

MODUL PRAKTIKUM BAKTERIOLOGI AIR, MAKANAN DAN MINUMAN

**BAGI MAHASISWA PRODI
TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIK**

Disusun oleh :

Dr. Elisa Rinihapsari, M.Si.Med
Suryani M.Florence Situmeang, S.Pd, M.Kes
Siti Aminah, S.Pd, M.Kes
Hafiz Al Farizi, S.Tr.Kes, M.Kes
Andreas Putro Ragil Santoso, S.S.T, M.Si
Neiny Prisy Foekh, S.ST, Miomed
Anas Fadli Wijaya, SST, M.Imun
Iis Herawati, S.Pd, M.Kes

Reviewer :

Dra. Estu Lestari, MM



**ASOSIASI INSTITUSI PENDIDIKAN TINGGI
TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIK INDONESIA (AIPTLMI)
2025**

MODUL PRAKTIKUM
BAKTERIOLOGI AIR, MAKANAN DAN MINUMAN



Disusun oleh :

Dr. Elisa Rinihapsari, M.Si.Med
Suryani M.Florence Situmeang, S.Pd, M.Kes
Siti Aminah, S.Pd, M.Kes
Hafiz Al Farizi, S.Tr.Kes, M.Kes
Andreas Putro Ragil Santoso, S.S.T, M.Si
Neiny Prisy Foekh, S.ST, M.Biomed
Anas Fadli Wijaya, SST, M.Imun
Iis Herawati, S.Pd, M.Kes

Reviewer:

Dra. Estu Lestari, MM

ASOSIASI INSTITUSI PENDIDIKAN TINGGI
TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIK INDONESIA
(AIPTLMI)
2025

DAFTAR ISI

BAB I PENGAMBILAN & PENANGANAN SPESIMEN AIR, MAKANAN, DAN SWAB LINGKUNGAN.....	1
BAB II PEMERIKSAAN ANGKA KUMAN (ANGKA LEMPENG TOTAL)	11
BAB III PEMERIKSAAN ANGKA PALING MUNGKIN (APM) KOLIFORM DAN <i>Escherichia coli</i>	22
BAB IV PEMERIKSAAN IDENTIFIKASI BAKTERI <i>Escherichia coli</i>	40
BAB V PEMERIKSAAN DAN PERHITUNGAN BAKTERI <i>Staphylococcus aureus</i>	49
BAB VI PEMERIKSAAN BAKTERI <i>Salmonella sp</i>	59
BAB VII PEMERIKSAAN BAKTERI <i>Shigella sp</i>	70
BAB VIII PEMERIKSAAN BAKTERI <i>Vibrio sp</i>	78
BAB IX PEMERIKSAAN <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	86
BAB X PEMERIKSAAN BAKTERI <i>Bacillus cereus</i>	94
BAB XI PEMERIKSAAN BAKTERI <i>Listeria monocytogenes</i>	109

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa karena atas rahmat dan penyertaan-Nya, modul Praktikum Bakteriologi Air, Makanan, dan Minuman ini dapat disusun dan diselesaikan dengan baik. Modul ini disusun sebagai panduan pembelajaran bagi mahasiswa Teknologi Laboratorium Medik (TLM) dalam memahami konsep dasar, teknik pemeriksaan, serta interpretasi hasil bakteriologi yang berkaitan dengan kualitas air, makanan, minuman, dan lingkungan.

Sebagai calon tenaga kesehatan di bidang laboratorium, mahasiswa TLM diharapkan memiliki kemampuan teknis yang baik, ketelitian dalam bekerja, serta penguasaan prosedur pemeriksaan mikrobiologi sesuai standar. Oleh karena itu, modul ini dirancang secara sistematis, dimulai dari pengambilan dan penanganan spesimen, pemeriksaan angka kuman, hingga identifikasi bakteri-bakteri patogen penting seperti *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Vibrio sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, dan *Listeria monocytogenes*.

Dengan penyajian langkah kerja yang jelas, tujuan pembelajaran yang terukur, serta penjelasan yang mudah dipahami, diharapkan modul ini dapat menjadi acuan praktis bagi mahasiswa dalam melaksanakan kegiatan praktikum bakteriologi secara benar dan terstandar.

Sebagai Ketua AIPTLMI, saya menyampaikan ucapan terima kasih dan apresiasi yang sebesar-besarnya kepada seluruh tim penyusun modul yang telah bekerja dengan penuh dedikasi, ketelitian, dan komitmen untuk menghasilkan bahan ajar yang berkualitas. Kerja keras tim penyusun merupakan kontribusi nyata bagi peningkatan mutu pendidikan Teknologi Laboratorium Medik di seluruh Indonesia. Saya menyadari bahwa modul ini masih memiliki ruang untuk disempurnakan. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun sangat kami harapkan untuk pengembangan modul ini pada edisi selanjutnya.

Akhir kata, semoga modul ini dapat memberikan manfaat yang luas bagi mahasiswa, dosen, institusi pendidikan TLM, dan seluruh pihak yang berkepentingan dalam pengembangan kompetensi bidang bakteriologi.

Jakarta, Oktober 2025
Ketua Umum AIPTLMI

Prof. Dr. Budi Santosa, M.Si.Med.

BAB I

PENGAMBILAN & PENANGANAN SPESIMEN AIR, MAKANAN, DAN SWAB LINGKUNGAN

A. TUJUAN UMUM

Mahasiswa mampu merencanakan, mengambil, melakukan pemeriksaan bakteriologis spesimen air, makanan dan minuman sesuai standar operasional prosedur

B. TUJUAN KHUSUS

Mahasiswa mampu melakukan prosedur pengambilan dan penanganan sampel makanan, air, dan *swab* lingkungan secara tepat.

C. DASAR TEORI

Makanan sering diambil sampelnya di seluruh rantai pasokan makanan, dari produsen hingga konsumen, untuk tujuan memeriksa kualitasnya. Definisi yang jelas tentang rencana pengambilan sampel merupakan bagian integral dari spesifikasi untuk pengambilan sampel dan pengujian makanan. Pengambilan sampel memainkan peran penting untuk melindungi kesehatan konsumen dan memastikan praktik yang adil dalam perdagangan makanan.

Kualitas dan kondisi sampel atau spesimen yang diterima untuk analisis laboratorium merupakan aspek yang sangat krusial dalam menjamin validitas hasil pemeriksaan. Ketidaktepatan dalam proses pengumpulan dan penanganan sampel, atau apabila sampel yang diambil tidak merepresentasikan keseluruhan lot, dapat menyebabkan hasil pengujian menjadi tidak akurat dan tidak dapat diinterpretasikan secara ilmiah. Mengingat bahwa evaluasi terhadap sejumlah besar produk makanan kerap didasarkan pada sejumlah kecil sampel, maka sangat penting untuk menerapkan prosedur pengambilan sampel yang baku dan konsisten. Keberadaan sampel yang representatif sangat penting, khususnya ketika kontaminan mikrobiologis seperti patogen atau toksin yang tersebar secara sporadis dalam produk. Jumlah sampel yang representatif juga sangat penting diperhatikan apabila keputusan penolakan suatu produk bergantung pada kadar mikroorganisme dengan batas ketentuan yang diatur secara hukum.

Jumlah unit dalam satu pengambilan sampel harus ditentukan secara statistik agar mampu mewakili lot produk secara valid. Komposisi dan karakteristik masing-masing lot sangat memengaruhi homogenitas serta

k eseragaman massa sampel yang dihasilkan. Oleh sebab itu, prosedur pengambilan sampel perlu disesuaikan dengan bentuk fisik bahan pangan—apakah padat, setengah padat, kental, atau cair—dan harus dilakukan oleh petugas terlatih berdasarkan pedoman teknis yang berlaku.

Sebisa mungkin, sampel dikirimkan ke laboratorium dalam kemasan asli yang belum dibuka. Apabila ukuran wadah tidak memungkinkan untuk dikirimkan secara utuh, maka sebagian produk harus dipindahkan ke dalam wadah steril secara aseptik agar tetap representatif. Penggunaan alat sampling steril dan penerapan teknik aseptik mutlak diperlukan dan tidak boleh dikompromikan. Peralatan seperti sendok, pinset, spatula, serta gunting berbahan stainless steel harus disterilisasi menggunakan autoklaf atau oven pemanas kering. Teknik sterilisasi dengan menggunakan nyala api dari bunsen atau pembakaran alkohol dianggap tidak aman dan kurang efektif.

Sampel hendaknya dikemas dalam wadah yang bersih, kering, steril, tidak mudah bocor, bermulut lebar, dan sesuai ukurannya dengan jenis sampel. Wadah seperti toples plastik atau kaleng logam yang dapat ditutup rapat (hermetik) lebih direkomendasikan. Penggunaan wadah kaca sebaiknya dihindari karena risiko pecah dan potensi kontaminasi produk. Untuk bahan kering, dianjurkan menggunakan wadah logam steril, kantong, atau kemasan khusus yang memiliki penutup kedap udara. Kantong plastik steril hanya digunakan untuk bahan kering yang tidak memerlukan pembekuan, sementara botol plastik dapat digunakan untuk jenis sampel linier. Penting untuk menghindari pengisian kantong secara berlebihan dan mencegah terjadinya tusukan. Setiap unit sampel harus diberi identifikasi menggunakan label dari kertas perekat yang bertuliskan informasi yang jelas; penggunaan spidol pada permukaan plastik harus dihindari karena risiko migrasi tinta. Disarankan agar setiap unit sampel memiliki berat minimal 100 gram. Sebagai kontrol, disertakan juga wadah steril dalam kondisi terbuka dan tertutup.

Sampel harus segera dikirim ke laboratorium dengan mempertahankan kondisi penyimpanan serupa dengan kondisi awal produk. Untuk sampel cair, diperlukan tambahan sampel sebagai kontrol suhu. Suhu sampel kontrol harus dicatat pada saat pengambilan dan saat penerimaan di laboratorium, disertai pencatatan waktu dan tanggal pengambilan serta kedatangan. Produk makanan yang bersifat kering atau dikalengkan dan stabil pada suhu ruang

tidak perlu disimpan dalam kondisi dingin. Sebaliknya, produk yang memerlukan pendinginan atau pembekuan harus diangkut dalam wadah berinsulasi yang sesuai agar suhu produk tetap terjaga hingga sampai di laboratorium. Untuk sampel beku, digunakan wadah yang telah didinginkan sebelumnya dan suhu beku harus dipertahankan sepanjang pengiriman. Produk yang memerlukan penyimpanan dingin disimpan pada suhu 0–4°C dan diangkut dalam kotak pendingin dengan bahan pendingin yang memadai. Produk tersebut tidak boleh dibekukan ulang. Kecuali terdapat ketentuan lain, analisis terhadap sampel yang didinginkan harus dilakukan dalam waktu 36 jam setelah pengambilan.

D. ALAT & BAHAN

1. Spidol permanen untuk memberi label pada sampel.
2. Kantong tambahan untuk membuang sampah saat pengambilan sampel.
3. Kantong jinjing yang dapat dibawa di bahu untuk semua bahan uji.
4. Lembar/formulir/buku catatan sampel laboratorium untuk mencatat informasi produk.
5. APD yang sesuai: sarung tangan bersih, jas lab bersih, sepatu bot pengaman berujung baja, jaring rambut, helm, dll.
6. Pendingin dengan *ice pack*.
7. Botol plastik steril 8 oz/ ukuran standar 220 mL – untuk sampel air
8. Botol kaca leher lebar steril 8 oz/ ukuran standar 220 mL – untuk sampel es
9. *Kit swab* lingkungan

E. PROSEDUR

1. Pengambilan Sampel Makanan

- a. Cuci tangan Anda sebelum memulai pengambilan sampel.
- b. Kumpulkan semua sampel secara aseptik agar tidak mengontaminasi sampel. Kenakan sarung tangan bersih, jas lab bersih, dan jaring rambut.
- c. Kumpulkan LIMA unit sampel per lot kecuali ditentukan lain. Pilih sampel acak sistematis dari lot.
- d. Setiap unit sampel harus berisi setidaknya 250 g sampel makanan utuh, dalam bentuk yang akan dijual atau didistribusikan. Jika memungkinkan, ambil sampel dari wadah asli yang belum dibuka. Satu unit sampel akan terdiri lebih dari satu wadah, jika lot tersebut terdiri dari wadah yang lebih

kecil dari 250 g, misalnya tiga wadah berukuran @100 g dalam setiap unit sampel.

- e. Masukkan setiap unit sampel makanan ke dalam kantong steril terpisah yang dapat ditutup rapat atau kantong plastik bersih.
- f. Pastikan bagian atas kantong tertutup rapat.
- g. Beri label di bagian luar kantong dengan informasi detail yang akan mengidentifikasi setiap unit sampel, meliputi:
 - 1) Tanggal dan waktu pengambilan.
 - 2) Nama fasilitas dan nomor registrasi
 - 3) Ukuran dan nomor lot
 - 4) Nama produk dan jenis makanan (termasuk detail spesifik, seperti nama merek dan jenis produk, cara pengolahannya, atau bahan-bahan spesifik yang membedakannya dari produk serupa lainnya)
 - 5) Berat unit sampel
 - 6) Tanggal dan kode produksi
 - 7) Nama petugas yang mengambil sampel
- h. Gunakan kantong sampel baru untuk setiap unit sampel.
- i. Masukkan lembar sampel/formulir permintaan laboratorium ke dalam kantong plastik terpisah bersama sampel.
- j. Pastikan semua kolom pada lembar permintaan laboratorium/sampel telah diisi dan informasi yang memadai telah diberikan.
- k. Masukkan sampel makanan dan lembar sampel ke dalam pendingin yang bersih dan telah disanitasi dengan kantong es.
- l. Simpan sampel pada suhu lemari pendingin (yaitu 0 hingga 4°C) dan bawa atau kirim pendingin ke laboratorium sesegera mungkin. Suhu sampel yang didinginkan tidak boleh melebihi 7°C saat tiba di laboratorium. Sampel harus dianalisis dalam waktu 24 jam setelah pengambilan sampel.
- m. Jangan bekukan sampel kecuali telah dikonsultasikan dengan laboratorium.

2. Pengambilan Sampel Swab Lingkungan

- a. Ketentuan umum
 - 1) Semua sampel lingkungan harus diambil dari area penanganan produk makanan.

- 2) Sampel harus diambil tiga jam atau lebih setelah produksi makanan dimulai.
 - 3) Harus diambil setidaknya 10 unit sampel dengan ketentuan:
 - a) 5 atau lebih dari **permukaan yang bersentuhan dengan makanan**: Meja/ permukaan kerja, mesin pengiris, rak makanan, peralatan potong, rak yang bersentuhan dengan makanan, mesin pengemasan yang bersentuhan dengan makanan, dll.
 - b) 5 atau kurang dari **permukaan yang tidak bersentuhan dengan makanan**: saluran pembuangan di area penanganan produk jadi, selang, sakelar lampu, dinding yang dekat dengan makanan, sisi atau kaki konveyor/ meja/ wastafel/ kereta dorong/ rak/ mesin pengiris/ jenis mesin pengolah lainnya, dll.
- b. Prosedur pengambilan sampel
- 1) Cuci tangan Anda sebelum memulai pengambilan sampel.
 - 2) Kumpulkan semua sampel secara aseptis agar tidak mencemari sampel. Gunakan sarung tangan bersih, jas laboratorium bersih, dan penutup rambut.
 - 3) Sebelum pengambilan sampel, beri label pada bagian luar kantong sampel dengan informasi yang sesuai untuk mengidentifikasi area yang akan diswab:
 - a) Tanggal dan waktu pengambilan
 - b) Nama fasilitas dan nomor registrasi
 - c) Lokasi pengambilan sampel (misalnya saluran pembuangan, meja kerja, alat pemotong, alat pengisi, dll.) dan jenis permukaan (misalnya permukaan kontak makanan atau bukan kontak makanan)
 - d) Nama orang yang mengambil sampel
 - 4) Pisahkan kantong sampel dari kemasan spons.
 - 5) Pegang kantong sampel dengan tangan yang tidak digunakan untuk pengambilan sampel. Jika kedua tangan diperlukan untuk pengambilan sampel, letakkan kantong sampel di saku jas laboratorium yang bersih.
 - 6) Buka kemasan spons.

- 7) Ambil spons secara aseptis dari kemasan dengan memegang pegangan pinset steril yang disediakan bersama alat *swab*.
- 8) Gosok spons dengan kuat dan menyeluruh pada permukaan yang akan diswab.
- 9) Ukuran area yang diswab sebaiknya 30 cm x 30 cm (misalnya seukuran penggaris standar) jika memungkinkan. Untuk permukaan yang sulit dijangkau atau diswab dengan cara ini karena bentuknya, gosok area tersebut sebaik dan semaksimal mungkin.
- 10) Buka lapisan atas kantong sampel dan tarik dengan cara aseptis, menggunakan tali putih di bagian tengah atas kantong.
- 11) Masukkan spons ke dalam kantong sampel dengan hati-hati, agar tidak menyentuh bagian luar kantong, lalu lepaskan spons dari pinset.
- 12) Dengan udara seminimal mungkin di dalam kantong, tutup kantong dan gulung bagian ujungnya.
- 13) Masukkan kantong berisi sampel ke dalam kotak pendingin yang bersih dan disanitasi, bersama dengan bungkus es (*ice pack*) yang juga bersih dan disanitasi.
- 14) Gunakan perlengkapan pengambilan sampel yang BARU untuk setiap sampel.
- 15) Sertakan lembar sampel/ formulir permintaan laboratorium dalam kantong plastik terpisah bersama sampel (jika satu formulir untuk satu sampel digunakan). Jika digunakan formulir multi-sampel, cantumkan semua sampel dalam satu formulir, pastikan identifikasi khusus pada kantong sampel juga tercatat di formulir, lalu masukkan formulir ke dalam kantong plastik dan ke dalam boks pendingin bersama sampel.
- 16) Simpan sampel pada suhu lemari pendingin (0 hingga 4°C) dan kirimkan ke laboratorium sesegera mungkin.
- 17) Jangan membekukan sampel kecuali telah berkonsultasi dengan laboratorium.

3. Pengambilan Sampel Air

a. Prosedur Pengambilan Sampel Air

Protokol pengambilan sampel berbeda tergantung jenis air:

- 1) Air dari keran tanpa sambungan – biarkan air mengalir selama 2 hingga 3 menit sebelum mengambil sampel.

- 2) Air dari keran pencampur (*mixing faucet*) – lepaskan semua sambungan keran seperti *aerator*, filter, selang, saringan, atau pelindung percikan. Jalankan air panas selama 2 menit, lalu air dingin selama 2 hingga 3 menit sebelum pengambilan sampel.
- 3) Air dari sumur – pompa air selama sekitar 5 hingga 10 menit sebelum mengambil sampel, atau ambil langsung dari sumur menggunakan botol steril yang diberi pemberat di bagian bawah, dan hati-hati agar tidak terkena lapisan permukaan air (*scum*).
- 4) Air permukaan (kolam, danau, sungai, mata air, waduk) – ambil sampel dari bagian yang cukup dalam agar terhindar dari sedimen. Pegang botol di dekat dasarnya; celupkan mulut botol ke bawah permukaan air dan isi botol dengan memiringkan leher sedikit ke atas dan arahkan mulut botol ke arah hulu atau menjauh dari pengambil sampel.

Dengan menjaga aseptis secara penuh, buka tutup botol steril dan isi tanpa dibilas, hingga batas garis 200 mL atau hingga sekitar 2,5 cm dari bibir botol. Segera tutup rapat kembali.

b. Pelabelan

- 1) Isi label botol sampel dan formulir permintaan dengan huruf cetak yang jelas.
- 2) Informasi kontak klien serta tanggal/waktu pengambilan wajib diisi.
- 3) Tandai jenis pemeriksaan yang diminta dan cek dua volume uji berurutan untuk sampel air limbah/polusi.
- 4) Jika sampel air berasal dari pantai tempat berenang, mohon tandai apakah air laut atau air tawar.

c. Pengiriman

- 1) Segera kirim di awal minggu dan dalam kondisi berpendingin, menggunakan *cooler* dengan *ice pack* yang cukup untuk menjaga suhu < 8°C jika sampel tidak bisa sampai ke laboratorium dalam waktu enam jam sejak pengambilan.
- 2) Kirim hanya melalui kurir di hari yang sama atau layanan semalam (*overnight courier*). (Sampel yang melebihi waktu penyimpanan 30 jam tidak akan diperiksa)
- 3) *Cooler* hanya boleh berisi sampel air dan tidak boleh melebihi 30

botol per cooler.

4. Penerimaan spesimen

- a. Segera setelah sampel tiba di laboratorium, analis harus mencatat kondisi fisik umumnya. Jika sampel tidak dapat segera dianalisis, sampel harus disimpan sebagaimana dijelaskan kemudian.
- b. Periksa wadah sampel untuk melihat adanya cacat fisik yang nyata. Periksa kantong dan botol plastik dengan saksama untuk melihat adanya sobekan, lubang jarum, dan bekas tusukan. Jika unit sampel dikumpulkan dalam botol plastik, periksa botol untuk melihat adanya retakan dan tutup yang longgar. Jika kantong plastik digunakan untuk pengambilan sampel, pastikan kawat yang terpilin tidak menusuk kantong di sekitarnya. Kontaminasi silang yang diakibatkan oleh satu atau lebih cacat di atas akan membatalkan sampel.
- c. Pastikan setiap sampel disertai dengan formulir dan yang mencantumkan nomor sampel, nama petugas pengumpul, dan tanggal.
- d. Jika memungkinkan, periksa sampel segera setelah diterima. Namun, jika analisis harus ditunda, simpan sampel beku pada suhu -20°C hingga pemeriksaan. Dinginkan sampel yang mudah busuk dan tidak beku pada suhu $0-4^{\circ}\text{C}$ tidak lebih dari 36 jam. Simpan makanan yang tidak mudah busuk, makanan kaleng, atau makanan dengan kadar air rendah pada suhu ruangan hingga analisis dilakukan.
- e. Jika sampel tidak memenuhi kriteria di atas dan oleh karena itu tidak dapat dianalisis, beri tahu pengirim agar sampel yang valid dapat diperoleh dan kemungkinan terulangnya kasus berkurang.

