif, berbentuk batang pendek atau koma.

Bakteri gram negatif mempunyai kandungan lipid yang tinggi, sehingga apabila diwarnai dengan gram maka bakteri akan tampak berwarna merah. Warna merah tersebut disebabkan oleh larutnya kompleks pewarna kristal violet pada proses penambahan larutan alkohol, sehingga bakteri akan tampak berwarna merah safranin. Sedangkan bakteri Gram positif mempunyai kandungan peptidoglikan yang kental sehingga

akan tampak berwarna ungu pada pewarnaan Gram, karena zat warna kompleks akan tetap tertahan meskipun menggunakan larutan alkohol (Nurhidayati et al., 2015).

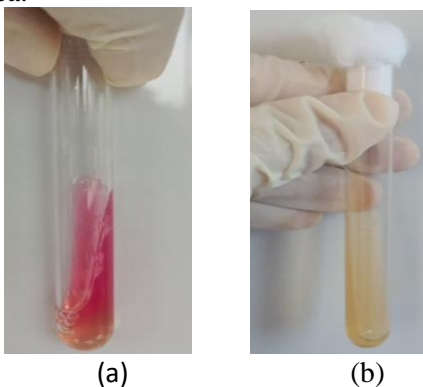
## 6. Uji Biokimia Lanjutan

Uji biokimia lanjutan digunakan sebagai uji konfirmasi apabila uji biokimia pendahuluan seluruh parameter uji mengarah positif kepada karakteristik bakteri *Vibrio cholerae*. Terdapat beberapa pengujian dalam uji biokimia lanjutan antara lain uji terhadap *Urea*, uji terhadap *Arginin dihidrolase*, *Lysine dekarboksilase*, dan *ornithin dekarboksilase*, uji terhadap toleransi garam, uji pertumbuhan 42°C, Uji *voges-proskauer*, Uji fermentasi karbohidrat dan Uji Serologi.

### a. Uji Hidrolisis Urea

Uji terhadap Urea dilakukan dengan cara Inokulasikan kultur bakteri yang mengarah pada *Vibrio cholerae* sebanyak 1 ose dari TSA + NaCl 1,5% ke dalam media *Urea*. Inkubasikan pada suhu 36°C ± 1°C selama 18 jam. Reaksi positif ditunjukkan dengan perubahan warna media dari orange menjadi merah muda.

*Vibrio cholerae* tidak mempunyai kemampuan dalam menghidrolisis *Urea* (reaksi negatif), sehingga hasil reaksi yang menunjukkan keberadaan *Vibrio cholerae* adalah hasil reaksi negatif. Hal ini terjadi karena *Vibrio cholerae* tidak mempunyai kemampuan untuk menghidrolisis Urea.



**Gambar 48.** Hasil Uji Hidrolisis Urea (a) positif (b) negative  
Sumber : dokumentasi pribadi

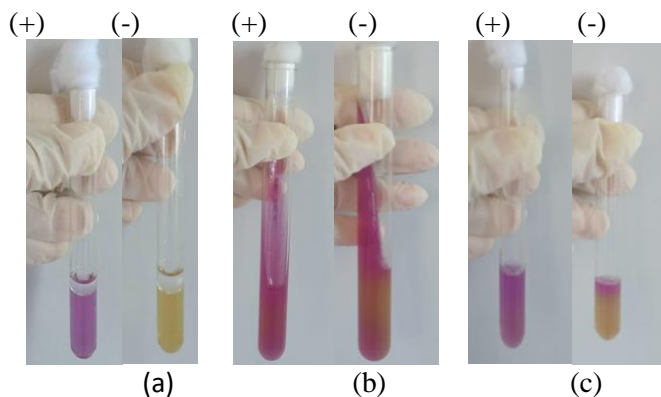


Mikroorganisme yang menghasilkan enzim urase akan mengurai urea menjadi ammonia dan CO<sub>2</sub>, kemudian indikator (*phenol red*) pada media akan mengakumulasi ammonia pada media biakan dan menyebabkan pH menjadi basa sehingga media menjadi berwarna merah muda (Mahmuda, Baharuddin, Sappewali, 2016).

b. Uji *Arginin dihidrolase, Lysine dekarboksilase, dan ornithin dekarboksilase*

Uji arginin dihidrolase, lisin dekarboksilase dan ornitin dekarboksilase dilakukan dengan menginokulasi media kultur TSA + NaCl 1,5% ke dalam 3 tabung media dasar dekarboksilase yang masing-masing berisi arginin, lisin dan 1 ornitin dan dalam 1 tabung kontrol berisi media dasar dekarboksilase tanpa arginin, lisin, dan ornitin. Asam amino. Tambahkan 1 cm hingga 2 cm minyak mineral steril ke setiap tabung. Inkubasi pada suhu 36°C ± 1°C selama 4 hari. Amati setiap hari.

Jika reaksi arginin dihidrolase positif ditandai dengan adanya perubahan warna medium dari jingga menjadi merah muda. Jika tidak ada perubahan disebut reaksi arginin dihidrolase negatif. *Vibrio cholerae* tidak menghasilkan dua enzim: arginine desmidase, yang mengubah arginin menjadi citrulline dan NH<sub>3</sub>, dan citrulline ureidase, yang mengubah citrulline menjadi ornithine (Ferfinia, 2010).



**Gambar 49.** Hasil Uji (a) Arginin,(b) Lysine, dan (c) Ornithin

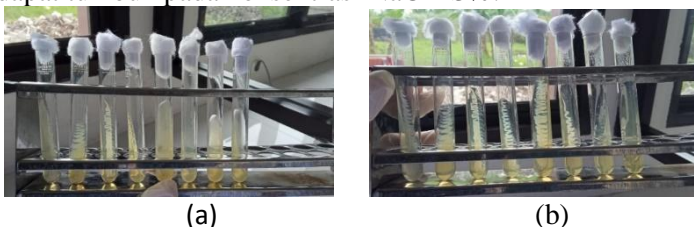
Sumber : dokumentasi pribadi

Reaksi positif pada uji lysine dan ornithine dekarboksilase ditandai perubahan warna pada MIO (Motility Indol Ornithine) dan LIA (Lysine Iron Agar) menjadi berwarna ungu, hal tersebut dikarenakan terjadi lisin dekarboksilase dan ornithin dekarboksilase yang menyebabkan pH menjadi basa dan merubah indikator (brom kresol ungu) pH pada media menjadi ungu (Pangestu, 2013).

Reaksi dekarboksilase melawan asam amino menghasilkan pH basa dan mengubah medium menjadi ungu cerah (reaksi positif). Selama ini reaksi fermentasi glukosa menghasilkan asam dan menyebabkan medium menguning (reaksi negatif). Tabung kontrol yang tidak mengandung asam amino berubah warna menjadi kuning. *V. cholerae* menghasilkan reaksi negatif dengan arginin dihidrolase, reaksi positif dengan lisin dan ornitin, dan reaksi positif dengan ornitin dekarboksilase.

#### c. Uji Toleransi Garam

Uji toleransi garam dilakukan dengan menginokulasi tiga tabung dengan TSB yang masing-masing berisi media Tripton 1% yang ditambah NaCl 0%; Pertama%; dan 3% (T1N0, T1N1, T1N3). Inkubasi pada suhu  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , selama 18 jam – 24 jam. Reaksi positif ditandai dengan munculnya kekeruhan yang menandakan adanya pertumbuhan. *V. cholerae* tumbuh pada medium T1N0. dan T1N3. Hal ini terjadi karena *V. cholerae* hanya dapat tumbuh pada konsentrasi NaCl <3%.



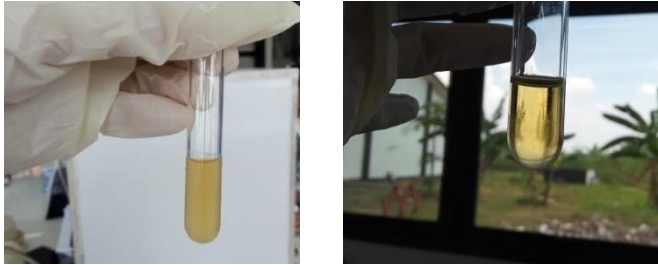
**Gambar 50.** Hasil Toleransi Garam (a) positif (b) negatif

Sumber : dokumentasi pribadi

#### d. Uji Pertumbuhan 42°C

Uji pertumbuhan pada suhu 42°C dilakukan dengan cara Inokulasikan 1 ose dari TSB yang telah diinkubasikan selama 24 jam kedalam TSB yang telah dihangatkan dalam *Waterbath* 42°C. Inkubasikan pada suhu 42°C dalam *Waterbath* selama 24 jam.