F. EVALUASI

1. Sebelum digunakan, peralatan seperti sendok, pinset, spatula, serta gunting berbahan *stainless steel* harus disterilisasi menggunakan apa?
 - A. Alkohol 70%
 - B. Autoklaf
 - C. Pemanasan api bunsen
 - D. Klorin
 - E. Perebusan
2. Seorang TTLM menerima sampel makanan beku untuk pemeriksaan bakteriologi. Namun pada saat tersebut, banyak tugas lain yang lebih mendesak, sehingga pemeriksaan makanan beku tersebut harus ditunda. Berapa °C suhu penyimpanan yang tepat untuk kasus tersebut?
 - A. -20
 - B. 0
 - C. 4
 - D. 8
 - E. 10
3. Berapa jumlah minimal unit yang harus diambil untuk sampel *swab* lingkungan?
 - A. 1
 - B. 5
 - C. 10
 - D. 15
 - E. 20
4. Saat pengambilan sampel air, volume air yang ditampung harus menyisakan jarak kosong kira-kira 2,5 cm dari bibir botol. Apa tujuan dari prosedur tersebut?
 - A. Membatasi berat botol dan sampel
 - B. Menjaga sterilitas botol
 - C. Menyediakan ruang udara
 - D. Meminimalisir sampel yang diambil
 - E. Menjamin jumlah sampel yang representatif

5. Berapa luasan area (cm²) yang perlu diswab untuk pengambilan sampel mikrobiologi lingkungan?
- A. 10x10
 - B. 20x20
 - C. 30x30
 - D. 40x40
 - E. 50x50

G. RUBRIK PENILAIAN ASPEK PSIKOMOTORIK

No	Unit Kompetensi	Bobot	Nilai (10-100)	B x N
1.	Persiapan alat dan bahan	2		
2.	Pelabelan	2		
3.	Pengambilan sampel	2		
4.	Pengiriman sampel	2		
5.	Penyimpanan	2		
6.	Teknik aseptik	2		
Nilai Total				

H. DAFTAR PUSTAKA

- Badan Pengawas Obat dan Makanan, 2013, Peraturan BPOM Nomor 13 tahun 2019 tentang Batas Maksimal Cemaran Mikroba Dalam Pangan Olahan
- BC Center for Disease Control, Sampling for Microbiological Analysis, Food Protection Services, Environmental Health Services Div, www.bccdc.ca
- BC Center for Disease Control, Instructions for Collecting Water Samples for Bacteriological Examination, Public Health Laboratory, www.bccdc.ca
- Codex Alimentarius International Food Standards, 2023, General Guidelines on Sampling CXG 50-2004
- US Food and Drug Administration (FDA), 2022, Bacteriological Analytical Manual Chapter 1: Food Sampling/Preparation of Sample Homogenate, www.fda.gov

BAB II PEMERIKSAAN ANGKA KUMAN (ANGKA LEMPENG TOTAL)

A. TUJUAN UMUM

Mahasiswa mampu merencanakan, mengambil, melakukan pemeriksaan bakteriologis spesimen air, makanan dan minuman sesuai standar operasional prosedur

B. TUJUAN KHUSUS

1. Mahasiswa mampu memahami pemeriksaan Angka Lempeng Total
2. Mahasiswa mampu melakukan pemeriksaan Angka Lempeng Total
3. Mahasiswa mampu melakukan interpretasi hasil pemeriksaan Angka Lempeng Total
4. Mahasiswa mampu melakukan validasi hasil pemeriksaan Angka Lempeng Total

C. DASAR TEORI

Analisis kuantitatif terhadap makanan dan minuman secara mikrobiologi dapat dilakukan dengan metode Angka Lempeng Total (ALT), atau *Total Plate Count* (TPC). Metode ini digunakan untuk menghitung jumlah mikroorganisme hidup dalam sampel, dinyatakan dalam satuan CFU (*Colony Forming Unit*) per gram atau mililiter. ALT tidak membedakan jenis bakteri, melainkan menghitung total bakteri yang tumbuh pada media *Plate Count Agar* (PCA) setelah melalui proses pengenceran dan penanaman sampel.

Proses penanaman ini dapat dilakukan dengan tiga teknik, yaitu metode tuang, sebar, dan tetes. Dalam metode tuang, sebanyak 1,0 ml sampel yang telah diencerkan ditempatkan di dasar cawan petri, lalu ditambahkan 15–20 ml media agar yang telah didinginkan hingga suhu 45–50°C. Campuran ini kemudian dihomogenkan. Setelah diinkubasi, koloni bakteri yang tumbuh di dalam atau di permukaan agar dihitung.

Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 48 jam (2 x 24 jam). Setelah itu, koloni dihitung baik secara manual, dengan memberi tanda pada koloni menggunakan spidol, maupun menggunakan alat penghitung koloni (*colony counter*). Perhitungan hanya dilakukan pada cawan yang mengandung antara 30 hingga 300 koloni untuk setiap pengenceran, untuk memastikan akurasi.

ALT digunakan sebagai indikator umum untuk menilai kebersihan dan

kualitas mikrobiologis suatu produk. Jumlah koloni yang tinggi dapat menunjukkan kontaminasi yang signifikan dan potensi bahaya bagi kesehatan, sementara jumlah yang rendah mengindikasikan bahwa produk diproses secara higienis dan memenuhi standar mutu yang baik.

D. ALAT DAN BAHAN

1. Alat

Cawan petri, tabung reaksi, rak tabung, labu erlenmeyer 1000mL, 250 mL, pipet volum 1 mL, 5 mL, batang pengaduk, lampu spiritus, inkubator, autoklaf, neraca elektrik, oven, *colony counter*, gelas ukur

2. Bahan

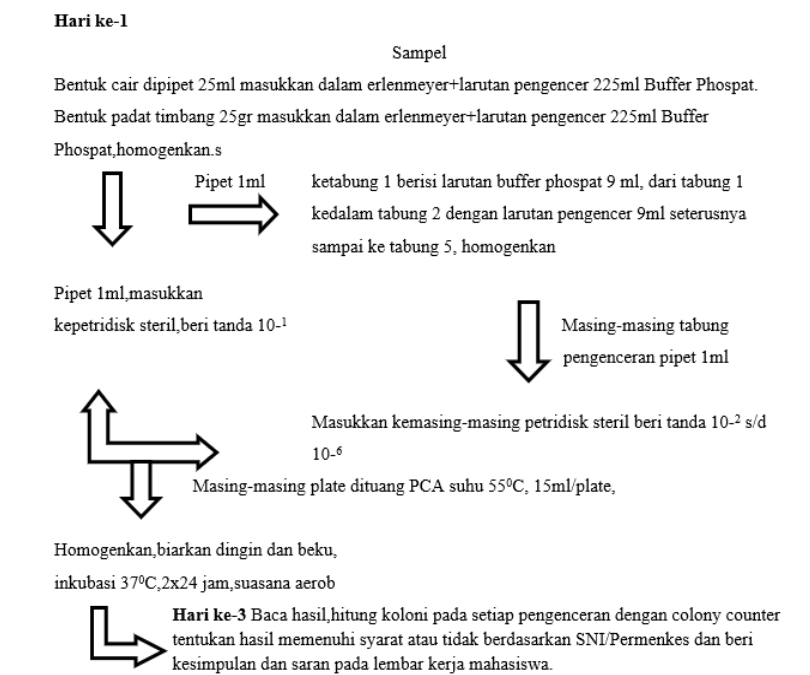
Buffer phosphate mengandung 2 zat yaitu KH_2PO_4 (Kalium dihidrogen fosfat) dan K_2HPO_4 (Dikalium hidrogen fosfat), media PCA (*Plate Count Agar*), NaCl 0,85%, NaOH 0,1 M, HCl 0,1 M, Alkohol 70%, akuades

3. Sampel

Makanan dan minuman

E. PROSEDUR

Skema Kerja



Gambar 1. Skema kerja ALT
Sumber: Badan Standardisasi Nasional (2009)

1. Pra analitik

a. Sterilisasi alat gelas dengan oven

- 1) Alat-alat gelas yang akan digunakan disiapkan dengan keadaan bersih dan kering.
- 2) Untuk pipet volume dan cawan petri dibungkus dengan kertas kopi, sedangkan tabung reaksi serta erlenmeyer mulut tabungnya ditutup dengan *aluminium foil* dan dibungkus dengan kertas kopi. Alat-alat tersebut dimasukkan ke dalam oven.
- 3) Suhu oven diatur 160°C dan dilakukan sterilisasi selama 1 jam.
- 4) Alat-alat tersebut dibiarkan hingga dingin dan siap untuk digunakan.

b. Pembuatan media PCA (*Plate Count Agar*)

- 1) Timbang dan larutkan media PCA bubuk 93,76 gram ke dalam 3990 mL akuades kemudian masukkan media ke dalam erlenmeyer steril.
- 2) Letakkan erlenmeyer tersebut di atas *hotplate*, panaskan media sampai larut sempurna dengan ciri larutan media jernih dan tidak ada lagi butir-butir media pada dinding erlenmeyer.
- 3) Sterilkan media yang sudah larut tersebut di autoklaf, suhu 121°C, tekanan 1,5 atm, selama 15 menit.

c. Pembuatan Larutan Pengencer *Buffer Phosphate*

- 1) Timbang dan larutkan 8,42g KH_2PO_4 dan 6,64g K_2HPO_4 larutkan keduanya ke dalam 800 mL akuades.
- 2) Ukur pH menggunakan pH meter yang sudah dikalibrasi. Seharusnya mendekati pH 7.0. Jika perlu, koreksi pH dengan meneteskan larutan HCl 0,1M (untuk menurunkan pH) atau NaOH 0,1M (untuk menaikkan pH) sedikit demi sedikit sambil diaduk dan diukur. Tambahkan akuades sampai volume akhir 1000mL. Aduk lagi.
- 3) Pipet larutan *buffer phosphate* stok tersebut sebanyak 13,25mL, kemudian masukkan ke dalam erlenmeyer dan tambahkan NaCl 0,85% hingga 1000mL, kemudian homogenkan. (diperoleh larutan pengencer *buffer phosphate*)
- 4) Pipet sebanyak 9mL ke dalam masing-masing tabung kemudian tutup dengan kapas bersih. Pipet larutan pengencer *buffer phosphate* tersebut sebanyak 225mL, masukkan ke dalam erlenmeyer kemudian tutup dengan *aluminium foil*.

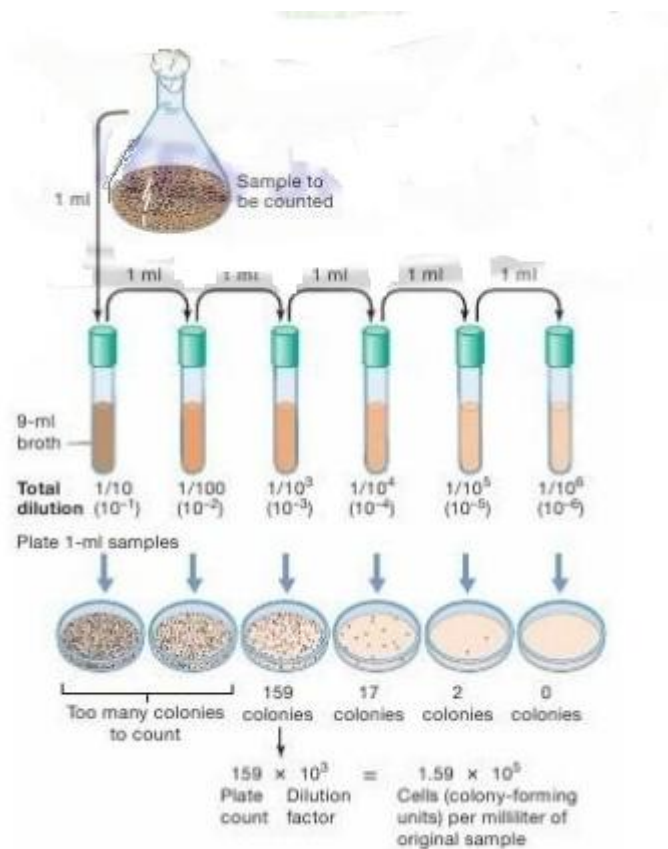
- 5) Sterilisasi media PCA dan larutan pengencer *buffer phosphate* dengan autoklaf.
- 6) Air dimasukkan sampai tanda batas di dalam autoklaf.
- 7) Masukkan tabung-tabung dan erlenmeyer yang berisi media PCA dan erlenmeyer yang berisi larutan pengencer *buffer phosphate* yang akan disterilkan. Autoklaf ditutup, tekan tombol *power* untuk menyalakan.
- 8) Lakukan sterilisasi dengan tekanan uap 1 atm dan suhu 121°C selama 15 menit.
- 9) Setelah selesai, lalu katup dibuka hingga tekanan menunjukkan angka 0.

2. Analitik

a. Prosedur Pemeriksaan

- 1) Seluruh peralatan dan bahan yang dibutuhkan disusun dan disiapkan di atas meja kerja.
- 2) Disediakan enam tabung reaksi steril, masing-masing diisi dengan 9 ml larutan *buffer phosphate* lalu diberi label 1 hingga 6.
- 3) Homogenkan sampel (cair), timbang sampel (padat), desinfeksi kemasan sampel sebelum dibuka.
- 4) Pipet/timbang sampel makanan/minuman sebanyak 25mL/25g secara aseptik, lalu masukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 225mL larutan *buffer phosphate* untuk membuat pengenceran 10^{-1} .
- 5) Ambil sebanyak 1mL larutan dari pengenceran 10^{-1} dan dimasukkan ke dalam tabung 1 yang berisi 9mL larutan *buffer phosphate*, sehingga menghasilkan pengenceran 10^{-2} , homogenkan.
- 6) Pipet sebanyak 1mL dari tabung 1, ambil dan pindahkan ke tabung 2, sehingga terbentuk pengenceran 10^{-3} . Lakukan hal yang sama sampai pengenceran 10^{-6} . Homogenkan dari tabung pengenceran terakhir dipipet 1mL dan dibuang.
- 7) Tabung ke-6 hanya berisi 9mL larutan *buffer phosphate* dan digunakan sebagai tabung kontrol.
- 8) Dari masing-masing tingkat pengenceran, ambil 1mL larutan dan masukkan ke dalam cawan petri yang sudah dilabeli sesuai dengan tingkat pengencerannya (10^{-1} hingga 10^{-6}).

- 9) Tuangkan 15 mL media PCA bersuhu 50°C ke masing-masing cawan petri, kemudian homogenkan dengan membentuk angka delapan pada masing-masing pengenceran cawan petri.
- 10) Biarkan media PCA yang telah bercampur dengan sampel mengeras, kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam (2 x 24 jam).
- 11) Lakukan hal yang sama pada cawan petri kontrol yang berisi 1mL larutan *buffer phosphate*, ditambahkan 15mL media PCA bersuhu 50°C, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam. Alur kerja terdapat pada gambar berikut ini.

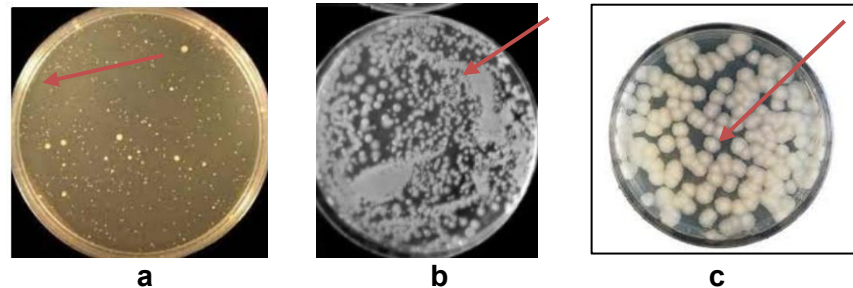


Gambar 2. Alur kerja uji Angka Lempeng Total
Sumber: Madigan (2012)

b. Perhitungan Jumlah Bakteri dalam Cawan Petri

- 1) Setelah proses inkubasi selesai, amati dan hitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada setiap cawan petri menggunakan *colony counter*. Kontrol koloni: jumlah koloni pada kontrol tidak boleh lebih dari 5 koloni, koloni yang terpisah dihitung satu-persatu (gambar a),

koloni yang menjalar membentuk satu area dihitung sebagai 1 koloni (gambar b), koloni yang bertumpuk-tumpuk seperti tumpukan koin jika terlihat terpisah dihitung satu persatu (gambar c).



Gambar 3. Pertumbuhan koloni ALT

- 2) Perhitungan dilakukan pada cawan petri dengan jumlah koloni antara 30 hingga 300 koloni. Jumlah koloni yang terhitung dikalikan dengan faktor pengenceran untuk mendapatkan nilai *Total Plate Count* (TPC) dalam satuan CFU/mL (*Colony Forming Unit* per milliliter), dengan rumus perhitungan sebagai berikut

$$A = \frac{(\sum KP - K) \times P_1 + (\sum KP - K) \times P_2 + \dots + P \text{ ke } N}{\sum P}$$

Keterangan:

- A : Jumlah koloni/ml sampel
 $\sum KP$: Jumlah koloni sesuai dengan pengenceran
 K : Jumlah koloni pada kontrol
 P1 : Pengenceran 10^{-1}
 P2 : Pengenceran 10^{-2}
 $\sum P$: Jumlah cawan petri yang mempunyai koloni bakteri
 30-300 koloni/*plate*

c. Interpretasi Hasil

Sampel memenuhi syarat berdasarkan SNI 7388-2009 batas cemaran mikroba dalam pangan (Badan Standard Nasional 2009).

3. Pasca Analitik

- Bersihkan meja kerja, buanglah sampah non infeksius pada tempat sampah yang sesuai.
- Musnahkan media yang telah digunakan dengan cara direbus, cuci dan sterilkan alat yang telah digunakan menggunakan autoklaf.
- Buatlah laporan praktikum.

F. EVALUASI

1. Seorang ATLM sedang melakukan pemeriksaan mikrobiologi pada sampel susu menggunakan metode *Total Plate Count*. Setelah proses pengenceran bertingkat hingga 10^{-6} , sampel ditanam dengan metode tuang (*pour plate*). Setelah inkubasi 48 jam pada 37°C , didapatkan 250 koloni pada pengenceran 10^{-3} . Koloni pada cawan petri kontrol 0. Bagaimana interpretasi hasil tersebut?
 - A. Jumlah koloni tidak valid karena <30
 - B. Jumlah koloni valid, dihitung sebagai 250×10^3 CFU/mL
 - C. Jumlah koloni tidak valid karena >300
 - D. Jumlah koloni harus dihitung pada semua tingkat pengenceran
 - E. Jumlah koloni dihitung dengan mengabaikan faktor pengenceran
2. Seorang mahasiswa TLM sedang membuat media PCA, dengan tahapan menimbang media sesuai kebutuhan lalu memanaskan media hingga larut sempurna. Setelah itu, media disterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121°C , tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Apa tujuan utama sterilisasi ini?
 - A. Agar media steril
 - B. Meningkatkan daya tumbuh bakteri pada media
 - C. Menurunkan pH agar media lebih stabil
 - D. Menghilangkan oksigen terlarut pada media
 - E. Mempercepat proses pengeringan media
3. Seorang mahasiswa TLM melakukan pengenceran sampel minuman hingga 10^{-6} . Namun pada tabung pengenceran terakhir, ia lupa menutup tabung dengan kapas steril. Apa kemungkinan yg terjadi dari kesalahan ini?
 - A. Terjadi kontaminasi silang sehingga hasil tidak valid
 - B. Koloni bakteri akan mati akibat oksidasi udara
 - C. Volume pengenceran akan berkurang signifikan
 - D. Faktor pengenceran tidak dapat dihitung
 - E. Bakteri tidak dapat tumbuh pada media PCA
4. Seorang ATLM dalam melakukan pemeriksaan ALT, menemukan bahwa pada *plate* kontrol menunjukkan pertumbuhan 15 koloni, jumlah koloni

pada plate 10^{-1} : 1200, 10^{-2} : 350 , 10^{-3} : 45 , 10^{-4} : 30 , 10^{-5} : 15 10^{-6} : 40

Apa tahapan selanjutnya yang harus dilakukan?

- A. Hasil sah, langsung dihitung CFU/mL
 - B. Hasil sah, karena <30 koloni
 - C. Hasil tidak valid, perlu ulang pemeriksaan
 - D. Hasil sah bila koloni <50
 - E. Hasil sah bila koloni >300
5. Seorang ATLM sedang menghitung koloni pada media PCA Saat menghitung koloni pada cawan petri, mendapati beberapa koloni menumpuk seperti tumpukan koin namun masih terlihat terpisah. Bagaimana cara menghitungnya?
- A. Dihitung sebagai satu koloni
 - B. Tidak dihitung karena tidak valid
 - C. Dihitung sesuai jumlah koloni yang terlihat terpisah
 - D. Dihitung dua kali lipat dari jumlah koloni
 - E. Dihitung rata-rata dengan koloni tunggal

G. RUBRIK PENILAIAN ASPEK PSIKOMOTORIK

No.	Unit Kompetensi	Bobot	Nilai (10-100)	B x N
1.	Teknik aseptik	1		
2.	Pengambilan sampel	2		
3.	Pengenceran sampel	2		
4.	Penanaman bakteri pada media	2		
5.	Teknik pembacaan uji ALT	2		
6.	Perhitungan	2		
7.	Penarikan Kesimpulan	2		
8.	Penanganan limbah	1		
Nilai Total				

H. DAFTAR PUSTAKA

- Badan Standard Nasional. 2009. "SNI 7388 : 2009 Maximum Limit of Heavy Metal Contamination in Food." *Standar Nasional Indonesia*: 17.
- Dhafin, Anis Akhwan et al. 2023. "Total Plate Count Test for Bacteria in Home Industry Baby Porridge in the Malang City Area." *Contemporary Journal of Applied Sciences (CJAS)* 1(1): 25–32.
- Industries, Fermentation. 2021. "1 材料与amp;方法 1. 1. 1." 47(8): 170–79.
- Rizki, Zuriani, Fitriana Fitriana, and Asri Jumadewi. 2022. "Identifikasi Jumlah Angka Kuman Pada Dispenser Metode TPC (Total Plate Count)." *Jurnal SAGO Gizi dan Kesehatan* 4(1): 38.
- Badan Standard Nasional. 2009. "SNI 7388 : 2009 Maximum Limit of Heavy Metal Contamination in Food." *Standar Nasional Indonesia*: 17.

**JURNAL PRAKTIKUM
PEMERIKSAAN ANGKA LEMPENG TOTAL**

DATA SAMPEL :

PRINSIP :

TUJUAN :

PENGENCERAN : 1.
2.
3.
4.
5.
6.

HASIL : Jumlah koloni
KONTROL :
PLATE 1 :
PLATE 2 :
PLATE 3 :
PLATE 4 :
PLATE 5 :
PLATE 6 :

PERHITUNGAN :

KESIMPULAN :

.....20.....

Pembimbing Praktikum

Praktikan

(.....)

(.....)

BAB III

PEMERIKSAAN ANGKA PALING MUNGKIN (APM) KOLIFORM DAN *Escherichia coli*

A. TUJUAN UMUM

Mahasiswa mampu merencanakan, mengambil, melakukan pemeriksaan bakteriologis spesimen air, makanan dan minuman sesuai standar operasional prosedur

B. TUJUAN KHUSUS

1. Mahasiswa mampu melakukan pengambilan spesimen dari air, makanan dan minuman untuk pemeriksaan angka paling mungkin (APM) koliform dan *Escherichia coli*
2. Mahasiswa mampu memahami teknik pemeriksaan angka paling mungkin (APM) koliform dan *Escherichia coli* pada spesimen makanan dan minuman
3. Mahasiswa mampu melakukan pemeriksaan Angka Paling Mungkin (APM) koliform dan *Escherichia coli* pada spesimen makanan dan minuman
4. Mahasiswa mampu melakukan interpretasi dan verifikasi hasil Angka Paling Mungkin (APM) koliform dan *Escherichia coli*

C. DASAR TEORI

Kualitas mikrobiologis air, makanan, dan minuman merupakan faktor krusial dalam kesehatan masyarakat. Kontaminasi oleh mikroorganisme patogen dapat menyebabkan wabah penyakit yang ditularkan melalui makanan dan air (*foodborne* dan *waterborne diseases*). Penyakit ini secara umum dapat dibagi menjadi dua kategori: intoksikasi, yaitu kondisi ketika toksin yang diproduksi oleh bakteri dalam makanan tertelan dan menyebabkan gejala cepat timbul, seperti keracunan oleh *Staphylococcus aureus*; serta infeksi, yang terjadi akibat konsumsi mikroorganisme patogen hidup yang kemudian tumbuh dan berkembang dalam saluran pencernaan, seperti pada infeksi oleh *Salmonella sp.* atau *Escherichia coli* patogenik.

Penilaian terhadap risiko tersebut, digunakan bakteri indikator sanitasi. Bakteri indikator bukanlah patogen utama, tetapi keberadaannya dalam jumlah tertentu pada sampel menunjukkan kontaminasi fekal dan potensi keberadaan patogen enterik lainnya. Kelompok koliform adalah indikator yang

paling umum digunakan. Koliform didefinisikan sebagai bakteri Gram-negatif, berbentuk batang, tidak membentuk spora, aerob atau anaerob fakultatif, dan mampu memfermentasi laktosa dengan menghasilkan asam dan gas dalam 48 jam pada suhu 35°–37°C. Kehadiran koliform dalam air olahan atau makanan siap konsumsi menandakan proses pengolahan yang tidak higienis atau kontaminasi pasca-pengolahan.

Kelompok koliform ada beberapa jenis, salah satunya terdapat koliform fekal, yang mampu tumbuh dan memfermentasi laktosa pada suhu 44,5°C. *E. coli* merupakan spesies utama dari kelompok ini dan menjadi indikator kontaminasi fekal yang paling spesifik, karena berasal dari usus besar manusia dan hewan berdarah panas. Ditemukannya *E. coli* dalam sampel air atau makanan hampir selalu mengindikasikan kontaminasi tinja dan memberi peringatan akan kemungkinan adanya patogen serius seperti *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, atau virus Hepatitis A.

Metode kuantitatif yang digunakan untuk mengukur keberadaan koliform dan *E. coli* salah satunya adalah Metode Angka Paling Mungkin (APM) atau *Most Probable Number* (MPN). Metode ini merupakan pendekatan enumeratif berdasarkan teori probabilitas, yang digunakan untuk memperkirakan jumlah mikroorganisme dalam sampel. Sampel diuji dengan pengenceran serial dan diinokulasikan ke dalam sejumlah tabung berisi media cair. Setelah inkubasi, tabung yang menunjukkan reaksi positif (misalnya pembentukan gas) dihitung dan dikonversikan dengan tabel APM untuk menentukan estimasi jumlah mikroorganisme per mL atau gram sampel. Metode APM sendiri biasanya menggunakan metode 3 tabung atau 5 tabung. Satuan dari metode APM juga harus disesuaikan dengan jenis spesimen yaitu makanan padat seperti roti, daging, ikan, dll (APM/g), makanan cair/minuman seperti sup cair, susu, jus buah, santan cair, kecap, dll (APM/mL), dan air minum, air kemasan, atau air bersih lainnya (APM/100 mL). Berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI), ambang batas cemaran koliform pada air minum adalah 0/100 mL (tidak boleh terdeteksi), sementara pada produk pangan siap konsumsi, batas maksimum bervariasi tergantung jenis produk.

D. ALAT DAN BAHAN

1. Alat

- a. Botol sampel
- b. LAF (*Laminar Air Flow*)
- c. Tabung reaksi & rak tabung reaksi
- d. Tabung durham
- e. Cawan petri
- f. Wadah atau plastik steril
- g. *Vortex*
- h. Gelas ukur
- i. Pipet ukur
- j. Mikropipet & *Blue tip*
- k. Jarum ose bulat
- l. *Waterbath* sirkulasi
- m. *Stomacher*/lumpang dan alu atau blender steril
- n. Lampu spiritus
- o. Mikroskop
- p. Objek gelas
- q. Inkubator

2. Bahan

- a. Spesimen (contoh air mineral, susu, mie goreng, dan lain-lain)
- b. *Buffered Peptone Water* (BPW)
- c. *Medium Lactose Broth* (LB)
- d. *Medium Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLBB)
- e. *Escherichia coli Broth* (EC Broth)
- f. *Media Eosin Methylen Blue Agar* (EMBA)
- g. Media dan Reagen IMViC (*Indole, Methyl Red, Voges-Proskauer, dan Citrate*)
- h. *Kit* pewarnaan Gram
- i. Minyak imersi

E. Prosedur

1. Pra Analitik

- a. Disiapkan alat, bahan, dan spesimen.
- b. Siapkan 9 tabung reaksi yang sudah dimasukkan tabung durham dalam posisi terbalik untuk 1 jenis media uji pendugaan dan uji penegas.
- c. Buat media *Lactose Broth* (LB), *Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLB), dan *Escherichia coli Broth* (EC Broth) masing-masing minimal sebanyak 100mL atau sesuai kebutuhan. Masing-masing media diisi ke dalam tabung reaksi sebanyak 10mL, pastikan dalam

- tabung durham tidak terdapat gelembung. Lakukan sterilisasi dengan suhu 121°C selama 15 menit.
- d. Buat media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) secukupnya untuk uji pelengkap. Lakukan sterilisasi dengan suhu 121°C selama 15 menit sebelum dituangkan ke cawan petri steril.
 - e. Lakukan pengambilan spesimen air, makanan, dan minuman secara aseptis dan menggunakan peralatan steril.
 - f. Kocok spesimen minuman atau makanan cair secara perlahan atau gunakan *vortex* jika makanan cair mengandung partikel yang mengendap.
 - g. Lakukan pengenceran dengan ketentuan sebagai berikut:
 - 1) Untuk spesimen dengan berat lebih kecil atau sama dengan 1kg atau 1L sampai dengan 4,5kg atau 4,5L timbang spesimen padat sebanyak 25g atau spesimen cair sebanyak 25mL dari spesimen yang akan diuji, kemudian masukkan dalam wadah atau plastik steril dan tambahkan 225mL larutan *Buffered Peptone Water*.
 - 2) Untuk spesimen dengan berat lebih besar dari 4,5kg atau 4,5L timbang spesimen padat sebanyak 50g atau spesimen cair sebanyak 50mL, kemudian masukkan dalam wadah atau plastik steril dan tambahkan 450mL larutan *Buffered Peptone Water*.
 - 3) Homogenkan selama 2 menit (jika makanan padat bisa menggunakan *stomacher*, lumpang dan alu atau blender steril). Homogenat ini merupakan larutan dengan pengenceran 10^{-1} .
 - 4) Ambil 1mL dari suspensi 10^{-1} , dimasukkan ke dalam 9mL larutan *Buffered Peptone Water* (pengenceran 10^{-2}).
 - 5) Ambil 1mL dari pengenceran 10^{-2} , dimasukkan ke 9mL *Buffered Peptone Water* (pengenceran 10^{-3}).
 - 6) Pada setiap pengenceran lakukan pengocokan minimal 25 kali.
 - h. Catatan: untuk sampel air minum, air kemasan, atau air bersih lainnya (air PDAM, air kemasan, air sumur, dll) tidak perlu diencerkan, tetapi dengan menginokulasikan langsung sejumlah volume air (1, 10, atau 100mL) ke dalam media LB yang telah

disiapkan dalam tabung reaksi dengan tabung durham. Dan metode tabung yang digunakan umumnya adalah metode 5 seri tabung.

Tabel 1. Seri tabung APM

Seri Tabung	Volume Sampel Air ke Masing-masing Tabung Media LB	Jumlah Tabung	Total Volume Air yang Diuji
1	10mL	5 tabung	50mL
2	1mL	5 tabung	5mL
3	0,1mL	5 tabung	0,5mL

2. Analitik (Metode 3 tabung dengan contoh spesimen makanan padat)

a. Uji Pendugaan (*Presumptive Test*)

- 1) Siapkan 9 buah tabung reaksi yang sudah berisi media LB, masing-masing kemudian diberi kode A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2, dan C3.
- 2) Masukkan masing-masing 1mL spesimen dengan pengenceran 10^{-1} ke dalam tabung reaksi A1, A2, A3.
- 3) Masukkan masing-masing 1mL spesimen dengan pengenceran 10^{-2} ke dalam tabung reaksi B1, B2, B3.
- 4) Masukkan masing-masing 1mL sampel dengan pengenceran 10^{-3} ke dalam tabung reaksi C1, C2, dan C3.
- 5) Inkubasikan semua tabung reaksi dengan kode A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2, dan C3 pada suhu $35-37^{\circ}$ C selama 1x24 jam.
- 6) Catat jumlah tabung positif pada setiap seri (misal: 3-2-1).
- 7) Dikatakan positif jika timbul gas dalam tabung durham pada bagian dasar tabung reaksi, maka lanjutkan dengan melakukan tes penegasan. Jika tidak ada gas, tunggu hingga 1x24 jam berikutnya. Jika tetap tidak ada gas, maka spesimen tersebut tidak perlu diperiksa lebih lanjut dan dinyatakan negatif.

b. Uji Penegasan (*Confirmed Test*)

- 1) Uji Penegasan Untuk Koliform
 - a) Siapkan tabung reaksi yang berisi media BGLB sesuai jumlah tabung reaksi yang positif gas pada pemeriksaan tes pendugaan, beri kode sesuai dengan kode tabung reaksi positif gas.

- b) Dari setiap tabung media LB yang menunjukkan hasil positif pada uji pendugaan, ambil sebanyak 1 jarum ose bulat, kemudian pindahkan ke dalam tabung BGLB dengan kode yang sama.
 - c) Inkubasi media BGLB yang sudah diinokulasikan tersebut pada suhu 35-37^o C selama 48 jam.
 - d) Lakukan pembacaan yaitu dengan melihat jumlah tabung BGLB yang menunjukkan kekeruhan dan positif gas yang berarti dalam spesimen terdapat bakteri koliform.
 - e) Catat ragam/konfigurasi jumlah tabung positif setiap seri (misal: 3-2-1) dan konversikan hasil tabung yang positif dengan tabel APM.
 - f) Nyatakan nilainya sebagai "APM/g koliform atau APM/mL koliform atau APM/100 ml" tergantung dari jenis spesimen yang digunakan.
- 2) Uji Penegasan Untuk Koliform Fekal (*E. coli*)
- a) Siapkan tabung reaksi yang berisi media *EC Broth* sesuai jumlah tabung reaksi yang positif gas pada pemeriksaan tes pendugaan, beri kode sesuai dengan kode tabung reaksi positif gas.
 - b) Dari tiap tabung media LB yang menunjukkan hasil positif pada uji pendugaan, selanjutnya ambil sebanyak 1 jarum ose bulat, kemudian pindahkan ke dalam tabung *EC Broth* dengan kode yang sama.
 - c) Inkubasikan media *EC Broth* yang sudah diinokulasikan tersebut dalam *waterbath* sirkulasi selama 48 jam pada suhu 44,5^o C. *Waterbath* harus dalam keadaan bersih, air di dalamnya harus lebih tinggi dari tinggi cairan yang ada dalam tabung yang akan diinkubasi.
 - d) Periksa tabung-tabung *EC Broth* yang menghasilkan gas selama 24 jam, jika negatif inkubasikan kembali selama 24 jam. Tabung positif ditandai dengan kekeruhan dan gas dalam tabung durham.

- e) Lakukan pembacaan yaitu dengan melihat jumlah tabung *EC Broth* yang menunjukkan kekeruhan dan positif gas yang berarti dalam spesimen terdapat bakteri koliform fekal.
 - f) Catat ragam/konfigurasi jumlah tabung positif setiap seri (misal: 3-2-1) dan konversikan hasil tabung yang positif dengan tabel APM.
 - g) Nyatakan nilainya sebagai "APM/g koliform fekal atau APM/mL koliform fekal atau APM/100 mL" tergantung dari jenis spesimen yang digunakan.
- c. Uji Pelengkap (*Completed Test*) untuk Konfirmasi *E. coli*
- 1) Dari setiap tabung *EC Broth* yang positif (atau BGLBB positif), goreskan 1 ose suspensi ke permukaan media EMBA.
 - 2) Inkubasi pada suhu 35°-37°C selama 24 jam.
 - 3) Amati pertumbuhan koloni yang tumbuh pada media EMBA:
 - a) Koloni tipikal *E. coli*: berwarna hijau metalik dengan kilap (*metallic sheen*) dan pusat gelap.
 - b) Koloni koliform lain (misal: *Enterobacter*): berbentuk "mata ikan" (*fish eye*), yaitu besar, mukoid, berwarna pink dengan pusat gelap, tanpa kilap metalik.
 - 4) Untuk konfirmasi akhir, ambil 1 koloni tipikal *E. coli* dari EMBA dan lakukan Uji IMViC (*Indole*, *Methyl Red*, *Voges-Proskauer*, dan *Citrate*) serta Pewarnaan Gram. Hasil *E. coli*: Gram negatif batang; Uji IMViC: yaitu *Indole* (+), *Methyl Red* (+), *Voges-Proskauer* (-), *Citrate* (-).
- d. Interpretasi Hasil
- Hasil yang didapatkan kemudian konversikan dengan tabel APM sesuai dengan seri tabung yang digunakan serta pengenceran yang dilakukan.
- 1) Standar Batas Maksimum Cemaran Mikroba dalam Makanan dan Minuman
 Batas maksimum cemaran mikroba dalam minuman adalah 0/100mL. Standar tentang batas maksimum cemaran mikroba di Indonesia dapat dilihat pada Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 13 Tahun 2019 Tentang Batas Maksimal

Cemaran Mikroba Dalam Pangan Olahan.

3. Pasca Analitik

- a) Lakukan penarikan kesimpulan hasil dari hasil praktikum yang telah dilakukan.
- b) Lakukan desinfeksi meja kerja menggunakan alkohol 70%.
- c) Alat dan bahan yang telah digunakan disterilkan, dicuci dan dirapikan kembali.
- d) Lakukan pembuatan laporan kegiatan praktikum

Lampiran Tabel APM

Tabel 1. APM 3 seri tabung dengan inokulum 0,1g/ 0,1mL, 0,01g/ 0,01mL, dan 0,001g/ 0,001mL, dengan derajat kepercayaan 95 % (U.S. Food and Drug Administration, 2023).

Pos. Tubes 0.10	Pos. Tubes 0.01	Pos. Tubes 0.001	MPN/g	Conf. lim. Low	Conf. lim. High	Pos. tubes 0.10	Pos. tubes 0.01	Pos. tubes 0.001	Conf. lim. MPN/g	Conf. lim. Low	Conf. lim. High
0	0	0	<>	—	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	—

Catatan: Inokulasi 1 mL dari pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , dan 10^{-3} setara dengan menguji sampel sebanyak 0,1g/0,1mL, 0,01g/0,01 mL, dan 0,001g/0,001 mL

Tabel 2. APM 5 seri tabung dengan inokulum 0,1g/0,1mL, 0,01 g/0,01 mL, dan 0,001g/0,001 mL, dengan derajat kepercayaan 95 % (U.S. Food and Drug Administration, 2023).

Pos. Tubes 0.10	Pos. Tubes 0.01	Pos. Tubes 0.001	MPN/g	Conf. lim. Low	Conf. lim. High	Pos. tubes 0.10	Pos. tubes 0.01	Pos. tubes 0.001	Conf. lim. MPN/g	Conf. lim. Low	Conf. lim. High
0	0	0	<>	—	6.8	4	0	2	21	6.8	40
0	0	1	1.8	0.09	6.8	4	0	3	25	9.8	70
0	1	0	1.8	0.09	6.9	4	1	0	17	6	40
0	1	1	3.6	0.7	10	4	1	1	21	6.8	42
0	2	0	3.7	0.7	10	4	1	2	26	9.8	70
0	2	1	5.5	1.8	15	4	1	3	31	10	70
0	3	0	5.6	1.8	15	4	2	0	22	6.8	50
1	0	0	2	0.1	10	4	2	1	26	9.8	70
1	0	1	4	0.7	10	4	2	2	32	10	70
1	0	2	6	1.8	15	4	2	3	38	14	100
1	1	0	4	0.7	12	4	3	0	27	9.9	70
1	1	1	6.1	1.8	15	4	3	1	33	10	70
1	1	2	8.1	3.4	22	4	3	2	39	14	100
1	2	0	6.1	1.8	15	4	4	0	34	14	100

Pos. Tubes 0.10	Pos. Tubes 0.01	Pos. Tubes 0.001	MPN/g	Conf. lim. Low	Conf. lim. High	Pos. tubes 0.10	Pos. tubes 0.01	Pos. tubes 0.001	Conf. lim. MPN/g	Conf. lim. Low	Conf. lim. High
1	2	1	8.2	3.4	22	4	4	1	40	14	100
1	3	0	8.3	3.4	22	4	4	2	47	15	120
1	3	1	10	3.5	22	4	5	0	41	14	100
1	4	0	11	3.5	22	4	5	1	48	15	120
2	0	0	4.5	0.79	15	5	0	0	23	6.8	70
2	0	1	6.8	1.8	15	5	0	1	31	10	70
2	0	2	9.1	3.4	22	5	0	2	43	14	100
2	1	0	6.8	1.8	17	5	0	3	58	22	150
2	1	1	9.2	3.4	22	5	1	0	33	10	100
2	1	2	12	4.1	26	5	1	1	46	14	120
2	2	0	9.3	3.4	22	5	1	2	63	22	150
2	2	1	12	4.1	26	5	1	3	84	34	220
2	2	2	14	5.9	36	5	2	0	49	15	150
2	3	0	12	4.1	26	5	2	1	70	22	170
2	3	1	14	5.9	36	5	2	2	94	34	230
2	4	0	15	5.9	36	5	2	3	120	36	250
3	0	0	7.8	2.1	22	5	2	4	150	58	400
3	0	1	11	3.5	23	5	3	0	79	22	220
3	0	2	13	5.6	35	5	3	1	110	34	250
3	1	0	11	3.5	26	5	3	2	140	52	400
3	1	1	14	5.6	36	5	3	3	180	70	400
3	1	2	17	6	36	5	3	4	210	70	400
3	2	0	14	5.7	36	5	4	0	130	36	400
3	2	1	17	6.8	40	5	4	1	170	58	400
3	2	2	20	6.8	40	5	4	2	220	70	440
3	3	0	17	6.8	40	5	4	3	280	100	710
3	3	1	21	6.8	40	5	4	4	350	100	710
3	3	2	24	9.8	70	5	4	5	430	150	1,100
3	4	0	21	6.8	40	5	5	0	240	70	710
3	4	1	24	9.8	70	5	5	1	350	100	1100
3	5	0	25	9.8	70	5	5	2	540	150	1700
4	0	0	13	4.1	35	5	5	3	920	220	2600
4	0	1	17	5.9	36	5	5	4	1600	400	4600
						5	5	5	>1600	700	—