Reaksi positif ditandai dengan terjadinya kekeruhan yang menunjukkan adanya pertumbuhan. *V.cholerae* mampu tumbuh pada suhu 42°C. Suhu 42°C merupakan suhu optimal bagi pertumbuhan bakteri *V. cholerae*.



(a) (b)  
**Gambar 51.** Uji Pertumbuhan 42 °C (a) reaksi positif (b) reaksi negatif  
Sumber : dokumentasi pribadi

#### e. Uji *Voges-Proskauer*

Uji *Voges-Proskauer* dilakukan dengan menginokulasi 1 dosis TSA + NaCl 1,5% ke dalam kaldu MR-VP, diinkubasi pada suhu 36°C ± 1°C selama 2 hari. Pindahkan 1 ml setiap kaldu pertumbuhan MR-VP ke dalam tabung reaksi steril berukuran 13 mm x 100 mm. Tambahkan 0,6 ml larutan alfa-naftol dan 0,2 ml KOH 40% dan kocok rata. Tambahkan sedikit kristal kreatin untuk mempercepat reaksi. Kocok lagi dan biarkan selama 2 jam. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah jambu hingga merah delima pada medium. *V. cholerae* menyebabkan berbagai reaksi. Uji *Voges-Proskauer* bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri mampu menghasilkan aseton. Warna merah jambu sampai merah

tua menunjukkan hasil positif, bila tidak terjadi perubahan warna maka hasil negatif.



(a)

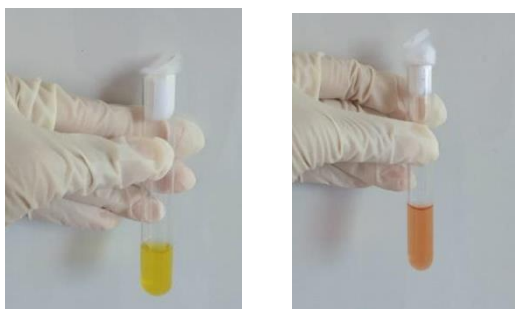
(b)

**Gambar 52.** Hasil Uji VP (a) positif (b) negative

Sumber : dokumentasi pribadi

#### f. Uji Fermentasi Karbohidrat

Uji fermentasi karbohidrat dilakukan dengan menginokulasi 1 dosis TSA + NaCl 1,5% ke dalam setiap tabung kaldu ungu yang mengandung sukrosa, laktosa, D-manitol, manosa, arabinosa, atau selobiosa. Tambahkan 1 cm hingga 2 cm minyak mineral steril ke setiap tabung. Inkubasi pada suhu  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  selama 4 sampai 5 hari dan amati setiap hari. Reaksi aktif fermentasi karbohidrat menghasilkan asam dan menyebabkan media menjadi kuning.



(a)

(b)

**Gambar 53.** Hasil uji fermentasi karbohidrat (a) positif (b) negatif

Sumber : dokumentasi pribadi

g. Uji Serologi

Uji serologis dilakukan dengan mengambil 1 kultur loop pada agar T1N1 atau TSA + NaCl 1,5% yang diinkubasi selama 16 - 24 jam dan diletakkan pada kaca preparatif. Teteskan dengan emulsi saline 0,85 n. Tempatkan 1 tetes antiserum Poly Hikojima Inaba-Ogawa di sebelah suspensi koloni. Campurkan antiserum sedikit demi sedikit dengan suspensi koloni hingga benar-benar homogen. Kontrol dengan saline dan antiserum. Kocok campuran ke kiri dan ke kanan dan amati reaksi penggumpalan pada latar belakang gelap sebagai berikut:

**Hasil positif** jika terjadi aglutinasi pada larutan kultur dan tidak terjadi aglutinasi pada larutan kontrol, sedangkan hasil negatif jika tidak terjadi aglutinasi baik pada larutan kultur maupun larutan kontrol.

### 12.1. Definisi Pengujian Jamur

Jamur yang mengandung ragi (seperti ragi) adalah jamur yang membentuk sel ragi yang bertunas dan tumbuh menjadi filamen panjang yang tidak dapat dipisahkan yang disebut pseudohifa. Cetakan (Bahasa Inggris: kapang) adalah bagian dari kingdom (regnum) jamur (“jamur”) yang sering tumbuh pada permukaan makanan yang sudah busuk atau tidak diproses terlalu lama. Kebanyakan kapang termasuk dalam kelas Ascomycetes. Cetakan meliputi cetakan tetap, cetakan filamen dan cetakan bercabang. Sebagian besar tubuh jamur terdiri dari serat yang disebut miselium, yang dihubungkan bersama membentuk semacam jaring yang disebut miselium. Tanggul tersebut terdiri dari banyak serat.

Jamur mampu hidup pada lingkungan yang faktor-faktornya mempengaruhi pertumbuhannya seperti jumlah unsur hara, kelembaban dibawah 90%, suhu 20 sampai 300°C, pH 2,0 sampai 8,5 dan adanya faktor penghambat seperti bahan kimia dan antibiotik. Periksa cetakan pada PDA. Media PDA untuk pertumbuhan *Candida albicans* dan *Aspergillus niger* memberikan hasil terbaik dibandingkan media alternatif karena PDA merupakan salah satu media kultur yang paling banyak digunakan karena formulasinya yang sederhana dan sekolah terbaik karena kemampuannya dalam mendukung perkembangan. dari berbagai jenis jamur. Pengujian jamur memerlukan masa inkubasi kurang lebih 7 (tujuh) hari

### 12.2. Prosedur Pengujian Jamur

Pertumbuhan kapang dan khamir setelah contoh diinkubasikan dalam media agar pada suhu 25 °C selama 5 hari. Penentuan jumlah kapang

dan khamir dapat dilakukan dengan dua cara yaitu metode cawan agar tuang (pour plate) dan Media dan Pereaksi

a) Dichloran rose bengal chloramphenicol (DRBC) agar

b) Dichloran 18% glycerol (DG18) agar

c) Larutan 0,1% peptone water a atau cawan

Suhu media agar yang akan dituang adalah  $45 \pm 1$  °C. n agar sebar (spread plate).

### **Preparasi contoh**

Contoh yang akan diuji diambil secara aseptik dan acak dengan ketentuan berat sebagai berikut:

a) Contoh dengan berat kurang dari 1 kg, diambil sebanyak 100 g.

b) Contoh dengan berat 1 kg – 4,5 kg, diambil sebanyak 300 g.

c) Contoh dengan berat lebih dari 4,5 kg, diambil sebanyak 500 g.

### **Homogenisasi dan pengenceran**

a. Timbang contoh secara aseptik sebanyak 25 g untuk contoh (a) dan (b) dan 50 g untuk contoh (c) diatas, kemudian masukan dalam wadah steril atau plastik steril;

b. Tambahkan larutan 0,1% peptone water sebanyak 225 mL untuk contoh 25 g dan 450 mL untuk contoh 50 g, homogenkan selama 2 menit. Homogenate ini merupakan larutan pengenceran  $10^{-1}$

c. Ambil 1 mL homogenat diatas menggunakan pipet steril, dan masukan ke dalam 9 mL larutan 0,1% peptone water untuk mendapatkan pengenceran  $10^{-2}$

d. Siapkan pengenceran selanjutnya ( $10^{-3}$ ) dengan mengambil 1 mL contoh dari pengenceran  $10^{-2}$  ke dalam 9 mL larutan 0,1% peptone water;

e. Lakukan pengenceran sesuai kebutuhan atau pengenceran maksimum sampai  $10^{-6}$

### **12.3. Pengujian Jamur metode cawan agar tuang (*Pour plate method*)**

- a. Pipet 1 mL dari setiap pengenceran  $10^{-1-2}$ , 10, dst dan masukkan ke dalam cawan Petri steril. Lakukan secara triplo untuk setiap pengenceran;
- b. Setelah contoh dimasukkan, tambahkan 20 mL – 25 mL media agar DG18 yang sudah didinginkan dalam waterbath hingga mencapai suhu  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$  dalam waktu 1 - 2 menit ke dalam masing-masing cawan yang sudah berisi contoh. Supaya contoh dan media agar DG18 tercampur sempurna, lakukan pemutaran cawan ke depan ke belakang ke kiri dan ke kanan;
- c. Setelah agar memadat, masing-masing cawan tersebut diinkubasikan dalam posisi tidak terbalik dan disusun tidak lebih dari 3 cawan Petri dalam inkubator pada suhu  $25^\circ\text{C}$  selama 5 hari;
- d. Lakukan kontrol tanpa contoh dengan mencampur larutan pengencer dengan media agar DG18;
- e. Dari penyiapan pengenceran pertama sampai menuang agar dilakukan tidak lebih dari 20 menit.