Tabel 3. APM seri 5 tabung: 5 x 10mL, 5 x 1mL, dan 5 x 0,1mL (American Public Health Association, 2017; Departemen Kesehatan RI, 1993)

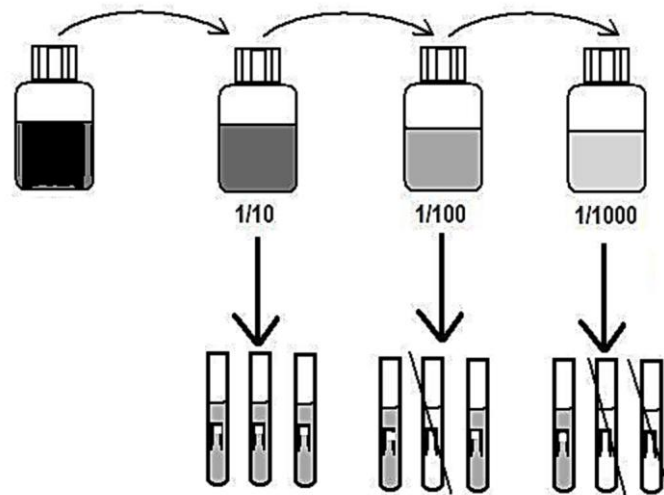
Jumlah Tabung (+) Gas			Index MPN per 100 ml	Jumlah Tabung (+) Gas			Index MPN per 100 ml
10 ml	1 ml	0,1 ml		10 ml	1 ml	0,1 ml	
0	0	0	< 2	4	2	1	26
0	0	1	2	4	3	0	27
0	1	0	2	4	3	1	33
0	2	0	4	4	4	0	34
1	0	0	2	5	0	0	23
1	0	1	4	5	0	1	31
1	1	0	4	5	0	2	43
1	1	1	6	5	1	0	33
1	2	0	6	5	1	1	46
2	0	0	5	5	1	2	63
2	0	1	7	5	2	0	49
2	1	0	7	5	2	1	70
2	1	1	9	5	2	2	94
2	2	0	9	5	3	0	79
2	3	0	12	5	3	1	110
3	0	0	8	5	3	2	140
3	0	1	11	5	3	3	180
3	1	0	11	5	4	0	130
3	1	1	14	5	4	1	170
3	2	0	14	5	4	2	220
3	2	1	17	5	4	3	280
3	3	0	17	5	4	4	350
4	0	0	13	5	5	0	240
4	0	1	17	5	5	1	350
4	1	0	17	5	5	2	540
4	1	1	21	5	5	3	920
4	1	2	26	5	5	4	1600
4	2	0	22	5	5	5	≥ 2400

Tabel 4. APM seri 3 Tabung Menurut Formula Thomas (Thomas, 1942 dalam American Public Health Association, 2017)

Jumlah Tabung (+) Gas pada Penanaman			Indeks MPN per 100 ml
3 x 10 ml	3 x 1 ml	3 x 0,1 ml	
0	0	0	0
0	0	1	3
0	0	2	6
0	0	3	9
0	1	0	3
0	1	1	6
0	1	2	9
0	1	3	12
0	2	0	6
0	2	1	9
0	2	2	12
0	2	3	16
0	3	0	9
0	3	1	13
0	3	2	16
0	3	3	19
1	0	0	4
1	0	1	7
1	0	2	11
1	0	3	14
1	1	0	7
1	1	1	11
1	1	2	15
1	1	3	18
1	2	0	11
1	2	1	15
1	2	2	19
1	2	3	23
1	3	0	15
1	3	1	19
1	3	2	23
1	3	3	27
2	0	0	10
2	0	1	14
2	0	2	19

Jumlah Tabung (+) Gas pada Penanaman			Indeks MPN per 100 ml
3 x 10 ml	3 x 1 ml	3 x 0,1 ml	
2	0	3	24
2	1	0	15
2	1	1	20
2	1	2	25
2	1	3	30
2	2	0	21
2	2	1	26
2	2	2	31
2	2	3	37
2	3	0	27
2	3	1	33
2	3	2	38
2	3	3	44
3	0	0	29
3	0	1	39
3	0	2	49
3	0	3	60
3	1	0	46
3	1	1	58
3	1	2	72
3	1	3	86
3	2	0	76
3	2	1	95
3	2	2	116
3	2	3	139
3	3	0	190
3	3	1	271
3	3	2	438
3	3	3	≥1898

Berikut ini adalah contoh hasil pemeriksaan uji APM pada bakteri koliform menggunakan spesimen makanan padat:



Gambar 4. Contoh hasil pemeriksaan APM

Dari setiap pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , dan 10^{-3} , masing-masing dimasukkan 1mL masing-masing ke dalam tabung yang berisi medium, dimana untuk setiap pengenceran dipakai 3 seri tabung. Setelah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu, dihitung jumlah tabung yang positif. Pada pengenceran pertama 3 tabung menghasilkan pertumbuhan positif, pada pengenceran kedua menghasilkan 2 tabung yang positif, pada pengenceran ketiga menghasilkan 1 tabung positif. Dari hasil tersebut didapatkan ragam/konfigurasi menjadi 3-2-1. Angka ragam/konfigurasi ini lalu konversikan dengan tabel APM 3 seri tabung dengan inokulum 0,1g; 0,01g; dan 0,001g. Jadi nilai APMnya adalah 150 APM/g koliform. Perlu diingat tabel yang dipakai untuk memilih nilai APM disesuaikan dengan jumlah seri tabung dan pengenceran yang digunakan pada pemeriksaan.

F. EVALUASI

1. Seorang analis laboratorium menerima sampel air sumur untuk diperiksa kandungan bakteri koliform. Pada tahap Uji Pendugaan metode APM, ia mengamati adanya kekeruhan namun tidak terbentuk gas dalam tabung Durham setelah inkubasi 48 jam. Tindakan yang paling tepat dilakukan oleh analis tersebut adalah...
 - A. Melaporkan hasil negatif untuk koliform.
 - B. Melanjutkan ke Uji Penegasan dengan media BGLBB.
 - C. Mengulang Uji Pendugaan dari awal.
 - D. Menganggap hasil positif karena adanya kekeruhan.
 - E. Menginkubasi ulang selama 24 jam.
2. Pada Uji Pelengkap untuk konfirmasi *E. coli*, seorang mahasiswa menggoreskan suspensi dari tabung *EC Broth* positif ke media EMB Agar. Setelah inkubasi, tumbuh koloni besar, mukoid, berwarna merah muda dengan pusat gelap, namun tidak menunjukkan kilap metalik. Apa interpretasi yang paling mungkin dari hasil tersebut?
 - A. Sampel positif mengandung *E. coli*.
 - B. Sampel positif mengandung koliform lain, seperti *Enterobacter* atau *Klebsiella*.
 - C. Media EMBA terkontaminasi oleh jamur.
 - D. Sampel tidak mengandung bakteri koliform.
 - E. Terjadi kesalahan pada saat inkubasi.
3. Metode APM koliform menggunakan suhu inkubasi 35-37^o C untuk Uji Penegasan, sedangkan untuk APM koliform fekal (*E. coli*) menggunakan suhu 44,5^oC. Apa landasan ilmiah utama dari penggunaan suhu yang lebih tinggi untuk deteksi *E. coli*?
 - A. Suhu 44,5^oC dapat membunuh semua bakteri lain selain *E. coli*.
 - B. *E. coli* hanya dapat memfermentasi laktosa pada suhu 44,5^oC.
 - C. Suhu tersebut bersifat selektif untuk bakteri termotoleran yang habitat aslinya di usus hewan berdarah panas.
 - D. Suhu 35-37^oC menghambat pertumbuhan *E. coli*.
 - E. Untuk mempercepat pembentukan gas oleh bakteri koliform.
4. Seorang analis laboratorium medis melakukan uji kualitas mikrobiologi pada sampel bakso yang dijual di sebuah kantin. Sampel diuji

menggunakan metode Angka Paling Mungkin (APM) seri 3 tabung untuk bakteri koliform. Prosedur yang dilakukan adalah sebagai berikut:

- Sebanyak 1 gram sampel dihomogenkan dalam 9 mL larutan pengencer (BPW) untuk mendapatkan pengenceran 10^{-1} .
- Dari pengenceran ini, dibuat seri pengenceran lanjutan hingga 10^{-3} .
- Kemudian, 1 mL dari masing-masing pengenceran 10^{-1} (0,1), 10^{-2} (0,01), dan 10^{-3} (0,001) diinokulasikan ke dalam 3 seri tabung yang berisi media LB.

Setelah inkubasi, hasil Uji Penegasan (*Confirmed Test*) pada media BGLB menunjukkan ragam/konfigurasi tabung positif sebagai berikut: 3-2-1. Berdasarkan data dan tabel MPN yang telah disediakan sebelumnya, berapa nilai APM koliform per gram pada sampel bakso tersebut?

- A. 150 APM/g
 - B. 150 APM/mL
 - C. 210 APM/g
 - D. 210 APM/mL
 - E. Hasil tidak valid
5. Uji IMViC adalah serangkaian uji biokimia untuk membedakan bakteri dalam grup *Enterobacteriaceae*. Profil IMViC yang khas untuk *E. coli* adalah ++--. Uji 'V' dalam IMViC adalah *Voges-Proskauer* yang bertujuan untuk mendeteksi...
- A. Produksi indol dari asam amino triptofan.
 - B. Kemampuan menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon.
 - C. Produksi asam campuran dari fermentasi glukosa.
 - D. Produksi asetoin (asetilmetilkarbinol) dari fermentasi glukosa.
 - E. Produksi enzim urease.

G. RUBRIK PENILAIAN ASPEK PSIKOMOTORIK

No.	Unit Kompetensi	Bobot	Nilai (10-100)	B x N
1.	Teknik aseptik	15		
2.	Pengambilan sampel	10		
3.	Penanaman bakteri pada media	15		
4.	Teknik pembacaan uji APM	10		
5.	Teknik Pewarnaan	15		
6.	Pembacaan Hasil Uji Biokimia	15		
7.	Penarikan Kesimpulan	10		
8.	Penanganan limbah	10		
Nilai Total				

H. DAFTAR PUSTAKA

- American Public Health Association. (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition*. Washington, DC: APHA Press.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan. (2019). *Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 13 Tahun 2019 tentang Batas Maksimal Cemaran Mikroba dalam Pangan Olahan*. Jakarta: BPOM RI.
- Badan Standardisasi Nasional. (2006). *Cara Uji Mikrobiologi – Bagian 1: Penentuan Coliform dan Escherichia coli pada Produk Perikanan [SNI 01-2332.1-2006]*. Jakarta: BSN.
- Food and Drug Administration US. (2020). *Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 4: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria*. Diakses dari fda.gov.
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2018). *Brock Biology of Microorganisms, 15th Edition*. Pearson Education.
- Mustopa R., Silviani Y., Bangun S.R., Wijayanti D.R., Artanti D., & Dwiyantri RD. (2024). *Modul Praktikum Bakteriologi Bagi Mahasiswa Prodi Teknologi Laboratorium Medik*. AIPTLMI.

JURNAL PRAKTIKUM
PEMERIKSAAN ANGKA PALING MUNGKIN (APM) KOLIFORM
DAN *Escherichia coli*

Hasil Pemeriksaan pada sampel nomor :

Hari Ketiga :

Hasil pengamatan pada uji pendugaan (APM seri 3 tabung)

	10 mL			1 mL			0,1 mL		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Hasil									
Jumlah positif									

Hari Kelima :

1. Hasil pengamatan pada uji penegasan koliform (APM seri 3 tabung)

	10 mL			1 mL			0,1 mL		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Hasil									
Jumlah positif									

2. Hasil pengamatan pada uji penegasan koliform fekal (*E.coli*)

	10 mL			1 mL			0,1 mL		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Hasil									
Jumlah positif									

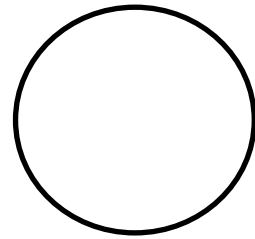
Hari Keenam :

1. Hasil pengamatan pada uji pelengkap

No.	Ciri Koloni :	Media :
1	Bentuk	
2	Ukuran	
3	Warna	
4	Elevasi	
5	Pinggiran	
6	Ciri khas lainnya	

2. Pewarnaan Gram :

Bentuk :
Susunan :
Warna :
Sifat Gram :



Hari Ketujuh :

1. Pengamatan hasil uji biokimia

No	Nama Uji	Pengamatan	Hasil (+/-)
1	Indol
2	Metil Red (MR)
3	Voges Proskauer (VP)
4	Simon Citrat

Bakteri Terduga :

Nilai APM :

2. Pembahasan

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

3. Kesimpulan

.....
.....

.....,.....20.....

Pembimbing Praktikum

Praktikan

(.....)

(.....)

BAB IV

PEMERIKSAAN BAKTERI *Escherichia coli*

A. TUJUAN UMUM

Mahasiswa mampu merencanakan, mengambil, melakukan pemeriksaan bakteriologis spesimen air, makanan dan minuman sesuai standar operasional prosedur

B. TUJUAN KHUSUS

1. Mahasiswa mampu menjelaskan karakteristik morfologi dan fisiologi *Escherichia coli*.
2. Mahasiswa mampu menyiapkan media kultur selektif dan diferensial untuk isolasi *Escherichia coli* (*EMB agar*, *MacConkey agar*).
3. Mahasiswa mampu melakukan pewarnaan Gram dan menginterpretasikan hasilnya.
4. Mahasiswa mampu melakukan uji biokimia (IMViC) untuk konfirmasi identitas *Escherichia coli*.
5. Mahasiswa mampu menerapkan prinsip K3 (Kesehatan dan Keselamatan Kerja) laboratorium saat melakukan pemeriksaan.

C. DASAR TEORI

Escherichia coli merupakan salah satu bakteri koliform yang termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae*. *Enterobacteriaceae* merupakan bakteri enterik atau bakteri yang dapat hidup dan bertahan di dalam saluran pencernaan. *Escherichia coli* merupakan bakteri berbentuk batang bersifat Gram-negatif, fakultatif anaerob, tidak membentuk spora, dan merupakan flora alami pada usus mamalia.

Escherichia coli dibagi menjadi 3 kelompok besar berdasarkan interaksinya dengan inang (manusia), yaitu (1) non patogen (komensal), (2) patogen saluran pencernaan, dan (3) patogen diluar saluran pencernaan (ekstraintestinal). Bakteri *Escherichia coli* juga dikenal sebagai bakteri indikator sanitasi dan higiene, atau indikator mikroorganisme pencemaran air, makanan dan minuman yang keberadaannya dalam suatu produk pangan menunjukkan indikasi rendahnya tingkat sanitasi yang diterapkan. Keberadaan bakteri ini sering dikaitkan dengan adanya kontaminasi yang berasal dari kotoran (feses), karena *Escherichia coli* pada umumnya adalah bakteri yang hidup pada usus

manusia (maupun hewan) sehingga keberadaan bakteri tersebut pada air atau pangan menunjukkan adanya proses pengolahan yang mengalami kontak dengan kotoran.

Strain patogen *Escherichia coli* dapat menyebabkan penyakit yang ditularkan melalui makanan (*food borne diseases*), baik melalui mekanisme infeksi maupun intoksikasi yang dikonsumsi melalui makanan atau minuman (daging sapi mentah atau kurang matang, sayuran dan buah yang tidak dicuci, air yang terkontaminasi tinja, susu yang tidak dipasteurisasi) kemudian berkembang biak pada saluran pencernaan sehingga menimbulkan gejala penyakit. Intoksikasi biasanya dikaitkan dengan konsumsi makanan yang mengandung toksin bakteri yang telah diproduksi sebelumnya di luar tubuh, namun pada kasus *Escherichia coli*, ini terjadi secara *in vivo*, sehingga lebih tepat disebut infeksi toksikoinfeksi dari pada intoksikasi murni, setelah kolonisasi usus bakteri memproduksi *Shigatoxin* yang diserap ke dalam sirkulasi sistemik dan merusak sel endotel pembuluh darah, terutama di ginjal menyebabkan *Hemolytic Uremic Syndrome* (HUS). Ini adalah kombinasi infeksi dan toksikogenisitas.

D. ALAT DAN BAHAN

1. Alat

- a. Tabung reaksi
- b. Cawan petri steril
- c. *Inokulating loop* (ose kawat platina)
- d. Mikropipet dan tip steril
- e. *Laminar air flow cabinet*
- f. Inkubator (37°C)
- g. Mikroskop
- h. Bunsen
- i. Penangas air

2. Bahan

- a. Sampel uji (air, makanan, feses)
- b. *Nutrient Agar* (NA)
- c. *MacConkey Agar* (MCA)
- d. *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA)
- e. *Medium Luria Bertani* (LB)

- f. Reagen uji biokimia (IMViC):
 - 1) *Indole test (Kovacs reagent)*
 - 2) *Methyl red (MR) test reagent*
 - 3) *Voges-Proskauer (VP) reagent (α -naphthol dan KOH)*
 - 4) *Citrate agar (Simmon's citrate)*
- g. *Buffer saline* steril
- h. Alkohol 70%
- i. Akuades steril

E. PROSEDUR

1. Pra Analitik

- a. Persiapan alat dan bahan: Semua alat seperti tabung reaksi, ose, pipet, dan media harus disterilkan terlebih dahulu menggunakan autoklaf. Siapkan media meliputi *MacConkey Agar*, *EMB Agar*, dan media uji biokimia (IMViC).
- b. Pengumpulan sampel: Sampel yang digunakan dapat berupa air, makanan, atau feses. Ambil sampel menggunakan teknik aseptik ke dalam wadah steril, dan beri label lengkap yang mencakup identitas pasien/sumber, tanggal, dan waktu pengambilan.
- c. Spesimen harus diberi label yang berisi:
 - 1) Nama spesimen
 - 2) Nomor identifikasi spesimen
 - 3) Lokasi pengambilan spesimen
 - 4) Tanggal dan waktu pengambilan spesimen
- d. Transportasi dan penyimpanan sampel: Jika sampel tidak langsung diperiksa, simpan pada suhu 2°–8°C dalam kontainer berinsulasi. Hindari pembekuan untuk sampel feses atau makanan.
- e. Penerimaan dan pemeriksaan awal: Verifikasi kesesuaian identitas, jumlah volume, dan kondisi sampel sebelum dilanjutkan ke tahap analitik.

2. Analitik

- a. Kultur awal: Inokulasikan sampel ke dalam media *MacConkey Agar* menggunakan ose steril. Inkubasi pada suhu 37°C selama 18–24 jam. *E. coli* akan tumbuh sebagai koloni pink karena fermentasi laktosa.

- b. Subkultur selektif: Pindahkan koloni yang mencurigakan ke *EMB Agar*. Inkubasi ulang pada 37°C selama 24 jam. Koloni *E. coli* menunjukkan karakteristik *metallic green sheen*.
- c. Pewarnaan Gram: Lakukan pewarnaan Gram dari koloni untuk memastikan morfologi batang Gram negatif.
- d. Uji Biokimia IMViC:
 - 1) *Indole test*: Gunakan medium SIM, inkubasi 24–48 jam, lalu tambahkan *Kovac's reagent*. Warna merah pada lapisan atas menunjukkan hasil positif.
 - 2) *Methyl Red test*: Setelah inkubasi 48 jam, tambahkan indikator *methyl red* pada medium MR-VP. Warna merah menunjukkan hasil positif.
 - 3) *Voges-Proskauer test*: Tambahkan α -*naphthol* dan KOH ke medium MR-VP. *E. coli* umumnya menunjukkan hasil negatif (tidak ada perubahan warna).
 - 4) *Citrate test*: Gunakan *Simmon's Citrate Agar*. *E. coli* tidak dapat menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon sehingga tidak terjadi perubahan warna (tetap hijau)
- e. Konfirmasi: Hasil dari keseluruhan pengujian dikonfirmasi dengan profil biokimia khas *E. coli* (IMViC ++--).

3. Pasca Analitik

- a. Interpretasi hasil: Bandingkan morfologi koloni, hasil Gram, dan reaksi biokimia dengan karakteristik khas *E. coli*. Jika diperlukan, gunakan *kit* identifikasi tambahan (API 20E atau MALDI-TOF).
- b. Dokumentasi dan pelaporan: Tulis hasil pemeriksaan dengan sistematis yang mencakup identitas sampel, hasil kultur, hasil uji biokimia, serta interpretasi akhir.
- c. Validasi hasil: Dilakukan oleh analis senior atau penanggung jawab laboratorium mikrobiologi.
- d. Pengelolaan limbah: Semua media, bahan habis pakai, dan sampel yang telah digunakan harus didekontaminasi (autoklaf) sebelum dibuang sesuai standar limbah infeksius BSL-2.

F. EVALUASI

1. Seorang petugas laboratorium kesehatan menemukan keberadaan *Escherichia coli* dalam sampel air minum isi ulang yang diambil dari depot di pinggiran kota. Pemilik depot menyatakan bahwa air tersebut berasal dari sumur bor yang telah melalui penyaringan pasir dan karbon aktif. Kasus temuan apakah pada *E. coli* dalam konteks ini secara spesifik?
 - A. Air minum tersebut memiliki kandungan besi tinggi
 - B. Telah terjadi kontaminasi oleh bakteri dari udara terbuka
 - C. Menunjukkan kemungkinan adanya pencemaran dari feses
 - D. Kandungan karbon aktif terlalu tinggi
 - E. Bakteri berasal dari proses fermentasi alami
2. Seorang anak laki-laki berusia 6 tahun dilarikan ke rumah sakit dengan keluhan diare berdarah, nyeri perut hebat, dan penurunan produksi urine. Hasil pemeriksaan menunjukkan adanya anemia hemolitik dan trombositopenia. Riwayat menunjukkan anak mengonsumsi burger daging sapi setengah matang dari pedagang kaki lima sehari sebelumnya. Berdasarkan kasus tersebut, kemungkinan penyakit yang terjadi adalah akibat toksin dari *E. coli* yang menyebabkan...
 - A. Kolera
 - B. Tifoid
 - C. *Hemolytic Uremic Syndrome (HUS)*
 - D. Disentri basiler
 - E. Gastroenteritis akibat rotavirus
3. Seorang analis mikrobiologi sedang melakukan identifikasi bakteri dari sampel usap permukaan talenan di dapur restoran. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan basil Gram-negatif, tidak membentuk spora, dan dapat tumbuh baik dalam kondisi aerob maupun anaerob. Karakteristik apakah paling sesuai dengan pada kasus tersebut?
 - A. *Bacillus subtilis*
 - B. *Escherichia coli*
 - C. *Staphylococcus aureus*
 - D. *Clostridium perfringens*
 - E. *Lactobacillus casei*

4. Seorang ATLM pada RS X sedang melakukan pemeriksaan kualitas makanan di kantin kampus. Kemudian dibawa ke laboratorium didapatkan adanya *Escherichia coli* dalam sampel sayuran segar yang tidak dicuci dengan benar. Jenis bahaya keamanan pangan yang ditimbulkan dalam kasus ini adalah...
- A. Bahaya fisik
 - B. Bahaya kimia
 - C. Bahaya biologis
 - D. Bahaya radiologis
 - E. Bahaya organoleptik
5. Dalam investigasi wabah diare akut di sebuah daerah, ditemukan bahwa pasien yang mengalami gejala berat sebagian besar mengonsumsi susu segar yang tidak dipasteurisasi. Tindakan preventif yang paling relevan untuk mencegah kasus ini adalah...
- A. Menambahkan gula ke dalam susu
 - B. Menyimpan susu dalam suhu ruang
 - C. Melakukan pasteurisasi sebelum dikonsumsi
 - D. Mencampur susu dengan air panas
 - E. Menambahkan enzim laktase ke dalam susu

G. RUBRIK PENILAIAN ASPEK PSIKOMOTORIK

No.	Unit kompetensi	Bobot	Nilai (10-100)	B x N
1.	Persiapan spesimen	0,5		
2.	Teknik Aseptik	0,5		
3.	Inokulasi bakteri dan spesimen pada media	2,5		
4.	Teknik Pewarnaan Gram	2		
5.	Pembacaan Hasil Uji	2,5		
6.	Penarikan Kesimpulan	1		
7.	Desinfeksi meja kerja serta kerapian alat dan bahan	0,5		
8.	Penanganan Limbah	0,5		
Nilai Total				

H. DAFTAR PUSTAKA

- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2018). Brock biology of microorganisms. 15th Global Edition. Boston, US: Benjamin Cummins, 1, 1391-1407.
- Permana, A. dan Bambang, R. (2019). Perbedaan kandungan *Escherichia coli* daging ayam di pasar tradisional keputran selatan dan pasar swalayan 'x' kota Surabaya. The Indonesian Journal of Public Health, 14(1):25-36.
- Winiati, P., Nurjanah, R. S., & Komalasari, E. (2018). *Escherichia coli*: Patogenitas, Analisis dan Kajian Risiko. Press IPB Science Park Taman Kencana, Kota Bogor Indonesia.
- World Health Organization, (2022). Foodborne diseases: *Escherichia coli*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e.-coli>
- Yang X, Wang H. (2014). Pathogenic E. coli. Lacombe Research Centre, Lacombe. Canada.

BAB V

PEMERIKSAAN DAN PERHITUNGAN BAKTERI *Staphylococcus aureus*

A. TUJUAN UMUM

Mahasiswa mampu merencanakan, mengambil, melakukan pemeriksaan bakteriologis spesimen air, makanan dan minuman sesuai standar operasional prosedur.

B. TUJUAN KHUSUS

1. Mahasiswa mampu memahami teknik pemeriksaan bakteri *Staphylococcus aureus* pada spesimen air, makanan dan minuman.
2. Mahasiswa mampu melakukan pengambilan spesimen dari air, makanan dan minuman.
3. Mahasiswa mampu melakukan pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* pada spesimen air, makanan dan minuman.
4. Mahasiswa mampu melakukan perhitungan bakteri *Staphylococcus aureus*.
5. Mahasiswa mampu melakukan interpretasi dan verifikasi hasil isolasi dan identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*.

C. DASAR TEORI

Staphylococcus aureus adalah bakteri gram-positif yang berbentuk bola berpasang-pasangan atau berkelompok seperti buah anggur. Diameternya berkisar antara 0,8 mikron dan 1,0 mikron, dan tidak bergerak. Namun, ada beberapa yang bersifat gram negatif, yang ditemukan pada bakteri yang telah difagositosis atau biakan tua yang hampir mati. Bakteri stafilokokus adalah mikroflora normal pada kulit dan selaput lendir manusia. Ada kemungkinan menyebabkan infeksi pada hewan dan manusia. Jenis bakteri ini dapat menghasilkan enterotoksin, yang mencemari makanan dan membuat orang keracunan. Bakteri ini dapat dipisahkan dari carrier, bahan klinik, makanan, dan lingkungan.

Staphylococcus aureus dikenal sebagai penyebab infeksi jaringan lunak seperti sindrom syok toksik (TSS) dan *scalded skin syndrome* (SSS). Spesies Stafilokokus yang menunjukkan hasil tes koagulase positif. Beberapa strain menghasilkan protein toksin yang sangat tahan panas yang dapat menyebabkan penyakit. Toksin yang disekresikan, kofaktor untuk

mengaktifkan zimogen inang, dan eksoenzim adalah beberapa dari faktor virulensi yang memodulasi sistem kekebalan tubuh inang hingga menyebabkan penyakit. Toksin yang disekresikan, seperti toksin pembentuk pori dan superantigen, sangat bersifat inflamasi dan dapat menyebabkan kematian sel leukosit melalui sitolisis dan penghapusan klonal. Sistem koagulasi inang dirusak oleh stafilokinase dan koagulase. Eksoenzim, seperti nuklease dan protease, membelah dan menonaktifkan berbagai molekul pertahanan dan pengawasan imun. Selain itu, melalui lisis sel dan pembelahan protein sambungan, sejumlah toksin dan eksoenzim yang disekresikan ini dapat mengganggu penghalang endotel dan epitel dari inang.

Staphylococcus aureus dapat menyebabkan keracunan pangan melalui pembuatan enterotoksin yang disebut Staphylococcal Enterotoxin (SE). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa penjamah makanan adalah penyebab paling umum dari keracunan *Staphylococcus aureus*. Bakteri dapat berkembang biak dan menghasilkan toksin jika makanan tidak bersih saat disimpan dan diolah. Kontaminasi bakteri *S. aureus* dapat berupa intoksikasi yaitu adanya toksin bakteri yang terbentuk dalam makanan pada saat bakteri memperbanyak diri. Intoksikasi *S. aureus* disebut dengan stafilokokal yang disebabkan oleh enterotoksin bakteri *Staphylococcus aureus*.

Enterotoksin antigenik *S. aureus* terdiri dari SE-A, B, C1, C2, C3, D, dan E. Enterotoksin A, B, C3, C2, dan D memengaruhi saluran pencernaan dan menyebabkan diare dan muntah-muntah dalam kasus keracunan makanan. Perangsangan pada pusat muntah dapat berasal dari aktivitas toksin yang meningkatkan cAMP, yang menghasilkan peningkatan sekresi epitel usus, yang menyebabkan diare, dan ini dapat menyebabkan muntah dan diare. Sebagian besar orang tidak menunjukkan gejala demam.

Semua bukti makanan harus dikumpulkan dan diuji stafilokokusnya; banyak stafilokokus enterotoksigen menunjukkan bahwa makanan mengandung toksin. Uji yang paling efektif adalah menghubungkan penyakit dengan makanan tertentu atau menemukan toksin dalam contoh makanan. Daging dan produk daging, telur, unggas, ikan tuna, ayam, kentang, makaroni, produk roti seperti kue kering, pai krim, *eclair* coklat, *sandwich*, dan susu dan produk susu adalah beberapa makanan yang sering tercemar stafilokokal. Stafilokokus akan menghasilkan enterotoksin pada susu dengan 10⁷ koloni/g.

Toksikasi bakteri ini dapat menyerang siapa saja, tetapi gejalanya bervariasi. Untuk mencegah bakteri masuk ke makanan, terutama makanan yang tidak dipanaskan sebelum disiapkan, seperti selada, penting untuk mencuci tangan dengan teknik yang benar dan membersihkan peralatan dan permukaan penyiapan makanan. Makanan harus didinginkan sebelum dimakan dan tidak boleh disimpan pada suhu kamar selama lebih dari dua jam.

D. ALAT DAN BAHAN

1. Alat

- | | |
|---------------------------------------|----------------------------|
| a. Cawan petri | l. Timbangan analitik |
| b. Tabung reaksi | m. <i>Magnetic stirrer</i> |
| c. Pipet ukur 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL | n. Vortex |
| d. Botol media/ erlenmeyer | o. Inkubator |
| e. Batang gelas bengkok | p. Penangas air |
| f. Gunting | q. Autoklaf |
| g. Pinset | r. Lemari steril |
| h. Ose | s. Lemari pendingin |
| i. <i>Stomacher</i> | t. <i>Freezer</i> |
| j. Pembakar bunsen | u. Tissue |
| k. pH meter | |

2. Bahan

- a. *BPA (Baird Parker Agar)*
- b. *BHIB (Brain Heart Infusion Broth)*
- c. *TSA (Tryptone Soy Agar)*
- d. *Egg yolk tellurite emulsion*
- e. Plasma kelinci dengan EDTA 0,1%
- f. *BPW (Buffered Peptone Water) 0,1%*
- g. Alkohol 70%

E. PROSEDUR

1. Kontrol Kualitas Media

- a. Pengujian pH Media

Pengujian pH dilakukan pada media yang telah dibuat. Jika pH media

terlalu asam, maka ditambahkan NaOH, dan jika pH media terlalu basa, maka ditambahkan H₂SO₄, hingga pH diperoleh yang sesuai dengan ketentuan.

b. Uji Sterilisasi Media

Beberapa kelompok media dari media yang telah disterilisasi diambil secara acak dan dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 35°-37°C selama 1-2 kali sehari. Jika ada lebih dari 2 koloni bakteri per cawan setelah inkubasi, sterilisasi dinyatakan gagal, dan media harus dibuang. Hasil uji sterilitas media disimpan.

c. Uji Kinerja/Performa Media

Satu mata ose digunakan sebagai inokulum dan suspensi strain bakteri stok dibuat dengan kekeruhan setara dengan standar Mc Farland 0.5. Selama satu hari, diinkubasi pada suhu 35°-37°C. Media tetap dapat digunakan jika koloni bakteri tumbuh di dalamnya. Galur yang direkomendasikan untuk pengendalian kualitas yaitu *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Catatan uji performa media disimpan.

d. Kontrol Kualitas Reagen

Pengujian kualitas reagen dilakukan sebagai berikut

- 1) Larutan/reagen kerja dibuat baru sebelum digunakan.
- 2) Reagen yang kedaluwarsa dan yang menunjukkan tanda-tanda kerusakan, misalnya keruh, terdapat endapan, dan perubahan warna, harus dibuang.

e. Persiapan Spesimen

1) Untuk spesimen susu (cair)

Dilakukan pengenceran spesimen 10⁰ (tanpa pengenceran), kemudian dibuat seri pengenceran 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, dan seterusnya

2) Untuk spesimen daging, telur dan susu (padat dan semi padat)

Timbang spesimen padat dan semi padat sebanyak 25gram atau spesimen cair 25mL, secara aseptik kemudian masukkan dalam wadah steril.

3) Tambahkan 225 mL larutan BPW 0,1 % steril dalam kantong steril yang berisi spesimen, lalu homogenkan dengan *stomacher*

selama 1-2 menit. Ini merupakan pengenceran 10^0 , kemudian dibuat pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , dan seterusnya.

f. Pemeriksaan Spesimen

- 1) Pengujian selalu disertai dengan menggunakan kontrol positif.
- 2) Pindahkan 1mL spesimen dari 10^0 ke dalam larutan 9 mL BPW untuk mendapatkan pengenceran 10^{-1} . Dengan cara yang sama dibuat pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , dan seterusnya. Untuk spesimen susu cair dimulai dari pengenceran 10^0 , sedangkan contoh daging, telur, dan susu (padat dan semi padat) mulai pengenceran 10^{-1} .
- 3) Tuangkan 15 mL sampai 20mL media BPA yang sudah ditambah dengan *egg yolk tellurite emulsion* (5 ml ke dalam 95mL media BAP) pada masing-masing cawan yang akan digunakan dan biarkan sampai memadat.
- 4) Pipet 1 mL suspensi dari setiap pengenceran, dan inokulasikan masing-masing 0,4mL, 0,3mL, dan 0,3mL pada 3 cawan petri yang berisi media pada poin ke-3 di atas.
- 5) Ratakan suspensi spesimen di atas permukaan media agar dengan menggunakan batang gelas dan biarkan sampai suspensi terserap.
- 6) Inkubasi pada temperatur 35°C selama 45-48 jam pada posisi terbalik.
- 7) Pilih cawan petri yang mengandung jumlah koloni 20-200. Apabila cawan petri pada pengenceran terendah kurang dari 200 koloni dan atau lebih dari 200 koloni, maka lanjutkan perhitungan koloni pada cawan petri dengan pengenceran tertinggi.
- 8) Koloni *Staphylococcus aureus* mempunyai ciri khas bundar, licin, dan halus, cembung, diameter 2-3 mm, berwarna abu-abu sampai hitam pekat, dikelilingi zona opak, dengan atau tanpa zona luar yang terang. Tepi koloni putih dan dikelilingi daerah terang. Konsistensi koloni seperti mentega atau lemak jika disentuh oleh ose. Galur non lipolitik memiliki sifat koloni sama

dengan di atas, tetapi tidak dikelilingi zona opak dan zona luar yang terang.

- 9) Catat jumlah masing-masing koloni yang mempunyai ciri-ciri pada poin ke-8.
- 10) Ambil satu atau lebih koloni masing-masing bentuk yang tumbuh dan lakukan uji identifikasi.

g. Uji Identifikasi

1) Pengecatan Gram

Ambil satu atau lebih koloni dari masing-masing bentuk koloni yang tumbuh dan lakukan pewarnaan Gram. Hasil pewarnaan Gram akan terlihat bakteri berbentuk kokus berwarna ungu (Gram positif), bergerombol seperti anggur atau terlihat hanya satu bakteri.

2) Uji Koagulase

- a) Inkubasi BHIB dan Agar miring TSA pada temperatur 35°C selama 18 jam sampai dengan 24 jam.
- b) Tambahkan 0,5mL koagulase plasma kelinci yang mengandung EDTA ke dalam suspensi BHIB yang telah diinkubasi, kemudian homogenkan.
- c) Inkubasi tabung pada temperatur 35°C selama 6 jam dan amati pembentukan gumpalan setiap jam.
- d) Hasil uji koagulase positif *Staphylococcus aureus* ditandai dengan adanya penggumpalan.

h. Perhitungan Koloni

1. Hitung koloni-koloni dari cawan petri yang menunjukkan koloni khas *Staphylococcus aureus* dan menunjukkan hasil koagulase positif, kemudian dikalikan dengan faktor pengencerannya. Perhitungan cemaran *Staphylococcus aureus* merujuk pada PKBPOM No.16 Tahun 2016 tentang Kriteria Mikrobiologi dalam Pangan Olahan dan PKBOM lain pada spesimen air dan air minum.
2. Hasil dilaporkan sebagai jumlah *Staphylococcus aureus* per mililiter atau pergram.

F. EVALUASI

1. Media selektif yang umum digunakan untuk isolasi *Staphylococcus aureus* adalah:
 - A. Mac Conkey Agar
 - B. Blood Agar Plate (BAP)
 - C. Baird Parker Agar (BPA)
 - D. Nutrient Agar
 - E. Eosin Methylene Blue Agar (EMB)
2. Koloni khas *Staphylococcus aureus* pada BPA memiliki ciri:
 - A. Kecil, transparan, tepi bergerigi
 - B. Bundar, halus, cembung, berwarna abu-abu sampai hitam pekat dengan zona opak
 - C. Besar, berwarna merah bata, dikelilingi zona jernih
 - D. Tidak berpigmen, permukaan kasar, menyebar
 - E. Hijau metalik dengan kilau pada permukaan
3. Uji konfirmasi penting untuk identifikasi *Staphylococcus aureus* adalah:
 - A. Uji katalase
 - B. Uji koagulase
 - C. Uji indol
 - D. Uji oksidase
 - E. Uji TSIA
4. Perhitungan koloni *Staphylococcus aureus* dilakukan pada cawan petri yang memiliki jumlah koloni:
 - A. 5–50 koloni
 - B. 10–100 koloni
 - C. 20–200 koloni
 - D. 100–300 koloni
 - E. Lebih dari 300 koloni
5. Laporan hasil perhitungan *Staphylococcus aureus* pada sampel pangan atau air dinyatakan dalam satuan:
 - A. CFU/ml atau CFU/g
 - B. % konsentrasi
 - C. Absorbansi (OD)

D. mg/L

E. ppm

G. RUBRIK PENILAIAN ASPEK PSIKOMOTORIK

No.	Unit kompetensi	Bobot	Nilai (10-100)	B x N
1.	Persiapan spesimen	1		
2.	Teknik Aseptik	1		
3.	Inokulasi bakteri dan spesimen pada media	2		
4.	Teknik Pewarnaan Gram	2		
5.	Pembacaan Hasil Uji Koagulase	2		
6.	Perhitungan Koloni	2		
7.	Penarikan Kesimpulan	2		
6.	Desinfeksi meja kerja serta kerapian alat dan bahan	1		
7.	Penanganan Limbah	1		
Nilai Total				

H. DAFTAR PUSTAKA

- BSN. SNI 2897:2008 tentang Metode Pengujian Cemar Mikroba Dalam Daging, Telur, dan Susu, serta Hasil Olahannya. ICS 67.050.
- Yennie Y., Dewanti R.H., Kusumaningrum H.D., & Poernomo A. 2022. Kontaminasi *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus cereus* Pada Susi Di Tingkat Ritel di Wilayah Jabodetabek. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 25(2), 331-344. <http://dx.doi.org/10.17844/jphpi.v25i2.42066>.
- Tam K. and Torres V.J. 2018. *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiol Spectrum*, 7(2):GPP3-0039-2018. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018.
- Lestari R.D., Ekawati E.R., & Suryanto I. 2018. Identifikasi *Staphylococcus aureus* dan Hitung Total Jumlah Kuman Pada Bakpia Kacang Hijau. *Jurnal SainHealth*, 2(2), e-ISSN : 2549-2586.

JURNAL PRAKTIKUM
PEMERIKSAAN DAN PERHITUNGAN BAKTERI *Staphylococcus aureus*

Hasil Pengamatan pada spesimen nomor :

Hari Kedua:

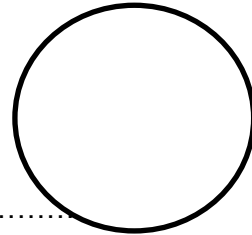
1. Pewarnaan Gram :

Bentuk :

Susunan :

Warna :

Sifat Gram :



2. Uji Koagulase

Waktu	Hasil Kuagulase: Adanya Gumpalan (Ada/Tidak)
1 jam	
2 jam	
3 jam	
4 jam	
5 jam	
6 jam	

3. Kesimpulan bakteri terduga :

4. Perhitungan Koloni

Koloni = Jumlah koloni khas x faktor pengenceran (koloni per ml atau koloni per mg)

Hasil perhiungan:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

BAB VI

PEMERIKSAAN BAKTERI *Salmonella sp*

A. TUJUAN UMUM

Mahasiswa mampu merencanakan, mengambil, melakukan pemeriksaan bakteriologis spesimen air, makanan dan minuman sesuai standar operasional prosedur.

B. TUJUAN KHUSUS

- a) Mahasiswa mampu memahami teknik pemeriksaan bakteri *Salmonella sp.* pada spesimen air, makanan dan minuman.
- b) Mahasiswa mampu melakukan pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri *Salmonella sp.* pada spesimen air, makanan dan minuman.
- c) Mahasiswa mampu melakukan perhitungan bakteri *Salmonella sp.*
- d) Mahasiswa mampu melakukan interpretasi dan verifikasi hasil isolasi dan identifikasi bakteri *Salmonella sp.*

C. DASAR TEORI

Organisme yang berasal dari genus *Salmonella* adalah agen penyebab bermacam-macam infeksi, mulai dari gastroenteritis yang ringan sampai dengan tifoid yang berat disertai bakteremia. Oleh Ewing, *Salmonella* diklasifikasikan dalam 3 spesies yaitu :

1. *S. choleraesuis*
2. *S. typhi*
3. *S. enteridis*

Mikroorganisme dengan tipe antigenik yang lain dimasukkan ke dalam serotipe dari *S. paratyphi enteridis* bukan sebagai spesies baru lainnya. Misalnya *S. paratyphi A* sekarang diklasifikasikan sebagai *S. enteridis* bioserotipe *paratyphi A*. Kuman ini berbentuk batang, tidak berspora, pada pewarnaan Gram bersifat Gram negatif, ukuran 1,3-5 μ m x 0,5-0,8 μ m, besar koloni rata-rata 2-4mm, mempunyai flagel peritrik, kecuali *S. pullorum* dan *S. gallinarum*. Kuman tumbuh pada suasana aerob dan fakultatif anaerob, pada suhu 15-41 $^{\circ}$ C (suhu optimum 37,5 $^{\circ}$ C) dan pH pertumbuhan 6-8. Pada umumnya isolasi kuman *Salmonella* dikenal dengan sifat-sifat: gerak positif, reaksi fermentasi terhadap manitol dan sorbitol positif dan memberikan hasil negatif pada reaksi indol, DNase, fenilalanin deaminase, urease, Voges

Proskauer. Kuman mati pada suhu 56°C, juga pada keadaan kering. Dalam air bisa tahan selama 4 minggu. Hidup subur pada medium yang mengandung garam empedu, tahan terhadap zat warna *briliant green* dan senyawa Na-Tetracionat dan Na-Desoksikolat. Senyawa-senyawa ini menghambat pertumbuhan kuman *coliform* sehingga senyawa-senyawa tersebut dapat digunakan dalam media untuk isolasi kuman *Salmonella* dari tinja.