### **12.4. Metode cawan agar sebar (*Spread plate method*)**

- a. Tuang 20 mL – 25 mL media agar DRBC ke dalam cawan-cawan Petri steril dan dinginkan sampai memadat;
- b. Pipet 0,1 mL contoh dari masing-masing pengenceran (10-1-2, 10, dst) ke dalam cawan petri yang telah berisi media agar DRBC dan ratakan dengan menggunakan batang gelas bengkok. Lakukan secara triplo untuk semua pengenceran;
- c. Lakukan kontrol tanpa contoh dengan mencampur larutan pengencer dengan media agar DRBC;
- d. Dari penyiapan pengenceran pertama sampai menyebar contoh pada media agar dilakukan tidak lebih dari 20 menit;
- e. Cawan-cawan tersebut diinkubasi dalam kondisi gelap dan posisi tidak terbalik dan disusun tidak lebih dari 3 cawan Petri dalam inkubator pada suhu  $25 ^\circ\text{C}$  selama 5 hari.

Catatan : Untuk pengujian kapang dan khamir lebih



direkomendasikan menggunakan metode cawan agar sebar.

## **12.5. Perhitungan koloni**

Cawan yang mengandung jumlah 10 - 150 koloni

Hitung cawan setelah masa inkubasi 5 hari, jika setelah 5 hari tidak ada pertumbuhan, inkubasi kembali selama 48 jam. Jangan menghitung koloni sebelum masa inkubasi berakhir karena perlakuan tersebut dapat mengakibatkan pertumbuhan sekunder dari spora yang terlepas sehingga jumlah akhir tidak valid. Laporkan hasil sebagai koloni/g berdasarkan rata-rata 3 cawan (triplo) x tingkat pengenceran. Jika semua pengenceran tidak ditemukan koloni

Laporkan hasil:

< 1 x tingkat pengenceran.

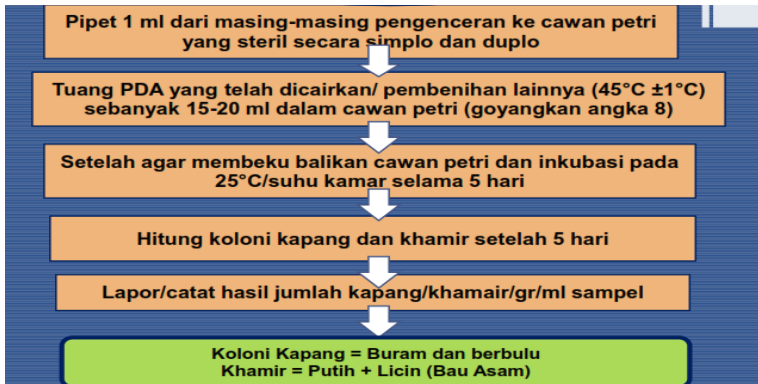
Catatan : Untuk metode agar cawan sebar (spread plate), perhitungan jumlah koloni adalah hasil rata-rata 3 cawan (triplo) dikalikan 10 x tingkat pengenceran.

## **12.6. Pelaporan hasil pengujian**

- a. Untuk menghasilkan perhitungan yang akurat dan teliti maka laporkan hasilnya dengan dua angka (digit) pertama sebagai hasil pembulatan.
- b. Bulatkan keatas dengan cara menaikkan angka kedua menjadi angka yang lebih tinggi bila angka ketiga adalah 6,7,8 atau 9 dan gunakan 0 untuk masing-masing angka pada digit berikutnya.
- c. Bulatkan ke bawah bila angka ketiga adalah 1, 2, 3 atau 4.
- d. Bila angka ketiga 5, bulatkan keatas bila angka kedua ganjil dan bulatkan kebawah bila angka kedua genap.

## Contoh

Hasil perhitungan	Angka kapang dan khamir
12.700	13.000
12.400	12.000
15.500	16.000
14.500	14.000



**Gambar 54.** Isolasi sampel pada pengujian jamur  
Sumber: Sumartini (2022)



**Gambar 55.** Koloni jamur setelah diinkubasi  
Sumber: Sumartini (2022)

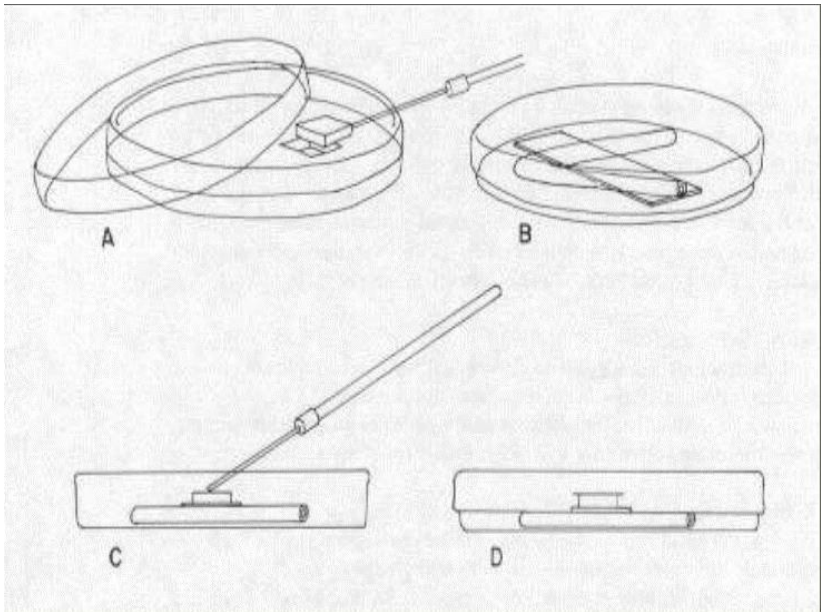
Kegiatan identifikasi bertujuan untuk mengetahui sifat isolat jamur kemudian mengungkap atau menentukan identitas isolat jamur tersebut, termasuk nama genus atau spesies serta kedudukan pastinya dalam sistem taksonomi. Secara umum identifikasi strain jamur dilakukan dengan dua tahap, yaitu pengamatan makroskopis terhadap warna koloni, warna latar belakang koloni, diameter koloni dan ciri-ciri koloni, serta pengamatan mikroskopis untuk mengetahui ciri-ciri warna miselium, diameter miselium, warna spora, dan konidiofor. Diameter, warna dan diameter spora pada sediaan diamati secara kultur pada kaca objek (Hastuti, 2011).

Metode *slide culture* memiliki beberapa kelebihan diantaranya dapat mempersiapkan koloni kapang untuk pemeriksaan dan identifikasi secara cepat, memungkinkan pengamatan kapang secara virtual *in situ* terhadap morfologi sebagian besar bagian kapang tanpa merusak koloni.

Pembuatan slide culture dapat dilakukan pada fungi jenis kapang (*mold*). Bahan dan alat yang diperlukan dalam pembuatan slide culture adalah isolate murni kapang, medium Czapek Agar (CA) atau Potato dextrose agar (PDA) lempeng, aquades, alkohol 95%, pewarna *lactophenol cotton blue*, Canada balsam, tisu, cawan petri, pipa kaca bentuk U atau T, kaca benda, scalpel, pinset, lampu spiritus, jarum inokulasi, dan mikroskop. Prosedur pembuatan preparat isolat kapang dengan metode slide culture (Gambar 54) adalah sebagai berikut:

1. Lakukan sterilisasi terhadap cawan Petri yang telah diberi alas tisu, pipa kaca berbentuk U atau T, kaca benda dan kaca penutup menggunakan oven kering pada suhu 150-180°C selama 2 jam,
2. Buatlah medium steril CA/PDA lempeng tipis pada cawan Petri kemudian potong dengan ukuran 0,5 x 0,5 cm<sup>2</sup> dengan scalpel steril
3. Letakkan potongan medium di atas kaca benda yang ada dalam cawan Petri steril
4. Ambil isolat murni kapang dengan jarum inokulasi kemudian inokulasikan pada bagian atas potongan medium di dalam cawan Petri

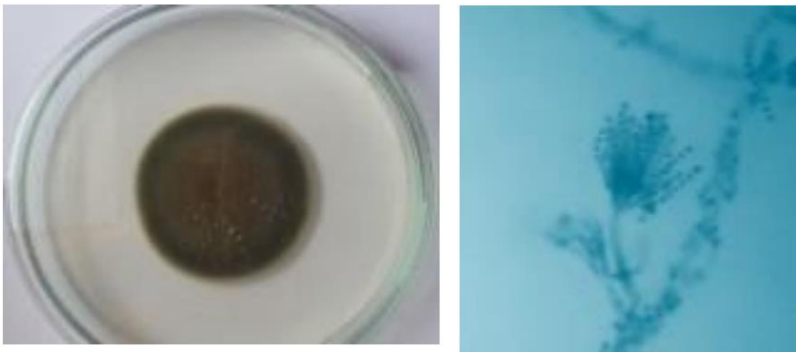
5. Ambil kaca penutup dengan pinset kemudian lewatkan pada api lampu spiritus lalu gesekkan pada potongan medium CA/PDA yang telah diinokulasi dengan biakan murni kapang lalu tutupkan pada potongan medium
6. Basahi tisu pada dasar cawan Petri dengan aquades steril kemudian tutup cawan Petri
7. Inkubasi cawan pada suhu 30°C selama 3-14 x 24 jam. Apabila sudah nampak ada pertumbuhan hifa, miselium, konidiofor, sporangiofor, spora atau konidia yang tumbuh pada tepi potongan medium, maka kaca penutup dapat dibuka.