Antigen somatik serupa dengan antigen somatik (O) kuman *Enterobacteriaceae* lainnya. Ag ini tahan terhadap pemanasan 100°C, alkohol dan asam. Antibodi yang dibentuk terutama IgM. Antigen flagel pada *Salmonella* ditemukan dalam 2 fase; fase 1 spesifik, fase 2 tidak spesifik. Ag H dirusak pada pemanasan di atas 60°C, alkohol dan asam. Antibodi yang dibentuk bersifat IgG. Antigen Vi, adalah polimer dari polisakarida yang bersifat asam, terdapat pada bagian yang paling luar dari badan kuman, dapat dirusak dengan pemanasan 60°C selama 1 jam, pada penambahan fenol dan asam. Kuman yang mempunyai antigen Vi ternyata lebih virulen baik terhadap bakteriofage dan dalam lab, sangat berguna untuk diagnosis cepat kuman *S. typhi* yaitu dengan cara tes *agglutination slide* dengan Vi antiserum.

Bakteri *Salmonella* di usus halus melakukan penetrasi ke dalam epitel, bakteri terus melalui lapisan epitel masuk ke dalam jaringan sub epitel sampai di *lamina propria*. Mekanisme biokimia pada saat penetrasi tidak diketahui dengan jelas, tetapi tampak proses yang menyerupai fagositosis. *Salmonellosis* adalah istilah yang menunjukkan adanya infeksi oleh kuman *Salmonella*. Manifestasi klinik *Salmonellosis* pada manusia dapat dibagi dalam 4 sindrom, yaitu :

1. gastroenteritis atau yang dikenal sebagai keracunan makanan
2. demam tifoid
3. bakteremia – septikemia
4. *carries* yang asimtomatik

Diagnosis laboratorium meliputi 3 metode yaitu:

1. Diagnosis mikrobiologik/pembiakan kuman
2. Diagnosis serologi
3. Diagnosis klinik

Metode diagnosis mikrobiologik adalah metode yang paling spesifik dan lebih dari 90% penderita yang tidak diobati, kultur darahnya positif dalam

minggu pertama. Hasil ini menurun drastis setelah pemakaian obat antibiotika, dimana hasil positif menjadi 40%. Meskipun demikian kultur sumsum tulang tetap menunjukkan hasil yang tinggi yaitu 90% positif. Pada minggu-minggu selanjutnya hasil kultur darah menurun, tetapi kultur tinja dan kultur urine meningkat yaitu 85% dan 25% berturut-turut positif pada minggu ke-3 dan ke-4. Organisme dalam tinja masih dapat ditemukan selama 3 bulan dari 90% penderita dan kira-kira 3% penderita tetap mengeluarkan kuman *S. typhi* dalam tinjanya untuk jangka waktu yang lama. *Carrier* lebih banyak dijumpai pada orang dewasa dari pada anak-anak, dan lebih sering mengenai wanita daripada laki-laki.

Diagnosis serologi tergantung pada antibodi yang timbul terhadap antigen O dan H, yang dapat dideteksi dengan reaksi aglutinasi (tes Widal). Antibodi terhadap Ag O dari grup D timbul dalam minggu pertama sakit dan mencapai puncaknya pada minggu ketiga dan keempat yang akan menurun setelah 9 bulan sampai 1 tahun. Titer aglutinin 1/200 atau kenaikan titer lebih dari 4X berarti tes Widal positif, hal ini menunjukkan adanya infeksi akut *S. typhi*.

Antibodi terhadap antigen flagel meningkat titernya setelah minggu pertama dan mencapai puncaknya pada minggu ke-4 sampai ke-6, dan titernya tetap tinggi selama bertahun-tahun. Ditemukannya titer antibodi flagel yang tinggi tidak berarti ada infeksi yang akut. Faktor-faktor yang perlu diperhatikan yang mempengaruhi hasil tes Widal adalah: stadium penyakit, vaksinasi, reaksi anamnestik, daerah yang endemis, serta pengobatan.

Morfologi : Gram (-) batang, tidak berspora, tidak berkapsul, bergerak aktif dengan flagela peritrik

Karakteristik kultur dan biokimia

Tumbuh mudah pada media biasa, aerob, non laktose fermentatif

MCA	Koloni tidak berwarna, jernih, keping, sedang, bulat, <i>smooth</i>
EMBA	Koloni tidak berwarna, keping, sedang, bulat, <i>smooth</i>
SSA	Koloni tidak berwarna, keping, kecil, bulat, <i>smooth</i>
TSI	Lereng:merah/alkalis, dasar:asam/kuning, Gas:+/-, H ₂ S: +/-
SCA	Tumbuh / tidak tumbuh
Test Neg	Fermentasi laktose, sukrose, indol, VP, oksidase
Test Post	Fermentasi sorbitol, <i>motility</i> , katalase, MR

D. ALAT & BAHAN

- | | |
|-------------------|-----------------------------|
| 1. Lampu spiritus | 9. Reagen pewarnaan Gram |
| 2. Ose bulat | 10. Media SSA |
| 3. Ose jarum | 11. Media Biokimia |
| 4. Inkubator | 12. Media MCA |
| 5. Mikroskop | 13. KOH 40% |
| 6. Objek gelas | 14. Alfa naftol 5% |
| 7. Minyak imersi | 15. NaOH 0,1N dan HCL 9,1 N |
| 8. Korek api | 16. Reagen Kovac (Indol) |

Bahan Pemeriksaan: Tinja, darah, urine, makanan, minuman dan air

E. PROSEDUR

Untuk spesimen darah (2-3cc dimasukkan 10cc empedu pepton)

Untuk spesimen feses atau urine bisa langsung ditanam.

1. Hari Pertama

- Siapkan alat dan bahan yang telah disteril dan bersih di atas meja praktikum.
- Lakukan pembuatan preparat dari suspensi kuman *Salmonella sp*, pada media perbenihan *Selenite broth* yang telah dibiakkan.
- Lakukan pewarnaan Gram bakteri. Lalu dilakukan pengamatan dengan lensa objektif 100x.
- Lakukan penanaman sampel kuman pada MCA dan SSA jika hasil pewarnaan ditemukan bentuk basil.
- Inkubasi media pada inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

2. Hari Kedua

- Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
- Ambil media MCA dan SSA dari inkubator yang telah ditanami kuman selama 24 jam pada suhu 37°C.
- Lakukan karakterisasi morfologi koloni kuman pada media MCA dan SSA meliputi: bentuk koloni, warna koloni, tekstur koloni, tepian koloni, permukaan koloni, dan sifat koloni.
- Lakukan penanaman pada media biokimia dengan mengambil 1 koloni tunggal dari media MCA dan SSA pada media biokimia:
 - Media cair: media gula-gula, media VP dan Media MR

Ambil 1 mata ose bulat dari satu koloni kuman. Lalu tanam berurutan dari 1 mata ose tanpa mengambil kuman lagi.

2) Media *Simmon's Citrate*

Ambil 1 mata ose bulat dari satu koloni kuman dilanjutkan ke media *Simmon's Citrate* dengan teknik gores zig-zag

3) Media TSIA dan SIM

Ambil 1 mata ose jarum dari satu koloni kuman dilanjutkan ke media TSIA dan SIM dengan teknik ditusuk.

e. Lakukan inkubasi media biokimia yang telah ditanami kuman dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.

3. **Hari Ketiga**

Amati dan catat hasil penanaman pada media biokimia. Untuk media VP, MR dan Indol harus ditetesi terlebih dahulu reagen:

- a. Indol dengan reagen *Kovac*
- b. MR dengan reagen *methyl red*
- c. VP dengan reagen KOH dan alfa naftol

SKEMA

Inkubasi 37°C 24 jam kecuali darah 1 -7 hari.

Hari 1	Spesimen ditanam pada media MCA, EMBA, SSA, inkubasi 37°C, selama 24 jam.
Hari 2	Koloni tersangka dicat Gram, jika ditemukan ditanam pada media TSI, SIM, <i>Simmon's citrate agar</i> , inkubasi 37°C, selama 24 jam.
Hari 3	Amati dan catat pertumbuhan koloni pada media serta lakukan uji resistensi.

F. EVALUASI

1. ATLM akan melakukan pengambilan sampel darah sejumlah 3 ml pada seorang pasien dengan diagnosis demam *typhoid*. Jenis media diperkaya dan selektif apakah yang sesuai untuk sampel tersebut ?
 - A. SSA
 - B. Selenit agar
 - C. Media gall
 - D. BGLB
 - E. Endo agar
2. Seorang pasien datang membawa surat pengantar dari dokter untuk melakukan pemeriksaan feses dengan keluhan demam, pusing, mual. Setelah dilakukan pembiakan pada media *Mac Conkey Agar* (MCA) terlihat koloni transparan, cembung, bulat dan halus. Dilanjutkan ke reaksi biokimia dengan hasil : Indol negatif, H₂S positif, motiliti positif, meragikan glukosa tanpa gas, *simmon citrate* negatif dan tidak meragikan laktosa (K/A). Apa diagnosa kultur bakteri di atas?
 - A. *Shigella Flexner*
 - B. *Salmonella typhi*
 - C. *Proteus vulgaris*
 - D. *Pseudomonas aeruginosa*
 - E. *Escherichia coli*
3. Seorang ATLM kesehatan sedang mengamati hasil kultur biakan *Salmonella typhimurium* pada medium *Mac Conkey Agar*. Koloni yang teramati menunjukkan bentuk bulet, elevasi cembung, tidak berwarna (transparan), dan konsistensi seperti mentega (*butyrous*). Apakah yang menyebabkan koloni tidak berwarna pada media tersebut?
 - A. Bakteri yang bersifat Gram negatif
 - B. Menghasilkan asam dari proses fermentasi
 - C. Tidak bereaksi dengan indikator pH merah netral
 - D. Bakteri tidak mampu melakukan fermentasi laktosa
 - E. Tidak terhambat oleh kristal violet dan garam empedu
4. Seorang remaja putri berusia 18 tahun mengalami gejala demam dan sakit perut. Dokter menyarankan untuk pemeriksaan kultur Gal di laboratorium. Dari data hasil identifikasi bakteri dan *slide* aglutinasi tes diperoleh data sebagai berikut :
 - Pewarnaan bersifat Gram negatif
 - Koloni tidak memfermentasi lakosa

- Menghasilkan H₂S
- Tidak menghasilkan gas
- Aglutinasi antibodi terhadap antigen O dan Antigen H positif.

Apa yang dapat dilaporkan dari data hasil pemeriksaan tersebut?

- A. *Salmonella typhi* positif
 - B. *Vibrio cholera* positif
 - C. *Esherichia coli* positif
 - D. *Shigella disentreae* positif
 - E. *Proteus mirabilis* positif
5. Seorang Analis Teknologi Laboratorium Medik melakukan uji identifikasi bakteri *Salmonella thypi* dengan menggunakan media SSA. Dari pemeriksaan tersebut diperoleh hasil adanya endapan berwarna hitam pada dasar koloni yang tumbuh, perubahan warna media menjadi kuning, dan pada media semisolid SIM yang telah ditambah dengan *motility* positif seperti pohon cemara terbalik. Apakah jenis zat yang dihasilkan oleh bakteri *Salmonella thypi* sehingga terbentuk warna pada media tersebut ?
- A. Besi
 - B. Sulfur
 - C. Glukosa
 - D. Laktosa
 - E. Maltosa

G. RUBRIK PENILAIAN ASPEK PSIKOMOTORIK

No	Unit Kompetensi	Bobot	Nilai (10-100)	B x N
1.	Teknik aseptik	0,5		
2.	Pengambilan sampel	1		
3.	Penanaman bakteri pada media	2,5		
4.	Teknik Pewarnaan	2		
5.	Pembacaan Hasil Uji Biokimia dll	2,5		
6.	Penarikan Kesimpulan	1		
7.	Penanganan limbah	0,5		
Nilai Total				

H. DAFTAR PUSTAKA

- Dwidjosaputro, 2014, Dasar-dasar mikrobiologi, Djembatan, Malang
- Radji, M, Buku Ajar Mikrobiologi, panduan mahasiswa farmasi dan kedokteran
- Jawetz, Melnick & Adelberg, 2013, Mikrobiologi Kedokteran, Penerbit Buku Kedokteran, Edisi 20. Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Mikrobiologi Kedokteran, Binarupa Aksara, Edisi Revisi
- Waluyo, 201, Mikrobiologi Umum, Universitas Muhammadiyah.
- Biarrous W. James W, and Robert ML, WS. Saunders, Textbook of Microbiology, Philadelphia, London.

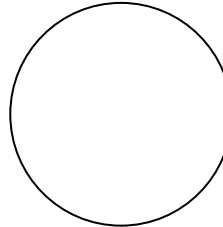
JURNAL PRAKTIKUM
PEMERIKSAAN BAKTERI *Salmonella sp.*

Hasil Pengamatan pada sampel :

Hari Pertama :

1. Pewarnaan Gram.

Bentuk :
 Susunan :
 Warna :
 Sifat Gram :



2. Penanaman pada media Selektif :

Hari Kedua :

1. Hasil Isolasi pada media selektif

No	Ciri Koloni :	Media :	Media :
	
1	Bentuk		
2	Ukuran		
3	Warna		
4	Elevasi		
5	Pinggiran		
6	Ciri khas lainnya		

Bakteri Terduga :

2. Uji biokimia

A. Penanaman pada media uji biokimia :

.....

B. Tes Katalase :

.....

C. Tes Oksidase :

.....

.....
.....
.....
.....

.....

Pembimbing Praktikum

Praktikan

(.....)

(.....)

BAB VII

PEMERIKSAAN BAKTERI *Shigella sp*

A. TUJUAN UMUM

Mahasiswa mampu merencanakan, mengambil, melakukan pemeriksaan bakteriologis spesimen air, makanan dan minuman sesuai standar operasional prosedur.

B. TUJUAN KHUSUS

- a. Mahasiswa mampu memahami teknik pemeriksaan bakteri *Shigella sp.* pada spesimen air, makanan dan minuman
- b. Mahasiswa mampu melakukan pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri *Shigella sp.* pada spesimen air, makanan dan minuman
- c. Mahasiswa mampu melakukan perhitungan bakteri *Shigella sp.*
- d. Mahasiswa mampu melakukan interpretasi dan verifikasi hasil isolasi dan identifikasi bakteri *Shigella sp.*

C. DASAR TEORI

Penyakit disentri merupakan salah satu penyakit yang disebabkan oleh bakteri. Disentri basiler biasanya dialami oleh anak-anak. Bakteri *Shigella* disebarkan oleh satu individu ke individu yang lain melalui makanan dan air yang tercemar atau oleh lalat. Bakteri *Shigella* masuk langsung ke dalam pencernaan dan hidup dalam usus besar manusia dapat menyebabkan luka pada dinding usus. Penyakit ini biasanya menyerang sekitar dua hari setelah terinfeksi bakteri *Shigella*, akan timbul demam, nafsu makan hilang, mual, muntah, diare, nyeri perut, dan disertai kembung. Dua hingga tiga hari kemudian, buang air besar 20-30 kali sehari dengan tinja encer sehingga bisa kekurangan cairan. Pada tingkatan yang parah, infeksi semakin hebat dan dapat menyebabkan kematian.

Bakteri *Shigella* termasuk jenis bakteri yang dapat menimbulkan ancaman kesehatan di masyarakat, khususnya di berbagai negara berkembang. Bakteri *Shigella* pada tubuh hospes dapat menyebabkan kondisi yang dikenal sebagai *Shigellosis*. Jika tidak mendapatkan pengobatan, infeksi *Shigella sp.* dapat mematikan. Organisme ini tidak memfermentasi laktosa dan tidak memiliki flagela (*non motil*). dilakukan uji manitol. Apabila hasilnya negatif maka termasuk ke dalam *Shigella dysenteriae*. Apabila mampu memfermentasi laktosa maka termasuk ke dalam *Shigella sonnei* sedangkan yang tidak memfermentasi laktosa akan dilanjutkan dengan uji indol. Indol negatif maka termasuk spesies *Shigella boydii* dan

indol positif termasuk spesies *Shigella flexneri*.

Morfologi : Gram (-) batang, tidak berspora, tidak berkapsul, non motil, dan bersifat patogenik.

D. ALAT & BAHAN

- | | |
|-------------------|----------------------------|
| 1. Lampu spiritus | 9. Reagen pewarnaan Gram |
| 2. Ose bulat | 10. Media SSA |
| 3. Ose jarum | 11. Media Biokimia |
| 4. Inkubator | 12. Media MCA |
| 5. Mikroskop | 13. KOH 40% |
| 6. Objek gelas | 14. Alfa naftol 5% |
| 7. Minyak imersi | 15. NaOH 0,1N dan HCl 9,1N |
| 8. Korek api | 16. Reagen Kovac (Indol) |

Bahan Pemeriksaan: Tinja, darah, urine, makanan, minuman dan air

E. PROSEDUR

Untuk spesimen darah (2-3cc dimasukkan 10cc empedu pepton)

Untuk spesimen feses/ urine bisa langsung ditanam.

1. Hari Pertama

- Siapkan alat dan bahan yang telah disteril dan bersih di atas meja praktikum.
- Lakukan pembuatan preparat dari suspensi kuman *Shigella sp*, pada media perbenihan *Selenite broth* yang telah dibiakkan.
- Lakukan pewarnaan Gram bakteri. Lalu lakukan pengamatan dengan lensa objektif 100x.
- Lakukan penanaman sampel kuman pada MCA dan SSA jika hasil pewarnaan ditemukan bentuk basil.
- Inkubasi media pada inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

2. Hari Kedua

- Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
- Ambil media MCA dan SSA dari inkubator yang telah ditanami kuman selama 24 jam pada suhu 37°C.
- Lakukan karakterisasi morfologi koloni kuman pada media MCA dan SSA meliputi: bentuk koloni, warna koloni, tekstur koloni, tepian koloni, permukaan koloni, dan sifat koloni.
- Lakukan penanaman pada media biokimia dengan mengambil 1 koloni tunggal dari media MCA dan SSA pada media biokimia:
 - Media cair: media gula-gula, media VP dan media MR

Ambil 1 mata ose bulat dari satu koloni kuman. Lalu ditanam berurutan dari 1 mata ose tanpa mengambil kuman lagi.

6) Media *Simmon 's citrate*

Ambil 1 mata ose bulat dari satu koloni kuman dilanjutkan ke media *Simmon 's citrate* dengan teknik gores zig-zag.

7) Media TSIA dan SIM

Ambil 1 mata ose jarum dari satu koloni kuman dilanjutkan ke media TSIA dan SIM dengan teknik ditusuk.

- e. Lakukan inkubasi media biokimia yang telah ditanami kuman dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.

3. Hari Ketiga :

Amati dan catat hasil penanaman pada media biokimia. Untuk media VP, MR dan Indol harus ditetesi terlebih dahulu dengan reagen :

- a. Indol dengan reagen *Kovac*
- b. MR dengan reagen *methyl red*
- c. VP dengan reagen KOH dan alfa naftol

SKEMA

Inkubasi 37°C 24 jam kecuali darah 1-7 hari.

Hari 1	Specimen ditanam pada media MCA, EMBA, SSA, inkubasi 37°C, selama 24 jam.
Hari 2	Koloni tersangka dicat Gram, jika ditemukan basil ditanam pada media TSI, SIM, <i>Simmon 's citrate agar</i> , inkubasi 37°C, selama 24 jam.
Hari 3	Amati dan catat pertumbuhan media dan dilakukan tes koagulase, oksidase, katalase, dan biokimia serta uji resistensi.