**Gambar 56.** Pembuatan *slide culture*

8. Tetesi sediaan dengan alkohol 95% tepat pada bagian yang ditumbuhi kapang, sedangkan potongan medium dibuang
9. Rekatkan kaca penutup tersebut diatas kaca benda yang bersih dan telah ditetesi dengan larutan *lactophenol cotton blue*
10. Amati preparat kapang dibawah mikroskop. Jika preparat yang

- dihasilkan sudah baik, maka dapat dibuat preparat permanen dengan menambahkan entelan disekeliling kaca penutup dan diberi label
11. Untuk mengamati warna asli bagian tubuh kapang, lakukan prosedur no (9) namun dengan menggunakan larutan *lactophenol*
  12. Lakukan pengamatan dan deskripsikan karakter yang teramati merujuk pada buku identifikasi kapang menurut Barnett, dkk (1998), Samson & Hoekstra (1984) dan Pitt & Hocking (1988).



**Gambar 57.** Hasil pengamatan makroskopis (koloni) dan mikroskopis kapang genus *Eupenicillium* (Nasichah, dkk., 2016)

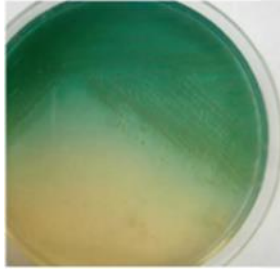
### 14.1. Definisi Pengujian *Pseudomonas aeruginosa*

Kegiatan identifikasi bertujuan untuk mengetahui sifat isolat jamur kemudian mengungkap atau menentukan identitas isolat jamur tersebut, termasuk nama genus atau spesies serta kedudukan pastinya dalam sistem taksonomi. Secara umum identifikasi strain jamur dilakukan dengan dua tahap, yaitu pengamatan makroskopis terhadap warna koloni, warna latar belakang koloni, diameter koloni dan ciri-ciri koloni, serta pengamatan mikroskopis untuk mengetahui ciri-ciri warna miselium, diameter miselium., warna spora, dan konidiofor. Diameter, warna dan diameter spora pada sediaan diamati secara kultur pada kaca objek (Hastuti, 2011).

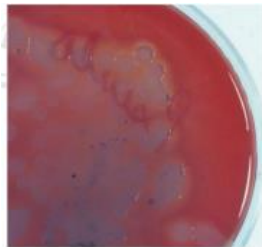
*Pseudomonas aeruginosa* dapat tumbuh dengan mudah pada berbagai media tanam, mengeluarkan bau manis atau seperti buah seperti anggur atau jagung (Brooks et al., 2013). *Pseudomonas aeruginosa* membentuk koloni besar halus dengan permukaan datar terangkat (seperti telur goreng) dan koloni berlendir halus sering diperoleh dari sekret saluran pernapasan dan saluran kemih (Todar, 2020)

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* mampu menghasilkan beberapa enzim, antara lain protease, amilase, dan lipase. *Pseudomonas aeruginosa* dapat menguraikan protein, karbohidrat dan senyawa organik lainnya menjadi CO<sub>2</sub>, gas amonia dan senyawa sederhana lainnya. Bakteri ini dapat diidentifikasi berdasarkan morfologi koloninya, bersifat oksidase positif yang ditunjukkan dengan adanya pigmen khas pyocyanin dan pioverdine. *Pseudomonas aeruginosa* menghasilkan pigmen piosianin, pigmen kebiruan non-fluoresen yang berdifusi dalam media agar. Spesies *Pseudomonas* lainnya tidak menghasilkan piosianin. Banyak strain *Pseudomonas aeruginosa* juga menghasilkan pigmen *fluoresen*

*pyoverdine*, yang memberi warna hijau pada agar-agar. Beberapa strain menghasilkan pigmen pyorubin berwarna merah tua atau pigmen piomelanin hitam.



**Gambar 58.** *Pseudomonas aeruginosa* memproduksi Pigmen Pioverdin yang memberikan warna kehijauan pada agar dan pigmen piosianin yang berwarna kebiru-biruan.



**Gambar 59.** Koloni *Pseudomonas aeruginosa* pada media *Blood Agar Plate*

*Pseudomonas aeruginosa* tumbuh dengan baik pada suhu 37-42 °C. Pertumbuhannya pada suhu 42 °C membantu membedakannya dari spesies *Pseudomonas* lain dalam kelompok fluorescen. *Pseudomonas* diinokulasikan pada lempeng darah dan media diferensial yang biasanya digunakan untuk membiakkan bakteri batang gram-negatif enterik. *Pseudomonas* tumbuh cepat pada sebagian besar media tersebut. *Pseudomonas aeruginosa* tidak meragikan laktosa dan mudah dibedakan dari bakteri peragi laktosa.

## **14.2. Persiapan Pengujian *Pseudomonas aeruginosa***

Persiapan peralatan pengujian merupakan salah satu kegiatan awal yang perlu dilakukan sebelum melakukan pengujian. Kegiatan persiapan peralatan pengujian meliputi kegiatan pembersihan alat uji, sterilisasi alat uji, hingga persiapan alat uji sebelum melakukan proses pengujian seperti penataan alat pada tempat uji. Kegiatan persiapan peralatan kemudian dilanjutkan dengan proses sterilisasi. Sterilisasi basah menggunakan alat *autoclave* suhu 121 °C, tekanan 15 psi selama 15-20 menit, sedangkan sterilisasi kering dengan incenerasi untuk ose bulat. Proses sterilisasi bertujuan untuk mensterilkan peralatan dan media yang digunakan selama pengujian. Alat-alat yang tidak memungkinkan disterilisasi menggunakan *autoclave*, dapat disterilkan dengan cara menyemprotkan alkohol pada alat seperti rak tabung, troli, pinset, dan lain-lain.

## **14.3. Pembuatan Media Pengujian**

Pembudidayaan bakteri di laboratorium memerlukan media yang mengandung nutrisi dan lingkungan pertumbuhan yang sesuai bagi mikroorganisme. Media budidaya mengandung air, sumber energi, nutrisi yang merupakan sumber karbon, nitrogen, sulfur, fosfat, oksigen, hidrogen dan elemen jejak. Media yang digunakan adalah Nutrient Broth (NB) dan *Pseudomonas* Agar Base (PAB).

## **14.4. Preparasi Sampel**

Sampel ditimbang sebanyak 2 gram, ditambahkan aquadest steril 25 mL, selanjutnya dihaluskan dengan stomacher hingga sampel lunak.

## **14.5. Tahapan Pengujian**

### **Isolasi dan Identifikasi Bakteri**

Sampel ditempatkan di media NB. Tabung yang berisi media NB dihomogenisasi dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian suspensi bakteri diambil dari media NB, kemudian disebar ke dalam media *Pseudomonas* Agar Base (PAB) dan diinkubasi pada suhu 37°C



selama 24 jam. Morfologi koloni yang tumbuh pada tumpuan diamati. Koloni yang terisolasi ditempatkan dalam media NA miring untuk pengujian IMViC.



**Gambar 60.** Pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada media *Pseudomonas Agar Base*

*Pseudomonas Agar Base* (PAB) merupakan media selektif untuk isolasi dan diferensiasi *Pseudomonas* berdasarkan formasi dari Pyocianin, Pyorubin dan Fluorescein. Media selektif berfungsi untuk mempermudah pertumbuhan suatu galur mikroba tertentu dan menghambat tumbuhnya galur mikroba lainnya. Komposisi media terdiri dari pepton, magnesium klorida, kalium sulfat dan agar. Pada penggunaan media ini perlu ditambahkan gliserol. pH pada media ini adalah  $7,2 \pm 0,2$  pada suhu  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Bakteri yang tumbuh pada media PAB berwarna kuning dan krem, bentuk bulat, dan mengkilat.