F. EVALUASI

1. Bakteri kokus Gram positif dan basilus Gram negatif dapat tumbuh pada pelat agar darah, medium ini digunakan bersamaan dengan medium selektif asam kolistin nalidixat (CNA) untuk kokus Gram negatif dan agar MacConkey untuk basilus Gram negatif. Darah apakah yang digunakan untuk membuat media tersebut ?
 - A. Sapi
 - B. Kera
 - C. Kuda
 - D. Kelinci
 - E. Domba
2. Seorang laki-laki berumur 35 th atas anjuran dokter datang ke lab untuk pemeriksaan bakteri dari sampel muntahan. Untuk mengetahui bentuk dan sifat bakteri dilakukan pewarnaan Gram dengan menggunakan beberapa reagen untuk mewarnai bakteri tersebut. Reagen dipakai secara berurutan untuk membedakan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Reagen apa saja yang digunakan secara berurutan untuk mewarnai bakteri tersebut ?
 - A. Kristal violet – alkohol aseton – lugol iodine – safranin
 - B. Alkohol aseton – lugol iodine – kristal violet – safranin
 - C. Lugol iodine – kristal violet – alkohol aseton – safranin
 - D. Kristal violet – lugol iodine – alkohol aseton – safranin
 - E. Alkohol aseton – kristal violet – lugol iodine – safranin
3. Uji Indol pada suatu bakteri menghasilkan cincin merah setelah penambahan reagen setelah diinkubasi 24 jam. Kemampuan khusus apa yang dimiliki oleh bakteri tersebut?
 - A. Menghasilkan gas H₂S
 - B. Melakukan fermentasi gula
 - C. Menggunakan sitrat sebagai sumber karbon
 - D. Mengoksidasi asam amino triptofan
 - E. Membentuk asetoin sebagai hasil metabolisme glukosa
4. Uji Voges-Proskauer (VP) pada suatu bakteri menghasilkan warna merah setelah ditambahkan reagen alfa naftol dan KOH. Kemampuan khusus apa yang dimiliki oleh bakteri tersebut?
 - A. Menghasilkan gas H₂S
 - B. Melakukan fermentasi gula
 - C. Menggunakan sitrat sebagai sumber karbon
 - D. Mengoksidasi asam amino triptofan menjadi indol
 - E. Membentuk asetoin sebagai hasil metabolisme glukosa

5. Bakteri *Salmonella* dan *Shigella sp.* tidak memfermentasi laktosa melainkan tetapi dapat menghasilkan koloni-koloni kecil yang tidak berwarna pada Mac Conkei, agar SS dan DCA. Media diferensial yang sangat dianjurkan untuk pertumbuhan bakteri ini adalah UREA, MIL dan KIA. *Salmonella* dan *Shigella* akan menghasilkan lereng alkali, punting asam, H₂S dan gas pada media tertentu kecuali *Salmonella thypi* dan *shigella flexneri* pada salah satu media yang digunakan setelah dilakukan inkubasi selama 12 jam. Adanya reaksi berupa punting asam ini disebabkan karena kedua jenis bakteri tersebut memfermentasi glukosa. Media apakah yang tepat untuk digunakan berdasarkan pemaparan diatas?
- Urea
 - MIL
 - TSIA
 - SSA
 - MCA dan DCA

G. RUBRIK PENILAIAN ASPEK PSIKOMOTORIK

No.	Unit Kompetensi	Bobot	Nilai (10-100)	B x N
1.	Teknik aseptik	0,5		
2.	Pengambilan sampel	1		
3.	Penanaman bakteri pada media	2,5		
4.	Teknik Pewarnaan	2		
5.	Pembacaan Hasil Uji Biokimia dll	2,5		
6.	Penarikan Kesimpulan	1		
7.	Penanganan limbah	0,5		
Nilai Total				

H. DAFTAR PUSTAKA

- Dwidjosaputro, 2014, Dasar-dasar mikrobiologi, Djembatan, Malang
- Radji, M, Buku Ajar Mikrobiologi, panduan mahasiswa farmasi dan kedokteran
- Jawetz, Melnick & Adelberg, 2013, Mikrobiologi Kedokteran, Penerbit Buku Kedokteran, Edisi 20. Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Mikrobiologi Kedokteran, Binarupa Aksara, Edisi Revisi
- Waluyo, 201, Mikrobiologi Umum, Universitas Muhammadiyah.
- Biarrous W. James W, and Robert ML, WS. Saunders, Textbook of Microbiology, Philadelphia, London.

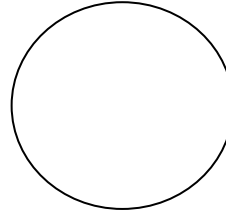
JURNAL PRAKTIKUM
PEMERIKSAAN BAKTERI *Shigella sp*

Hasil Pengamatan pada sampel :

Hari Pertama :

1. Pewarnaan Gram.

- Bentuk :
- Susunan :
- Warna :
- Sifat Gram :



2. Penanaman pada media Selektif :

Hari Kedua :

1. Hasil Isolasi pada media selektif

No	Ciri Koloni :	Media :	Media :
	
1	Bentuk		
2	Ukuran		
3	Warna		
4	Elevasi		
5	Pinggiran		
6	Ciri khas lainnya		

Bakteri Terduga :

2. Uji biokimia

a. Penanaman pada media uji biokimia :

.....

.....

b. Tes Katalase :

.....

c. Tes Oksidase :

.....

3. Kesimpulan

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Pembimbing Praktikum

Praktikan

(.....)

(.....)

BAB VIII

PEMERIKSAAN BAKTERI *Vibrio sp*

A. TUJUAN UMUM

Mahasiswa mampu merencanakan, mengambil, melakukan pemeriksaan bakteriologis spesimen air, makanan dan minuman sesuai standar operasional prosedur.

B. TUJUAN KHUSUS

- a. Mahasiswa mampu memahami teknik pemeriksaan bakteri *Vibrio sp.* pada spesimen air, makanan dan minuman.
- b. Mahasiswa mampu melakukan pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri *Vibrio sp.* pada spesimen air, makanan dan minuman.
- c. Mahasiswa mampu melakukan perhitungan bakteri *Vibrio sp.*
- d. Mahasiswa mampu melakukan interpretasi dan verifikasi hasil isolasi dan identifikasi bakteri *Vibrio sp.*

C. DASAR TEORI

Vibrio adalah bakteri berbentuk batang gram negatif, batang bengkok, bersifat aerob dan ada yang bersifat anaerob fakultatif juga bersifat motil pergerakannya dikendalikan oleh flagela polar dan sering dijumpai pada permukaan air. Vibriosis disebabkan oleh bakteri gram negatif *Vibrio*, yaitu *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, dan *V. Parahaemolyticus*. Penyakit tersebut dapat dideteksi dengan mengisolasi bakteri dari tubuh udang sakit dan menanamnya pada media agar selektif *Vibrio*, yaitu TCBS agar. Pada media TCBS koloni bakteri yang tumbuh tampak berwarna kuning atau hijau.

Vibrio cholerae mempunyai bentuk koloni bundar, cembung dan licin. *Vibrio cholerae* dan semua jenis *Vibrio sp* lainnya dapat berkembang biak tumbuh pada suhu 37°C. *Vibrio cholerae* tumbuh pada media agar *Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrosa* (TCBS), bakteri tersebut menghasilkan koloni kuning yang dapat dilihat langsung dengan latar belakang agar yang berwarna hijau gelap. *Vibrio sp* bersifat oksidase-positif, yang membedakannya dari bakteri enterik gram-negatif. Secara khas, *Vibrio sp* tumbuh pada pH (8,5 - 9,5) dan dapat dibunuh dengan cepat pada suasana asam.

D. ALAT & BAHAN

1. Lampu spiritus
2. Ose bulat
3. Ose jarum
9. Reagen pewarnaan Gram
10. Media TCBS
11. Media Biokimia

- | | |
|------------------|-----------------------------|
| 4. Inkubator | 12. KOH 40% |
| 5. Mikroskop | 13. Alfa naftol 5% |
| 6. Objek gelas | 14. NaOH 0,1N dan HCL 9,1 N |
| 7. Minyak imersi | 15. Reagen Kovac (Indol) |
| 8. Korek api | |

Bahan Pemeriksaan: Tinja, darah, urine, makanan, minuman dan air

E. PROSEDUR

Untuk spesimen darah (2-3cc dimasukkan 10cc empedu pepton).

Untuk spesimen feses / urine bisa langsung ditanam.

1. Hari Pertama

- a. Siapkan alat dan bahan yang telah disteril dan bersih di atas meja praktikum
- b. Lakukan pembuatan preparat dari suspensi kuman *Vibrio sp.*
- c. Lakukan pewarnaan Gram bakteri. Lalu dilakukan pengamatan dengan lensa objektif 100x.
- d. Lakukan penanaman sampel kuman pada TCBS jika hasil pewarnaan ditemukan bentuk basil.
- e. Inkubasi media pada inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

2. Hari Kedua

- a. Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
- b. Ambil media TCBS dari inkubator yang telah ditanami kuman selama 24 jam pada suhu 37°C.
- c. Lakukan karakterisasi morfologi koloni kuman pada media TCBS meliputi: bentuk koloni, warna koloni, tekstur koloni, tepian koloni, permukaan koloni, dan sifat koloni.
- d. Lakukan penanaman pada media biokimia dengan mengambil 1 koloni tunggal dari media TCBS pada media biokimia:
 - 8) Media cair, media gula-gula, media VP, media MR
Ambil 1 mata ose bulat dari satu koloni kuman. Lalu ditanam berurutan dari 1 mata ose tanpa mengambil kuman lagi.
 - 9) Media *Simmon's citrate*
Ambil 1 mata ose bulat dari satu koloni kuman dilanjutkan ke media *simmon's citrate* dengan teknik gores zig-zag.
 - 10) Media TSIA dan SIM
Ambil 1 mata ose jarum dari satu koloni kuman dilanjutkan ke media TSIA dan SIM dengan teknik ditusuk.
- e. Lakukan inkubasi media biokimia yang telah ditanami dalam inkubator

kuman selama 24 jam pada suhu 37°C.

2. Hari Ketiga

Amati dan catat hasil penanaman pada media biokimia. Untuk media VP, MR dan Indol harus ditetesi terlebih dahulu dengan reagen :

- a. Indol dengan reagen *Kovac*
- b. MR dengan reagen *methyl red*
- c. VP dengan reagen KOH dan alfa naftol

F. EVALUASI

1. Sebelum melakukan identifikasi bakteri pada kasus diare yang disebabkan oleh *Vibrio cholera*, seorang analis harus mampu menyiapkan media pemupuk terhadap bakteri tersebut. Jenis media apa yg sesuai terhadap bakteri tersebut?
 - A. Alkali pepton water
 - B. TCBS
 - C. Nutrien agar
 - D. Nutrien broth
 - E. TSB
2. Seorang laki-laki usia 25 tahun pergi ke dokter dengan keluhan sakit perut dan 3 hari diare berat terus menerus, dalam sehari bisa 5 kali buang air besar, akhirnya dokter meminta pasien untuk cek lab dengan kultur. Ditemukan bakteri Gram negatif berbentuk koma dengan media TCBS, katalase positif, dapat meragikan sukrosa, glukosa dan manitol tanpa menghasilkan gas, sedangkan laktosa dapat diragikan tetapi lambat. Berdasarkan kasus tersebut di atas dapat disimpulkan bakteri apa yang dimaksud?
 - A. Salmonella
 - B. Shigella
 - C. Vibrio
 - D. Gonorrhea
 - E. Pseudomonas
3. Penderita diare dengan ciri-ciri feces cair dan berwarna putih keruh seperti cucian beras. Sampel feces diambil ditanam pada media *selenite broth*, setelah itu dilakukan pewarnaan gram dengan hasil menunjukkan gram negatif bentuk batang bengkok. Bakteri apa yang menyebabkan penyakit diare dengan ciri-ciri feces di atas?
 - A. *Escherichia coli*
 - B. *Proteus sp.*
 - C. *Klebsiella sp.*
 - D. *Vibrio cholerae*
 - E. *Pseudomonas sp.*
4. Seorang anak berusia 6 tahun datang ke laboratorium dengan rujukan dokter melakukan pemeriksaan feses karena diare. Feses pasien tersebut berair dan berwarna putih seperti cucian beras. Petugas TTLM mengidentifikasi bakteri penyebab diare, dengan menginokulasi pada suatu medium selektif. Medium apa yang paling tepat digunakan pada kasus tersebut?
 - A. *Mac Conkey Agar (MCA)*

- B. *Salmonella Shigella Agar* (SSA)
 - C. *Chromocult Coliform Agar* (CCA)
 - D. *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA)
 - E. *Thiosulfate Citrate Bile Salts Agar* (TCBSA)
5. Seorang laki-laki dengan diagnosis dokter terkena diare, kemudian diberikan rujukan untuk melakukan pemeriksaan di laboratorium klinik. Sebelum melakukan identifikasi bakteri pada kasus diare yang disebabkan oleh *Vibrio cholera*, seorang analis harus mampu menyiapkan peralatan untuk pengambilan sampel. Sampel apa yang tepat untuk digunakan untuk mengidentifikasi adanya bakteri *Vibrio cholera* pada pasien diare?
- A. Rectal Swab
 - B. Serum
 - C. Feces
 - D. Darah
 - E. Urine

G. RUBRIK PENILAIAN ASPEK PSIKOMOTORIK

No.	Unit Kompetensi	Bobot	Nilai (10-100)	B x N
1.	Teknik aseptik	0,5		
2.	Pengambilan sampel	1		
3.	Penanaman bakteri pada media	2,5		
4.	Teknik Pewarnaan	2		
5.	Pembacaan Hasil Uji Biokimia dll	2,5		
6.	Penarikan Kesimpulan	1		
7.	Penanganan limbah	0,5		
Nilai Total				

H. DAFTAR PUSTAKA

- Dwidjosaputro, 2014, Dasar-dasar mikrobiologi, Djembatan, Malang
- Radji, M, Buku Ajar Mikrobiologi, panduan mahasiswa farmasi dan kedokteran
- Jawetz, Melnick & Adelberg, 2013, Mikrobiologi Kedokteran, Penerbit Buku Kedokteran, Edisi 20. Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Mikrobiologi Kedokteran, Binarupa Aksara, Edisi Revisi
- Waluyo, 201, Mikrobiologi Umum, Universitas Muhammadiyah.
- Biarrous W. James W, and Robert ML, WS. Saunders, Textbook of Microbiology, Philadelphia, London.

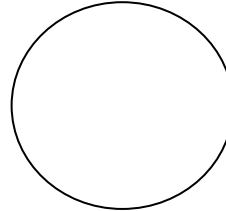
JURNAL PRAKTIKUM
PEMERIKSAAN BAKTERI *Vibrio sp*

Hasil Pengamatan pada sampel :

Hari Pertama :

1. Pewarnaan Gram.

Bentuk :
 Susunan :
 Warna :
 Sifat Gram :



2. Penanaman pada media Selektif :

Hari Kedua :

1. Hasil Isolasi pada media selektif

No	Ciri Koloni :	Media :	Media :
	Bentuk
	Ukuran		
	Warna		
	Elevasi		
	Pinggiran		
	Ciri khas lainnya		

Bakteri Terduga :

2. Uji biokimia

a. Penanaman pada media uji biokimia :

.....

b. Tes Katalase :

.....

c. Tes Oksidase :

.....

Hari Ketiga

1. Pengamatan Hasil Uji Biokimia :

No	Nama Uji	Pengamatan	Hasil (+/-)
1	Gula-gula cair : Laktosa Sukrosa Glukosa Manitol Maltosa
2	<i>Methyl Red</i> (MR)
3	Voges Proskauer (VP)
4	SIM/MIO/Indol
5	TSIA/KIA
6	<i>Simmon's Citrate</i>
7	Urease

Bakteri Terduga :

2. Pembahasan

.....

3. Kesimpulan

.....
.....
.....
.....
.....

.....,

Pembimbing Praktikum

Praktikan

(.....)

(.....)

BAB IX

PEMERIKSAAN BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa*

A. TUJUAN UMUM

Mahasiswa mampu merencanakan, mengambil, melakukan pemeriksaan bakteriologis spesimen air, makanan dan minuman sesuai standar operasional prosedur.

B. TUJUAN KHUSUS

- a. Mahasiswa mampu memahami teknik pemeriksaan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dari spesimen air, makanan dan minuman.
- b. Mahasiswa mampu melakukan pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dari spesimen air, makanan dan minuman.
- c. Mahasiswa mampu melakukan perhitungan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.
- d. Mahasiswa mampu melakukan interpretasi dan verifikasi hasil isolasi dan identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

C. DASAR TEORI

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri gram negatif yang dikenal sebagai patogen oportunistik, artinya dapat menyebabkan infeksi terutama pada individu dengan sistem kekebalan tubuh lemah. Morfologi bentuk batang (basil) lurus gram negatif atau sedikit melengkung. Ukuran bakteri sekitar $0,5-0,8\mu\text{m} \times 1,5-3,0\mu\text{m}$, bergerak dengan flagela tunggal polar (*monotrichous*), tidak membentuk spora. Beberapa *strain* menghasilkan lapisan lendir (*slime layer*) atau biofilm, tahan terhadap banyak antibiotik dan desinfektan. Bersifat aerob obligat, namun dapat tumbuh secara fakultatif anaerobik dengan nitrat sebagai akseptor elektron. Bakteri tumbuh baik pada suhu $25-37^{\circ}\text{C}$ (optimal 37°C), dapat tumbuh di media sederhana tanpa kebutuhan nutrisi khusus. Koloni umumnya berwarna hijau kebiruan, keabuan, atau kekuningan, menghasilkan pigmen khas seperti: piosianin (biru kehijauan), pioverdin (kuning kehijauan, berfluoresensi), piorubin (merah), piomelanin (coklat kehitaman). Aroma khas seperti bau anggur atau amis (bau amonia atau jagung rebus).

Bahaya *Pseudomonas* pada makanan dan minuman:

1. Keracunan dan Infeksi

Pada orang dengan sistem imun lemah menimbulkan gejala diare, demam, mual, muntah, dan infeksi saluran cerna. Pada pasien imunokompromais (misalnya penderita kanker, bayi, lansia), *Pseudomonas* dapat menyebabkan: infeksi sistemik (sepsis), Infeksi saluran kemih, infeksi paru-paru (pneumonia), infeksi luka atau kulit.

2. Pembentukan Biofilm

Pseudomonas dapat membentuk biofilm di permukaan peralatan makanan/minuman (misalnya di pipa, galon, atau mesin pengisi). Biofilm ini sulit dibersihkan dan membuat bakteri resisten terhadap disinfektan, memperbesar risiko kontaminasi berulang.

3. Toksin dan Enzim

Menghasilkan pigmen dan toksin (seperti piosianin, elastase) yang merusak jaringan dan mengganggu sistem imun. Dalam minuman dan makanan olahan, toksin dan enzim ini bisa menyebabkan perubahan rasa, bau, dan warna, menandakan pembusukan.

4. Kerusakan Produk

Pada produk susu, daging, dan sayur-sayuran, *Pseudomonas* menyebabkan pembusukan cepat, menghasilkan lendir, bau amis, atau warna kehijauan/biru. Semua ini adalah tanda makanan tidak layak konsumsi.

D. ALAT & BAHAN

1. Peralatan yang digunakan sebagai berikut:

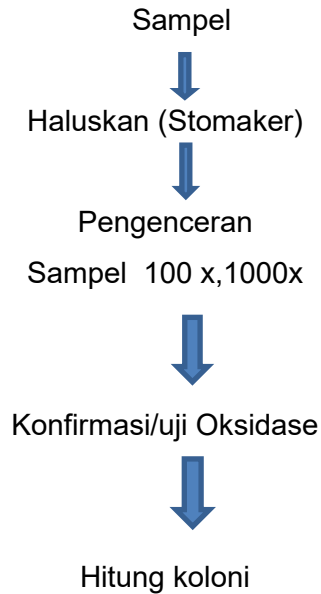
- a. Kantong *stomacher* steril
- b. *Stomacher*
- c. Erlenmeyer
- d. Cawan petri
- e. Ose platina atau batang kaca
- f. Pipet 1mL
- g. Inkubator 25°C
- h. Alat hitung koloni
- i. Oven
- j. *Waterbath*
- k. pH meter

2. Media dan Reagensia

- a. *Agar Cephalotin Sodium Fusidate Cetrinide* (Agar CFC)
- b. Kertas oji oksidase

E. PROSEDUR

SKEMA PEMERIKSAAN



1. Hari Pertama

a. Persiapan Sampel

Timbang sampel secara aseptik sebanyak 25 gram dalam kantong *stomacher* steril, selanjutnya tambahkan 225 ml *peptone salt solution* (PSS), homogenkan dengan *stomacher* selama 30 detik, sehingga diperoleh suspensi pengenceran 10^{-1} .

b. Cara Uji

Lanjutkan pengenceran sampai diperoleh suspensi 10^{-3} dengan cara memasukkan 1mL sampel pengenceran 10^{-1} ke dalam tabung reaksi steril, tambahkan 9mL *peptone salt solution* (PSS) untuk pengenceran 10^{-2} , kemudian dilakukan hal yang sama untuk mendapatkan pengenceran 10^{-3} . Ambil 1mL sampel dari pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . Siapkan cawan petri duplo untuk masing-masing tingkat pengenceran. Tuangkan media *Cephalotin Sodium Fusidate Ceftrimide* (CFC) suhu $\pm 45^{\circ}\text{C}$ (15mL) ke dalam tiap cawan dan segera digoyang sedemikian rupa sehingga suspensi tercampur merata dan biarkan memadat. Kemudian inkubasikan pada inkubator suhu 37°C selama 44 jam \pm 4 jam.

2. Hari Kedua

a. Pengamatan koloni

Koloni dugaan *Pseudomonas aeruginosa* menunjukkan koloni berfluoresensi hijau kebiruan, dikonfirmasi dengan uji oksidase (positif).

b. Uji Konfirmasi

Prinsip: untuk mendeteksi aktivitas enzim sitokrom C-oksidase yang dapat

mengoksidase reagen (tetrametil-p-fenilendiamin) menjadi senyawa berwarna biru/ungu tua.

Cara kerja: Ambil 1 koloni bakteri tersangka dari media agar kemudian tempelkan pada kertas saring yang sudah ditetesi reagen oksidase.

- Jika oksidase positif maka akan muncul warna ungu pada kertas oksidase dalam waktu 5-10 detik.
- Jika oksidase negatif maka kertas oksidase tidak berubah warna dalam waktu 30 detik.

c. Hitung jumlah koloni dikonfirmasi per cawan.

Cawan yang dihitung antara 30 - 300 koloni.

Pilih 5 koloni secara acak dari setiap cawan kemudian dikonfirmasi dengan reaksi oksidase.