### **Pemeriksaan Mikroskopis**

Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengamati morfologi sel *Pseudomonas* dan mengetahui kemurnian sel bakteri. Langkah pertama adalah mengambil apusan bakteri yang ditempelkan pada lampu alkohol. Apusan bakteri ditiriskan dengan agar ungu selama 2 menit, kemudian dicuci dengan air, ditiriskan dengan Lugol selama 1 menit, kemudian dicuci dengan alkohol 95% selama 10 detik, kemudian dibilas dengan alkohol dan diwarnai kedua kali dengan safranin. larutan selama 2 menit. 30 detik, lalu bilas dengan air, keringkan produk dan amati morfologi dan warna sel di bawah mikroskop.

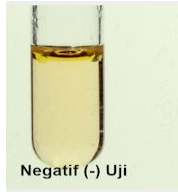


**Gambar 61.** *Pseudomonas aeruginosa* dengan Pengecatan Gram  
(Brooks *et al.*, 2013)

Hasil pewarnaan Gram menunjukkan golongan bakteri Gram negatif yang merupakan bakteri yang tidak dapat mempertahankan zat warna kristal violet pada proses pewarnaan Gram. Bakteri golongan ini akan tampak warna merah muda pada saat dilakukan pengamatan dibawah mikroskop. Bakteri gram negatif mempunyai lapisan peptidoglikan yang tipis dengan ketebalan 10% sehingga mudah melepas zat warna kristal violet dan bakteri hanya meresap zat warna safranin.

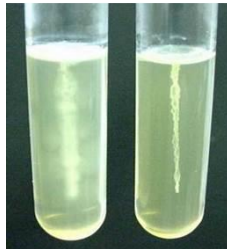
### Uji IMViC

Uji IMViC terdiri dari uji Indol, *Methyl Red*, *Voges-Proskauer* (MR-VP), *Simmon's Citrate Agar* (SCA) dan uji gula-gula (glukosa, laktosa, sukrosa dan manitol), kemudian diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 24 jam dan diamati perubahan yang terjadi pada media. Interpretasi uji indol terhadap *Pseudomonas* dapat diamati setelah media yang telah diinkubasi ditambah reagen *Kovac's Indole*. Hasil negatif uji ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning atau oranye atau tidak mengalami perubahan warna pada media setelah ditetesi reagen *Kovac's Indole*.



**Gambar 62.** Hasil Negatif Uji Indol pada Media SIM

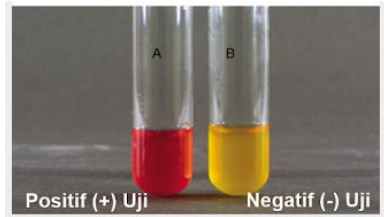
Inokulasi pada media SIM untuk mengetahui sifat motilitas dari bakteri. Jika arah pertumbuhan bakteri menyebar dari tusukan tegak lurus artinya bakteri tersebut bersifat motil (+), jika arah pertumbuhan bakteri hanya ada garis tusukan artinya bakteri tersebut bersifat non motil (-).



**Gambar 63.** Motilitas Bakteri pada media SIM

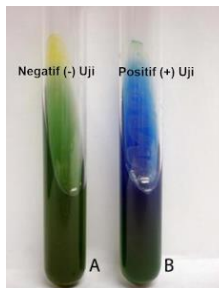
Berdasarkan uji biokimia, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* bersifat motil, non fermentatif, bakteri ini memanfaatkan gula untuk metabolisme oksidase dengan oksigen sebagai terminal akseptor elektron. *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan glukosa untuk membentuk asam, mengurai nitrat menjadi nitrit yang selanjutnya dipecah menjadi nitrogen gas dan bakteri ini tidak menghasilkan indol dan MR.

Uji *Methyl Red* (MR) bertujuan untuk menentukan adanya fermentasi asam, bakteri dapat memfermentasi glukosa dan menghasilkan produk yang bersifat asam sehingga pH media pertumbuhan menjadi asam. Penambahan indikator MR dapat menunjukkan perubahan pH pada media, *methyl red* akan menjadi merah pada suasana asam dan berwarna kuning pada suasana basa.



**Gambar 64.** Hasil Uji pada Media MR-VP

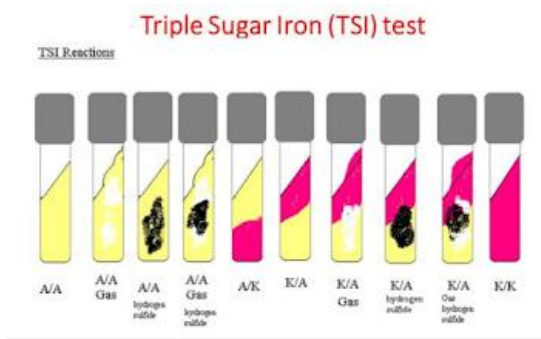
Hasil uji terhadap bakteri *Pseudomonas* menunjukkan hasil yang positif yang ditandai dengan media uji Simmon's Citrate membentuk warna biru. Uji ini bertujuan untuk mengetahui adanya sitrat yang dapat digunakan sebagai sumber karbon menghasilkan suasana alkalis.



**Gambar 65.** Hasil Uji pada Media *Simmon's Citrat*

Pada uji gula glukosa, sukrosa dan laktosa terhadap *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*). Uji TSIA bertujuan untuk membedakan jenis bakteri berdasarkan kemampuan memecah dextrosa, laktosa, sukrosa dan pembebasan sulfide serta mengetahui apakah bekateri tersebut menghasilkan gas  $H_2S$  atau tidak. Media TSIA mempunyai dua bagian yaitu *slant* (miring) dan *butt* (tegak). Apabila bagian *slant* berubah menjadi warna merah atau merah muda berarti bakteri yang tumbuh membuat kondisi media basa, glukosa telah difermentasi bakteri sebagai sumber energi dan pepton dimanfaatkan sebagai sumber energi. Jika media TSIA berubah menjadi warna kuning diakibatkan bakteri membuat kondisi media menjadi asam dan disertai dengan pembentukan gas. Pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* jika terbentuk gas  $H_2S$  menunjukkan adanya perubahan warna parsial, dimana

sebagian media tetap berwarna merah dan sebagian sudah berubah menjadi kuning. Indikasi adanya H<sub>2</sub>S bila terbentuk adanya gas ditandai dengan adanya gelembung pada media atau media akan terangkat ke atas.



Gambar 66. Hasil Uji pada Media TSIA

**Tabel 10.** Interpretasi Uji Media TSIA

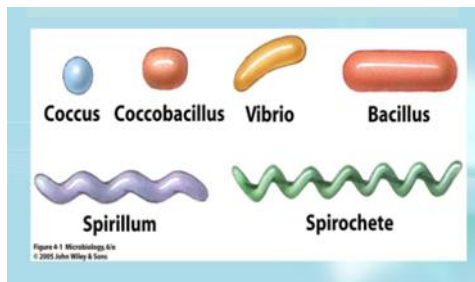
<b>Media Slant (Miring)</b>	<b>Media Butt (Tegak)</b>	<b>Interprestasi</b>
Merah	Kuning	Fermentasi glukosa saja, pepton dikatabolisme
Kuning	Kuning	Fermentasi glukosa dan laktosa dan/ atau sukrosa
Merah	Merah	Tidak ada fermentasi, pepton dikatabolisme
Merah	Tidak ada perubahan	Tidak ada perubahan, pepton digunakan secara aerobik
Kuning	Kuning + gelembung udara	Fermentasi glukosa dan laktosa dan/atau sukrosa, gas diproduksi

Merah	Kuning + gelembung udara	Fermentasi glukosa saja; gas diproduksi
Merah	Kuning + gelembung udara + endapan hitam	Fermentasi glukosa saja; gas diproduksi; H <sub>2</sub> S diproduksi
Merah	Kuning + endapan hitam	Fermentasi glukosa saja; H <sub>2</sub> S diproduksi
Kuning	Kuning + endapan hitam	Fermentasi glukosa dan laktosa dan/atau sukrosa, H <sub>2</sub> S diproduksi
Tidak ada perubahan	Tidak ada perubahan	Tidak ada fermentasi



### 15.1 Bentuk Sel Bakteri

Bentuk dasar bakteri adalah bulat (tunggal: kokus, jamak: cangkang, batang atau silinder (tunggal: basil, jamak: basil) dan spiral, berbentuk seperti batang melengkung atau bulat. Bentuk cangkangnya biasanya bulat atau lonjong. Ketika korteks membelah, sel-selnya mungkin tetap menempel satu sama lain. Basil membelah hanya sepanjang sumbu pendeknya (dalam satu bidang). Kebanyakan basil tampak sebagai batang tunggal. Bakteri spiral mempunyai satu atau lebih lengkungan dan bentuknya tidak lurus. Bakteri berbentuk spiral ini terbagi menjadi beberapa jenis. Bakteri yang bentuk batangnya melengkung menyerupai koma disebut Vibrio. Bakteri dengan sumbu kaku disebut spirochetes, sedangkan bakteri dengan sumbu fleksibel disebut spirochetes. Kebanyakan bakteri berdiameter 0,2 hingga 2,0 mm dan panjang sekitar 2 hingga 8 mm. Biasanya, sel bakteri muda jauh lebih besar dibandingkan sel tua.



Gambar 67. Bentuk Bentuk Sel Bakteri



Mikroorganisme sangat sulit dilihat dengan mikroskop cahaya, karena tidak mengabsorpsi atau membiaskan cahaya. Oleh karena itu yang menyebabkan zat warna digunakan untuk mewarnai mikroorganisme atau latar belakangnya. Bakteri yang masih hidup tidak nampak jelas bentuk maupun sifat morfologi lainnya. Bakteri tunggal berupa satu sel saja hanya kelihatan bening saja, untuk memperlihatkan bagian-bagian sel, flagel, spora diperlukan pewarnaan.

### **Pewarnaan Spora**

Spora dibentuk oleh bakteri tertentu untuk mengatasi lingkungan yang tidak menguntungkan bagi bakteri tersebut. Spora pada bakteri merupakan struktur yang tahan panas dan tahan bahan kimia. Bakteri pembentuk spora diantaranya *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermoactinomyces*, *Sporosarcina*. Spora yang terbentuk di dalam sel dinamakan *endospora* dan spora yang terbentuk di luar sel dinamakan *eksospora*. Pada bakteri hanya terdapat 1 spora. Spora pada bakteri tidak berfungsi untuk perkembangbiakan. Spora tahan terhadap suhu dan bahan kimia yang mematikan sel vegetatif, contohnya spora *Clostridium botulinum* terhadap suhu mendidih selama beberapa jam.

Lapisan luar spora memberikan penghalang yang baik terhadap bahan kimia sehingga spora sangat sulit ternoda. Spora bakteri dapat diwarnai dengan pemanasan. Pemanasan ini menyebabkan lapisan luar spora mengembang sehingga zat warna dapat meresap. Bahan yang digunakan untuk mewarnai spora dapat berupa larutan hijau perunggu dan larutan safranin.

### **Pewarnaan Kapsula**

Kapsula merupakan lapisan yang melekat di luar dinding sel yang terdiri dari polisakarida atau polipeptida dengan ketebalan 1-2  $\mu\text{m}$ . Fungsi kapsula adalah untuk melekatkan diri pada permukaan dan melindungi bakteri terhadap sel-sel fagosit. Beberapa bakteri menyebabkan penyakit karena kemampuannya mensintesis kapsula adalah *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae*, dan *Streptococcus mutans*.

Lapisan kapsula cukup tebal, sehingga dapat dilihat dengan mikroskop cahaya, akan tetapi sulit diwarnai sehingga perlu diberi pewarnaan khusus. Kapsula tidak menyerap warna sehingga terlihat lapisan terang dan tembus dengan latar belakang yang berwarna. Salah satu cara dengan larutan formol-gentian violet Raebiger.

## Pewarnaan Flagela

Flagela adalah salah satu struktur yang memungkinkan bakteri bergerak. Ketebalan flagela adalah 0,025 sehingga sulit dilihat di bawah mikroskop cahaya. Untuk melihat flagela digunakan cara khusus yaitu dengan menambahkan larutan kimia Mordant yang menggembungkan flagela sehingga dapat dilihat dengan mikroskop optik.

**Tabel 11.** Komposisi Zat Pewarna Flagela Bakteri

Komposisi	Jumlah
Aluminium Potassium Phosphate	57 gram
Fenol	25 gram
Tannic Acid	20 gram
Kristal violet	6 gram
Akuadest steril	1 liter

Prosedur pewarnaan flagela bakteri ada beberapa tahapan, sebagai berikut :

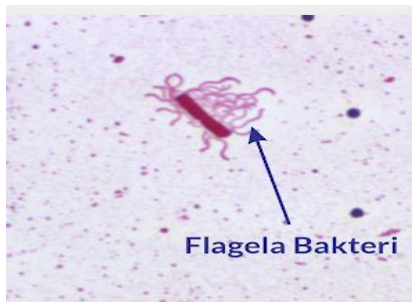
1. Persiapan zat pewarna flagela bakteri
  - a. Siapkan komponen zat pewarna flagela antara lain aluminium potassium phosphate, fenol, tannic acid, kristal violet dan akuades steril.
  - b. Timbang masing-masing komponen
  - c. Campurkan masing-masing komponen ke dalam 1 Liter akuadest steril secara bergantian, dimulai dari komponen aluminium potassium phosphate.
  - d. Aduk larutan dan pastikan semua komponen larut sempurna.

2. Persiapan dan Mengamati Motilitas Bakteri
  - a. Bakteri yang akan diwarnai struktur flagelnya, ditumbuhkan terlebih dahulu pada media Blood Agar selama 16-24 jam pada suhu ruang.
  - b. Cek motilitas bakteri dengan cara meneteskan akuades steril pada permukaan obyek glass.
  - c. Ambil satu ose koloni bakteri dari media Blood Agar dan usapkan pada permukaan obyek glass yang sudah ditetesi akuades steril.
  - d. Tutup ulasan dengan cover glass secara perlahan lahan.
  - e. Amati preparat dibawah mikroskop dengan perbesaran dimulai dari 40x.
  - f. Apabila bakteri mempunyai tanda-tanda motilitas setelah diamati dibawah mikroskop, dilanjutkan untuk melakukan prosedur pewarnaan flagela. Jika tidak ada tanda-tanda motilitas sel bakteri, maka tidak perlu melakukan pewarnaan flagela.
3. Pewarnaan flagela bakteri
  - a. Apusan bakteri pada obyek glass tadi didiamkan 5-10 menit agar sel-sel bakteri melekat kuat di permukaan obyek glass atau cover glass.
  - b. Teteskan zat pewarna flagela melalui tepi cover glass secara perlahan hingga zat pewarna meresap ke dalam cover glass secara kapilaritas.
  - c. Diamkan 5-10 menit agar larutan alkohol menguap dan zat pewarna meresap untuk mewarnai sel dan flagela bakteri.
  - d. Amati apusan bakteri di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x menggunakan minyak imersi.
  - e. Hasil pewarnaan flagela bakteri akan memberi warna biru tua atau ungu pada sel dan flagela bakteri.
  - f. Flagela bakteri berbentuk seperti serabut panjang yang terletak di permukaan dinding sel bakteri.

**Tabel 12.** Contoh Bakteri dan Tipe Flagela Bakteri

Tipe Flagela	Contoh Spesies Bakteri
Tidak berflagela	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

Monotrik	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Amfitrik	<i>Alkaligenes faecalis</i>
Lofotrik	<i>Sprillum</i>
Peritrik	<i>Proteus vulgaris</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Escherichia coli</i>



**Gambar 68.** Flagela pada Bakteri

## 15.2 Pewarnaan Badan Inklusi

Badan inklusi atau granula dapat disintesis beberapa bakteri yang disimpan dalam sitoplasma. Badan inklusi berupa granula metakromatik, asam poli-beta-hidroksibutirat, pati dan glikogen. Granula metakromatik merupakan cara sel bakteri menyimpan kelebihan ion fosfat dalam sel dan hal ini ditemukan pada genus *Bacillus* dan *Corynebacterium*. Granula ini sebagai ciri untuk identifikasi.

## Pewarnaan Gram

Pewarnaan sel bakteri secara Gram merupakan salah satu prosedur yang penting dan paling banyak digunakan dalam klasifikasi bakteri. Metode pewarnaan ini ditemukan oleh Christian Gram, seorang bakteriolog asal Denmark pada tahun 1884. Melalui metode ini bakteri dapat dibedakan menjadi dua kelompok besar, yaitu:

1. Bakteri Gram Positif, yang berwarna ungu pada akhir pewarnaan, dan

2. Bakteri Gram Negatif, yang berwarna merah/merah muda pada akhir pewarnaan.

Pewarnaan gram mampu membedakan suatu kelompok bakteri tertentu dari kelompok lainnya, oleh sebab itu pewarnaan ini juga disebut pewarnaan diferensial. Prosedur pewarnaan Gram terdiri dari persiapan apusan, pewarnaan Gram, dan pemeriksaan di bawah mikroskop.

a. *Persiapan Apusan*

Cara mempersiapkan apusan bakteri yang akan diwarnai adalah:

- 1) *Inoculating loop* disterilkan pada api bunsen hingga memerah, kemudian tunggu dingin selama sekitar 30 detik. Jika *loop* masih panas saat spesimen diambil, maka sel bakteri yang diambil dapat mengalami kerusakan.
- 2) Dengan menggunakan kaca objek (*slide glass*) bersih, sampel bakteri/spesimen yang telah diambil diusapkan di tengah kaca objek. Jika spesimen diambil dari *agar plate*, beri 1 tetes air untuk membuat suspensi terlebih dulu. Hal ini bertujuan agar sel yang diamati tidak bertumpuk sehingga menyulitkan identifikasi.
- 3) Dengan menggunakan *inoculating loop*, spesimen diapuskan di atas kaca objek sampai didapatkan lapisan yang tipis, kemudian keringkan di udara
- 4) Kaca objek dipanaskan dengan melewatkannya di atas api bunsen sebanyak 2-3 kali agar spesimen terfiksasi

b. *Pewarnaan Gram*

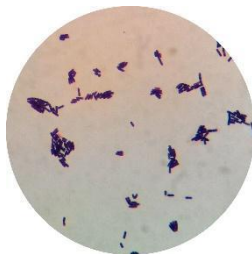
Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara :

- 1) Cairan pewarna kristal violet diteteskan pada kaca preparat secara merata pada apusan spesimen, ditunggu selama 1 menit agar kristal violet terserap merata.
- 2) Preparat dimiringkan dan dibilas dengan sedikit air mengalir secara hati-hati agar tidak menghilangkan apusan spesimen.
- 3) Kemudian dituangkan cairan mordant pada preparat, didiamkan selama 1 menit

- 4) Kaca preparat dimiringkan kembali dan dibilas dengan sedikit air mengalir secara hati-hati
- 5) Kemudian dilakukan dekolorisasi dengan cara meneteskan cairan dekolorant sedikit demi sedikit pada preparat hingga tidak ada zat warna yang mengalir keluar dari preparat
- 6) Preparat dibilas dengan air mengalir secara hati-hati untuk mencegah hilangnya spesimen.
- 7) *Counterstain* (safranin) diteteskan pada preparat, dидiamkan selama 30 detik sampai 1 menit
- 8) Preparat dibilas dengan air mengalir, kemudian dikeringkan dengan menyerap cairan menggunakan tissue.

c. *Pemeriksaan Mikroskopik*

- 1) Pengamatan preparat dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100 kali, 400 kali, hingga 1000 kali.
- 2) Bakteri gram positif menunjukkan warna sel biru keunguan, sedangkan bakteri gram negatif menunjukkan warna sel merah hingga merah muda. Interpretasi hasil pewarnaan Gram dapat dilihat pada Gambar 64.



(a)



(b)

Gambar 69. Hasil pewarnaan Gram (a) gram positif (b) gram negatif

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, D. A., Ridwan, M., & Sulkifli, S. (2022). Sistem penerimaan bahan baku ikan lemuru (*sardinella. sp*) pada pengalengan ikan sarden di pt sarana tani pratama jembrana, bali. *Journal of Applied Agribusiness and Agrotechnology*, 1(1), 11-20.
- Yauwnita, J., Toh, J., & Dyancandra, G. N. (2022). Proses pengalengan ikan sarden tutul/ikan sembulak (*Amblygaster sirm*) di PT. Munchar Banyuwangi.
- Yuanisa, Nuria Awin (2017) *Pengaruh konsentrasi sari buah nanas (Ananas comosus) dan lama fermentasi terhadap kualitas kecap ikan lemuru (Sardinella longiceps)*. Undergraduate thesis, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Khariri, Khariri, et al. "Waktu Regenerasi Bakteri *Vibrio Cholerae* Pada Medium Apw." *Buletin Penelitian Kesehatan*, vol. 43, no. 1, Mar. 2015, doi:[10.22435/bpk.V43i1.3966.35-40](https://doi.org/10.22435/bpk.V43i1.3966.35-40)
- Dhinaranata, I. G. P. (2011). Identifikasi serotipe bakteri *Vibrio cholerae* yang terisolasi dari es batu jenis tube dan jenis balok dari pedagang Makanan dan minuman di Kota Denpasar, Bali. *E-jurnal medika udayana*, 3(1).
- Roberts, D. & Greenwood, M.(2003). *Practical Food Microbiology*.Third Edition.Blackwell Publishing. United Kingdom
- Suliyarningsih, S. (2020). *Identifikasi Bakteri Vibrio Cholerae Pada Kerang Hijau (Perna Viridis) Yang Dijual Di Pasar Legi Jombang* (Doctoral dissertation, STIKes Insan Cendekia Medika Jombang).
- Wayan, I. Y. W. (2015). *Keberadaan Bakteri patogen Vibrio cholera pada Beberapa Hasil Perikanan yang Dijual di Pasar Tradisional*

Kota Denpasar (Doctoral dissertation, Tesis]. Program Studi Biologi Universitas Udayana, Denpasar).

Mewengkang, H. W. (2010). Identifikasi *Vibrio* sp pada Gonad Ikan Cakalang (*Katsuwonus pelamis* L). *Jurnal Perikanan dan Kelautan Tropis*, 6(1), 18-21.

Kenneth Todar. (2020).  
<https://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>.  
<https://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>

Rahmadian, C. A., Ismail, Abrar, M., Erina, Rastina, & Fahrimal, Y. (2018). Isolasi dan identifikasi bakteri *Pseudomonas* sp pada ikan asin di tempat pelelangan ikan Labuan Haji Aceh Selatan. *Jurnal Jimvet*, 2(4), 493–502.

Soedarto, S. (2016). '*Infeksi nosokomial di rumahsakit. hospital nosocomial infections*', (January), p. 4. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/310293816>.  
November.

Suliyarningsih, S. (2020). *Identifikasi Bakteri Vibrio Cholerae Pada Kerang Hijau (Perna Viridis) Yang Dijual Di Pasar Legi Jombang* (Doctoral dissertation, STIKes Insan Cendekia Medika Jombang).

Kay BA, Bopp CA, Wells JG. (1994). *Vibrio cholerae and Cholera: Molecular to Global Perspectives*. Washington DC: ASM Pr.

Suyati. (2010). Identifikasi dan Uji Antibiotik Bakteri Gram-Negatif Pada Sampel Urin Penderita Infeksi Saluran Kemih (ISK). [Skripsi]. Jursan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Papua Manokwari

Subagiyo, A., Rezaldi, F., Ma'ruf, A., Pertiwi, F. D., & Safitri, A. (2022). Antibakteri *Vibrio parahaemolyticus* dan *Klebsiella pneumoniae* pada Sediaan Sabun Mandi Probiotik Fermentasi Kombucha



Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L) Sebagai Produk Bioteknologi Farmasi. *Journal of Biotechnology and Conservation in WALLACEA*, 2(2), 89-98.

Marlina, R., Wibowo, R. S., dan Andalas, F. F. U. (2008). Identifikasi Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dengan Metode Biologi dan Deteksi Gen ToxR nya Secara PCR. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*, 11-17.

Badan Standarisasi Nasional. (2008). Cara Uji Mikrobiologi -Bagian 4: Penentuan *Vibrio cholerae* pada Produk Perikanan. SNI01-2332.4-2006

Tarmizi, A., & Baining, M. E. (2020). *analisis pengaruh persepsi dan preferensi terhadap keputusan pembelian ikan sarden kemasan kaleng yang bersertifikat halal (studi pada masyarakat muslim kota jambi)* (Doctoral dissertation, UIN Sulthan Thaha Saifuddin Jambi).

Kharirie, K. (2013). Diagnosa *Vibrio Cholerae* dengan Metode Kultur dan Polimerase Chain Reaction (PCR) pada Sampel Sumber Air Minum. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*, 2(2), 43-49.

Ananta, I. P. W. S., Wijaya, I. G. M., Dhinarananta, I. G. P., Yuniadi, P. A., & Hendrayana, M. A. (2011). Identifikasi serotipe bakteri *Vibrio cholerae* terisolasi dari es bahan pengawet ikan yang digunakan oleh pedagang hasil laut pasar modern dan pasar tradisional di KOTA DENPASAR. *Journal of Microbiology. Udayana University Medical Faculty*.

Methods for Microbiological examination of food and animal feeding stuffs Part 14 Detection of *Vibrio parahaemolyticus*. BS5763: Part 14: 1991 ISO 89.

Timur, H. D. L. (2017). *Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Endofit Mangrove Sonneratia Alba Penghasil Enzim Gelatinase Dari Pantai*

*Sendang Biru, Malang, Jawa Timur* (Doctoral dissertation,  
Universitas Brawijaya).

## GLOSARIUM

**Bakteri pathogen** : Bakteri yang dapat menimbulkan penyakit baik melalui invasi langsung atau mencemari makanan.

**Bakteri pembusuk** : Bakteri yang menyebabkan sesuatu (daun, makanan, dsb) menjadi busuk

**Colony counter** : Alat yang digunakan untuk menghitung koloni bakteri yang tumbuh pada suatu media yang disimpan dalam cawan petris. Ada penghitung koloni otomatis dan semi otomatis. Untuk penghitung koloni otomatis, penghitungan dilakukan secara otomatis oleh sistem komputer.

**Genus** : Bagian pertama dari nama ilmiah makhluk hidup yang menggunakan tata nama ganda

**Hidrolisis** : Reaksi kimia antara air dan zat lain menghasilkan satu atau lebih zat baru dan juga menyebabkan larutan terurai ketika air digunakan.

**Inkubasi** : Proses pemeliharaan kultur bakteri selama jangka waktu tertentu dengan temperatur tertentu untuk melihat perkembangan suatu bakteri.

**Inokulasi**: Pekerjaan memindahkan bakteri dari medium yang lama ke medium yang baru.

**Kapang** : Mikroorganisme tersusun atas banyak sel berbentuk filamen halus yang disebut hifa, kumpulan filamen jamur yang disebut hifa, yang berkembang biak dengan spora.

**Khamir** : Mikroorganisme bersel tunggal berbentuk bulat lonjong dan berkembang biak melalui pembentukan tunas atau askospora, tetapi tidak membentuk miselium

**Koloni** : Kumpulan sel mikroorganisme yang tumbuh pada media agar dan dapat dilihat secara visual

**Media agar** : Media padat yang digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisme

**Koloni** : Sekelompok sel yang dapat dilihat secara langsung dengan mata. Koloni bakteri dapat berbentuk bulat, tak beraturan dengan permukaan cembung, cekung atau datar serta tepi koloni rata atau bergelombang

**Kontrol negatif** : kelompok perlakuan yang tidak dapat menghasilkan efek atau memberikan efek perubahan pada variabel tergantung.

**Kultur** : Metode memperbanyak mikroba pada media kultur dengan pembiakan di laboratorium yang terkendali secara aseptis, untuk menentukan jenis dari organisme.

**Sampel** : wakil atau sebagian dari populasi yang memiliki sifat dan karakteristik yang sama yang menggambarkan dan dapat mewakili seluruh populasi yang diteliti.

**Spora** : unit reproduksi baik seksual maupun aseksual pada bakteri, algae, fungi, dan sebagian tumbuhan seperti lumut dan tumbuhan paku.

**Sterilisasi** : pemusnahan atau eliminasi semua mikroorganisme, termasuk spora bakteri, yang sangat resisten.

**Vortex mixer** : alat atau instrumen laboratorium yang digunakan untuk mencampurkan suatu bahan hingga tercampur dengan seragam

**Yeast** : Mikroorganisme adalah jamur uniseluler yang menyebabkan fermentasi. Ragi biasanya mengandung mikroorganisme yang melakukan proses fermentasi dan merupakan media kultur mikroorganisme tersebut.

## PROFIL PENULIS



**Sumartini, S.Pi, M.Sc.** lahir di Surabaya, 12 September 1991 adalah pengajar dan peneliti di Politeknik Kelautan dan Perikanan Dumai. Saat ini penulis juga diamanahkan sebagai Kepala Satuan Pengawas Internal (SPI) di Politeknik Kelautan dan Perikanan Dumai. Penulis menempuh S1 Teknologi Hasil Perikanan di Universitas Diponegoro dan S2 Ilmu dan Teknologi Pangan di Universitas Gadjah Mada. Saat ini mengajar sebagai dosen Pengolahan Hasil Laut di Politeknik Kelautan dan Perikanan Dumai



**Devi Wulansari**, Penulis lahir di Semarang, 15 Desember 1986 merupakan seorang pengajar dan peneliti di Politeknik Kelautan dan Perikanan Karawang. Penulis menempuh S1 Teknologi Hasil Pertanian di Universitas Semarang dan S2 Program Magister Teknologi Pangan Universitas Katolik Soegijapranata Semarang. Mata kuliah yang diampu oleh penulis adalah Manajemen Mutu Terpadu, Pengelolaan Laboratorium Pengujian Mutu Hasil Perikanan, Mikrobiologi Hasil Perikanan, Diversifikasi dan Pengembangan Produk Perikanan. Saat ini penulis juga diamanahkan sebagai Ketua Program Studi Teknik Peengolahan Produk Perikanan di Politeknik Kelautan dan Perikanan Karawang.

**Susi Ratnaningtyas**, Penulis lahir di Trenggalek, 4 Desember 1990 merupakan seorang pengajar dan peneliti di Politeknik Kelautan dan



Perikanan Karawang. Penulis menempuh jenjang S1 di Program Studi Biologi Universitas Negeri Malang dan S2 di Program Studi Mikrobiologi Institut Pertanian Bogor. Saat ini penulis diberi amanah sebagai Sekretaris Program Studi Teknik Pengolahan Produk Perikanan di Politeknik Kelautan dan Perikanan Karawang. Penulis juga sebagai pengampu matakuliah Mikrobiologi Dasar, Mikrobiologi Hasil Perikanan, Manajemen Mutu Terpadu, Pengelolaan Laboratorium Pengujian Mutu Hasil Perikanan, Mikrobiologi Hasil Perikanan, dan Akreditasi dan Standardisasi.



**Rika Sebtiana Kristantri**, Penulis lahir di Semarang, 10 Mei 1987 merupakan seorang pengajar di Stifar Yayasan Pharmasi Semarang. Penulis menempuh S1 Teknologi Hasil Pertanian di Universitas Semarang dan S2 Program Magister Teknologi Pangan Universitas Katolik Soegijapranata Semarang. Mata kuliah yang diampu oleh penulis adalah Mikrobiologi & Teknik Analisis Hayati, dan Teknologi Makanan. Saat ini penulis juga diamanahkan sebagai Sekretaris Program Studi D3 Analisis Farmasi dan Makanan Stifar Yayasan Pharmasi Semarang.

**Putri Wening Ratrinia S.Pi, M.Si**, lahir di Kendal, 28 Januari 1993. Penulis merupakan seorang pengajar dan peneliti di Politeknik Kelautan dan Perikanan Dumai di Program Studi Pengolahan Hasil Laut. Selain



sebagai pengajar, penulis diamanahkan sebagai Kepala Unit Prestasi dan Kepala Unit Teaching Factory dan Kewirausahaan di Politeknik Kelautan dan Perikanan Dumai. Penulis menempuh pendidikan S1 Teknologi Hasil Perikanan di Universitas Diponegoro dan S2 Teknologi Hasil Perairan Institut Pertanian Bogor. Saat ini penulis mengampu mata kuliah Mikrobiologi Dasar, Mikrobiologi Hasil Perikanan, Teknologi Pengolahan Hasil Perikanan, Teknik Pengemasan dan Pelabelan, dan Bioteknologi Hasil Perikanan.



**Azmi Nur Fauzia** lahir di Subang, 20 Juli 2001 adalah taruna Politeknik Kelautan dan Perikanan Karawang. Penulis kuliah D3 di Politeknik Kelautan dan Perikanan Karawang dari tahun 2020 – sekarang. Selama masa kuliah, penulis belajar, mengenai mata kuliah Bahan Tambahan dan Bahan Penolong, Teknologi Pengolahan Produk Perikanan, Mikrobiologi Dasar, Karya Tulis Ilmiah, dan Pengoperasian Mesin Perikanan. Saat ini penulis sedang menyelesaikan studinya yang sudah menginjak semester 3 dan juga berperan sebagai duta kampus tahun 2022-2023 Kampus Politeknik Kelautan dan Perikanan Karawang maupun yang di selenggarakan oleh Kementerian Kelautan dan Perikanan.



Diterbitkan oleh:

AMaFRaD  PRESS

Badan Penyuluhan dan  
Pengembangan SDM Kelautan dan Perikanan  
Gedung Mina Bahari III, Lantai 6,  
Jln. Medan Merdeka Timur No. 16 – Jakarta Pusat  
10110  
(021) 3519070 FAKSIMILE (021) 3513287  
Email: [amafradpress@gmail.com](mailto:amafradpress@gmail.com)  
Nomor IKAPI: 501/DKI/2015