Gunakan rumus **Colony Forming Unit (CFU)**:

$$CFU/ml = \frac{\text{Jumlah koloni}}{\text{Volume inokulum (ml)} \times \text{Faktor pengenceran}}$$

Contoh pada pengenceran 10^{-3} , 1 mL diinokulasikan dan menghasilkan 60 koloni.

$$CnFU/ml = \frac{60}{1 \times 10^{-3}} = 6 \times 10^4$$

F. EVALUASI

1. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri yang tidak dapat meragikan karbohidrat tetapi menghasilkan pigmen biru kehijauan yang disebut:
 - A. Piosianin
 - B. Pyoverdine
 - C. Karetenoid
 - D. Bakterioklorofil
 - E. Violacein
2. Pengolahan sampel makanan sebelum diidentifikasi dilakukan pengenceran:
 - A. 10^{-1}
 - B. 10^{-2}
 - C. 10^{-3}
 - D. 10^{-4}
 - E. 10^{-5}
3. Pertumbuhan koloni *Pseudomonas aeruginosa* pada media *Agar Cephalotin Sodium Fusidate Cefrimide* berwarna:
 - A. Hijau kebiruan
 - B. Biru kehijauan
 - C. Merah muda
 - D. Merah tua
 - E. Transparan
4. Berapakah jumlah bakteri (CFU/mL) jika ditemukan jumlah koloni *Pseudomonas aeruginosa* sebanyak 35 pada pengenceran 10^{-2}
 - A. $3,5 \times 10^3$
 - B. $3,5 \times 10^4$
 - C. $3,5 \times 10^5$
 - D. $3,5 \times 10^6$
 - E. $3,5 \times 10^7$
5. Jika ditemukan koloni Khas koloni *Pseudomonas aeruginosa* dilanjutkan uji:
 - A. Oksidase
 - B. Katalase
 - C. Koagulase
 - D. Fermentase
 - E. Reaksi biokimia

G. RUBRIK PENILAIAN ASPEK PSIKOMOTORIK

No.	Unit kompetensi	Bobot	Nilai (10-100)	B x N
1.	Persiapan spesimen	1		
2.	Teknik Aseptik	1		
3.	Pengolahan sampel	1		
4.	Teknik pengenceran sampel	2		
5.	Proses pembiakan metode pour plate	2		
6.	Uji Oksidase/konfirmasi	1		
7.	Penghitungan koloni	2		
6.	Interpretasi hasil	2		
7.	Penanganan Limbah	1		
Nilai Total				

D. DAFTAR PUSTAKA

- Atia, R., Mohamed, H., Abo ElRoos, N., & Awad, D. (2022). Incidence of pseudomonas specises and effect of their virulence factors on milk and milk products. *Benha Veterinary Medical Journal*, 42(1), 1–5. <https://doi.org/10.21608/BVMJ.2022.103086.1481>
- Etikasari, R., Tetuko, A., & Rosiana, L. H. (2018). Skrining Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pohon Buah Terhadap *Pseudomonas Aeruginosa*. *IJF (Indonesia Jurnal Farmasi)*, 3(1), 1–4. <https://doi.org/10.26751/IJF.V3I1.658>
- Purwaningsih, D., & Wulandari, D. (2021). Uji Aktivitas Antibakteri Hasil Fermentasi Bakteri Endofit Umbi Talas (*Colocasia esculenta* L) terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* : Potential of Antibacterial Compound Fermentation of Endophytic Bacteria from Taro Tuber (*Colocasia esculenta* L.) againts *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Sains Dan Kesehatan*, 3(5), 750–759. <https://doi.org/10.25026/JSK.V3I5.622>
- SNI 01-3553-2006. (n.d.). *Air minum dalam kemasan ICS 67.160.20 Badan Standardisasi Nasional*.

JURNAL PRAKTIKUM
PEMERIKSAAN BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa*

Hasil Pengamatan pada sampel :

Hari Pertama :

1. Melakukan pengenceran sampel :

2. Penanaman pada media Selektif :

Hari Kedua :

1. Hasil Isolasi pada media selektif

No	Ciri Koloni :	Media :
	Bentuk	
	Ukuran	
	Warna	
	Elevasi	
	Pinggiran	
	Ciri khas lainnya	

Bakteri Terduga :

2. Uji biokimia
 Tes Oksidase :

3. Hasil Perhitungan Koloni

No	Pengenceran	Jumlah Bakteri

Hasil Perhitungan :

.....

BAB X

PEMERIKSAAN BAKTERI *Bacillus cereus*

A. TUJUAN UMUM

Mahasiswa mampu merencanakan, mengambil, melakukan pemeriksaan bakteriologis spesimen air, makanan dan minuman sesuai standar operasional prosedur.

B. TUJUAN KHUSUS

- a. Mahasiswa mampu memahami teknik pemeriksaan bakteri *Bacillus cereus* pada spesimen makanan dan minuman
- b. Mahasiswa mampu melakukan pengambilan spesimen dari air, makanan dan minuman
- c. Mahasiswa mampu melakukan pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri *Bacillus cereus* pada spesimen air, makanan dan minuman
- d. Mahasiswa mampu melakukan interpretasi dan verifikasi hasil isolasi dan identifikasi bakteri *Bacillus cereus*

C. DASAR TEORI

Bakteri berbentuk batang yang berspora dan bersifat gram positif *Bacillus cereus* tumbuh dengan cara anaerob secara fakultatif. Selnya juga besar dibandingkan dengan bakteri batang lainnya. Ciri morfologi dan biokimia *B. cereus* digunakan untuk membedakannya dari jenis *Bacillus* lainnya. Faktor-faktor seperti motilitas (*B. cereus* adalah yang paling motil), pembentukan kristal toksin (*B. thuringiensis*) dan aktivitas hemolitik (*B. cereus* dan *Bacillus* lain mempunyai aktivitas β -hemolitik, sedangkan *B. anthracis* biasanya tidak). Ini adalah beberapa cara yang dapat digunakan untuk membedakannya.

Bakteri Gram positif *B. cereus* membentuk spora dan tersebar di tanah, perairan, tumbuhan, dan hewan. Ini juga tahan terhadap radiasi, pemanasan, dan dehidrasi. Bakteri ini diketahui dapat tumbuh dalam makanan yang telah diolah panas dan kemudian didinginkan dengan lambat. Ini memungkinkan spora bakteri yang tahan panas untuk bergerminasi menjadi sel vegetatif dan menghasilkan toksin emetik dan enterotoksin. *B. cereus* dapat mengontaminasi makanan mentah, seperti ikan, dan makanan yang mengandung pati, seperti nasi. Spora bakteri ini tahan terhadap asam, mereka juga dapat tumbuh di makanan yang mempunyai pH rendah/asam.

B. cereus menyebabkan penyakit diare dan muntah. Penyakit diare memiliki gejala yang mirip dengan yang disebabkan oleh *Clostridium perfringens*, yaitu buang

air besar encer, perut kejang-kejang, dan sakit 6 hingga 15 jam setelah mengkonsumsi makanan yang terkontaminasi; gejalanya jarang dengan mual. Penyakit muntah, yang biasanya ditandai dengan mual terjadi 0,5 hingga 6 jam setelah mengkonsumsi makanan yang terkontaminasi. Selain itu, beberapa strain *B. subtilis* dan *B. licheniformis* dapat menyebabkan muntah karena dapat menghasilkan toksin yang tahan panas, seperti yang dibuat oleh *B. cereus*. Dosis infeksi *B. cereus* mencapai lebih dari $10^5/g$. Jumlah koloni *B. cereus* dalam makanan lebih dari 10^6 koloni/g menunjukkan bahwa perkembangbiakan dan pertumbuhan *B. cereus* aktif, kondisi ini dapat membahayakan kesehatan. Beberapa pengamatan menunjukkan tanda-tanda lain dari invasi atau kontaminasi *B. cereus*, termasuk *bovine mastitis*, infeksi piogen dan sistemik hebat, gangren, septic meningitis, selulit, panoftalmritis, abses paru, kematian bayi, dan endokarditis. *B. cereus* menghasilkan toksin yang menyebabkan kedua penyakit tersebut. Toksin penyebab intoksikasi adalah dodekadepsipeptida siklik sereulida, dan enterotoksin protein hemolisin BL (Hbl), enterotoksin nonhemolitik (Nhe) dan sitotoksin K (CytK).

Pada pangan, konsentrasinya 10^3 koloni/g atau kurang; namun kebanyakan kurang dari 10^2 koloni/g. Beberapa jenis pangan rentan terhadap kontaminasi bakteri ini yaitu daging, susu, sayuran, ikan, produk pangan berbahan baku beras, pangan yang mengandung pati / pasta, kentang, dan keju. Makanan hasil kombinasi seperti saus, pudding, sup, pasteri, cassarole, dan selada sering berkaitan dengan *outbreak* keracunan makanan. Cara terbaik untuk mencegah kontaminasi spora *B. cereus* adalah dengan memasak makanan dengan sempurna, karena spora ini dapat bertahan hidup di suhu di bawah 100°C .

D. ALAT DAN BAHAN

1. Alat

- | | |
|-------------------------------------|---------------------------|
| a. Cawan petri | b. pH meter |
| c. Tabung reaksi | d. Timbangan analitik |
| e. Pipet ukuran 1mL, 2mL, 5mL, 10mL | f. <i>Magnetic stirer</i> |
| g. Botol media/ erlenmeyer | h. <i>Vortex</i> |
| i. Tabung durham | j. Inkubator |
| k. Batang gelas bengkok | l. Penangas air |
| m. Gunting | n. Autoklaf |
| o. Pinset | p. Lemari steril |
| q. Ose | r. Lemari pendingin |
| s. <i>Stomacher</i> | t. <i>Freezer</i> |

1. Pembakar bunsen

12. Tisu

2. Bahan

- a. *Mannitol egg yolk ploymyxin broth (MYP) Agar*
- b. *Tryptic soy polymyxin broth broth*
- c. *Phenol Red Dextrose Broth*
- d. *Nitrate Broth*
- e. *Nutrient Agar (slant dan cawan)*
- f. *Nutrient Agar dengan L-tyrosine*
- g. *Nutrient Broth dengan lysozyme*
- h. *Voges-Proskauer Medium (VP) dimodifikasi*
- i. SIM Medium
- j. Reagen uji Nitrat (*Nitrate solution A dan B*)
- k. Reagen uji VP (*Barrite A dan B*)
- l. Alkohol 70 %

E. PROSEDUR

1. Pra Analitik

- a. Persiapan alat, bahan dan spesimen (pada bab Alat dan Bahan)
- b. Pengambilan spesimen air, makanan dan minuman

Gunakan alat-alat yang steril, salah satunya wadah spesimen botol spesimen steril atau *steril tube collection* untuk menghindari kontaminasi terhadap spesimen yang diambil. Pada spesimen air, gunakan botol steril yang dirancang khusus untuk mengambil spesimen air. Selain itu, pastikan area pengambilan sampel bersih dan bebas dari kontaminasi. Usahakan melakukan pengambilan sampel di tempat yang dekat dengan sumbernya (misalnya, keran air atau area produksi makanan). Untuk air dari sumber lain (sungai, sumur), ambil sampel di kedalaman sekitar 30cm dengan mulut botol menghadap ke arah arus (jika ada). Jika tidak ada arus, gerakkan botol menjauhi tangan. Cara pengambilan spesimen yaitu:

- 1) Sterilkan tangan dan *handscoon* sebelum melakukan pengambilan spesimen. Desinfeksi area terdekat pengambilan spesimen jika spesimen adalah air keran atau air PDAM.
- 2) Ambil sampel dari beberapa titik berbeda pada makanan padat (misalnya, daging, buah-buahan) untuk mendapatkan representasi yang lebih baik. Untuk spesimen air gunakan alat yang steril untuk mengambil spesimen

seperti pipet ukur dan botol spesimen. Sedangkan untuk makanan cair, gunakan pipet steril untuk mengambil spesimen.

- 3) Jika sampel harus diencerkan, gunakan larutan pengencer yang steril.
- 4) Untuk makanan yang sudah diolah, pastikan untuk mengambil spesimen dari berbagai bagian produk.
- 5) Untuk minuman dalam kemasan, ambil sampel langsung dari kemasan setelah dibuka secara aseptik.
- 6) Tutup botol segera setelah pengisian dan simpan dalam wadah pendingin (*ice box*) jika pengujian tidak bisa dilakukan segera.
- 7) Beri label spesimen yang telah diambil.

c. Spesimen harus diberi label yang berisi:

- 1) Nama spesimen
- 2) Nomor identifikasi spesimen
- 3) Lokasi pengambilan spesimen
- 4) Tanggal dan waktu pengambilan spesimen

d. Informasi yang dicantumkan pada label harus jelas dan bisa dicocokkan dengan formulir permintaan pengujian spesimen air, makanan, dan minuman ketika diterima oleh laboratorium.

e. Penanganan dan Pengiriman Spesimen

- 1) Jaga suhu spesimen tetap dingin (4-8°C) selama transportasi untuk mencegah pertumbuhan mikroba. Gunakan *ice box* atau wadah pendingin.
- 2) Kirim spesimen ke laboratorium sesegera mungkin (kurang dari 2 jam), idealnya dalam waktu 24 jam setelah pengambilan untuk meminimalkan perubahan kondisi spesimen.

2. Analitik

a. Kontrol Kualitas Media

b. Pengujian pH Media

Pengujian pH dilakukan pada media yang telah dibuat. Jika pH media terlalu asam, maka ditambahkan NaOH, dan jika pH media terlalu basa, maka ditambahkan H₂SO₄, hingga pH diperoleh yang sesuai dengan ketentuan.

c. Uji Sterilitas Media

Beberapa kelompok media dari media yang telah disterilisasi diambil secara acak dan dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 35-37°C selama 1-2 kali sehari. Jika ada lebih dari 2 koloni bakteri per cawan setelah inkubasi, sterilisasi dinyatakan gagal, dan media harus dibuang.

Hasil uji sterilitas media disimpan.

d. Uji Kinerja/Performa Media

Satu mata ose digunakan sebagai inokulum dan suspensi *strain* bakteri stok dibuat dengan kekeruhan setara dengan standar Mc Farland 0,5. Selama satu hari, diinkubasi pada suhu 35-37°C. Media tetap dapat digunakan jika koloni bakteri tumbuh di dalamnya. Galur stok yang digunakan dari *Bacillus cereus*. Catatan uji performa media disimpan.

e. Kontrol Kualitas Reagen

Pengujian kualitas reagen dilakukan sebagai berikut

- 1) Setiap kali larutan/reagen kerja baru disiapkan dan setiap minggu.
- 2) Reagen yang kedaluwarsa dan yang menunjukkan tanda-tanda kerusakan, misalnya keruh, terdapat endapan dan perubahan warna, harus dibuang.

f. Pemeliharaan dan Kualitas Instrumen

- 1) Pengujian kualitas instrumen tidak dapat dilakukan jika instrumen rusak atau tidak terawat dengan baik, diperlukan perawatan pemeliharaan rutin pada semua instrumen. Tabel berikut menyajikan jadwal perawatan dan pemeliharaan.

Tabel 2. Kontrol Kualitas Instrumen

Instrumen	Perawatan Rutin	Pemantauan	Pemeliharaan dan Inspeksi Teknis
Autoklaf	Dibersihkan dan ganti air tiap bulan	<ol style="list-style-type: none"> 1. Diperiksa dan disesuaikan level air sebelum pengoperasian/ penggunaan. 2. Catat waktu, suhu, dan tekanan setiap pemakaian 3. Catat kinerja autoklaf menggunakan indikator biologis (<i>Geobacillus stearothermophilus</i>) 	Setiap 6 bulan
Inkubator	Bagian dalam dinding dan rak inkubator dibersihkan setiap bulan	Catat suhu pada setiap awal pemakaian (batasan 35±1°C)	Setiap 6 bulan
Mikroskop	<ol style="list-style-type: none"> 1. Membersihkan lensa dengan tissue lensa setiap setelah digunakan 2. Bagian mekanis dibersihkan dan 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kesejajaran kondensor diperiksa setiap bulan 2. Diletakkan silica biru di bawah penutup mikroskop untuk 	Setiap tahun

	dilumasi setiap minggu 3. Beri penutup saat mikroskop tidak digunakan	mencegah pertumbuhan jamur pada tempat yang lembab	
Lemari Es	Dibersihkan dan di <i>defrost</i> setiap 2 bulan	Suhu dicatat setiap pagi (suhu yang disarankan 2-8°C)	Setiap 6 bulan
Oven	Bagian dalam dibersihkan setiap bulan	Waktu dan suhu dicatat untuk setiap proses	Setiap 6 bulan

2) Pengoperasian instrumen selalu dicatat pada formulir penggunaan alat.

g. Persiapan Spesimen

- 1) Buat pengenceran 1:10 dari spesimen yang tercampur dengan baik, dengan memindahkan spesimen secara aseptik ke volume pengencer yang diinginkan.
- 2) Ukur spesimen cairan yang kental (viskositas tidak lebih kental dari susu) secara volumetrik dan campur secara menyeluruh dengan volume pengencer yang sesuai (1mL ke dalam 99mL, atau 10mL ke 90mL atau 50mL ke 450mL).
- 3) Timbang spesimen cairan kental dan campur secara menyeluruh dengan volume pengencer yang sesuai (1 + 0,1g ke dalam 99mL, 10 + 0,1g ke dalam 90mL, 50 + 0,1g ke dalam 450mL).
- 4) Timbang 50 + 0,1g spesimen padat atau semi padat ke dalam tabung blender steril atau ke dalam kantung *stomacher*. Tambahkan 450mL pengencer. *Blender* selama 2 menit dengan kecepatan rendah (sekitar 8000 rpm) atau campur dalam *stomacher* selama 30-60 detik.
- 5) Spesimen bubuk dapat ditimbang langsung dicampur dengan pengencer. Kocok dengan kuat 50 kali melalui busur 30cm. Pada bagian spesimen makanan, partikel-partikel mengapung dalam pengencer. Biarkan partikel-partikel tersebut mengendap selama 2-3 menit dan kemudian ambil pengencer dari bagian pengenceran dimana partikel makanan paling sedikit dan lanjutkan proses selanjutnya yaitu proses difusi.

h. Pemeriksaan Spesimen

- 1) Pengujian selalu disertai dengan menggunakan kontrol positif.
- 2) Pindahkan 1mL spesimen dari 10^0 ke dalam larutan 9mL BPW untuk mendapatkan pengenceran 10^{-1} . Dengan cara yang sama dibuat pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , dan seterusnya. Untuk spesimen susu cair

dimulai dari pengenceran 10^0 , sedangkan contoh daging, telur, dan susu (padat dan semi padat) mulai pengenceran 10^{-1} .

3) Kemudian dilanjutkan uji MPN atau TPC.

4) Metode MPN

Metode ini cocok untuk pemeriksaan makanan yang diperkirakan mengandung kurang dari 1000 sel *B. cereus* per gram.

a) Inokulasikan masing-masing ke dalam tiga tabung *tryptic soy polymyxin broth* dengan 1mL homogenat makanan dan pengencerannya.

b) Inkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam.

c) Periksa pertumbuhan padat khas *B. Cereus*.

d) Campur dengan *vortex* dan gunakan ose *loop* 3mm untuk memindahkan 1 *loop* penuh dari setiap tabung positif pertumbuhan ke dalam cawan media MYP padat. Inokulasikan dengan teknik *streak* untuk memperoleh koloni yang terisolasi.

e) Inkubasi 30°C selama 48 jam.

f) Pilih salah satu atau lebih koloni eosin merah muda (fermentasi manitol positif) yang dikelilingi oleh zona endapan (karena aktivitas lesitinase) dari setiap cawan dan pindahkan ke NA *slant* untuk uji konfirmasi.

g) Jumlah *B. cereus* yang dikonfirmasi ditentukan menggunakan tabel MPN untuk jumlah *coliform*. Berdasarkan jumlah tabung pada setiap pengenceran di mana *B. cereus* terdeteksi dan dilaporkan sebagai MPN *B. cereus* per gram.

5) Metode TPC

Metode ini cocok untuk pemeriksaan makanan yang diperkirakan mengandung lebih dari 1000 sel *B. cereus* per gram.

a) Inokulasikan duplikat cawan MYP Agar dengan homogenat dan setiap pengenceran homogenat dengan menyebarkan 0,1mL secara merata ke setiap cawan secara duplikat dengan batang kaca bengkok steril.

b) Inkubasi 24 jam pada suhu 30°C .

c) Setelah 24 jam, koloni dihitung. Jumlah koloni eosin merah muda yang dikelilingi oleh zona lesitinase dihitung. Jika reaksi tidak jelas, inkubasi cawan selama 24 jam sebelum menghitung. Cawan idealnya harus memiliki 15-150 koloni.

d) Hitung koloni dengan cara berikut:

- 1)) Setelah inkubasi, hitung semua koloni pada cawan yang berisi 30-300 koloni dan catat hasilnya per pengenceran yang dihitung.
- 2)) Pada cawan yang berisi 30-300 koloni hitunglah jumlah sebenarnya pada kedua cawan pengenceran dan sesuai dengan rumus yang diberikan di bawah ini:

$$N = \frac{\sum C}{(N1 + 0,1N2)D}$$

C = jumlah koloni yang dihitung pada semua cawan yang disimpan

N1 = jumlah cawan yang dipertahankan pada pengenceran pertama

N2 = jumlah cawan yang dipertahankan pada pengenceran kedua

D = Faktor pengenceran yang sesuai dengan pengenceran pertama

Misalnya : Pada pengenceran pertama tertahan (10^{-2}) 165 dan 218 koloni. Pada pengenceran kedua (10^{-3}) 15 dan 24.

$$N = \frac{165+218+15+24}{[2+(0,1 \times 2) \times 10 \times 10^{-2}]}$$

$$N = 19182$$

- 2)) Lima atau lebih koloni *B. cereus presumptive* diambil dari cawan dan dipindahkan ke *Nutrient Agar slant* untuk konfirmasi

6) Teknik Konfirmasi

a) Pewarnaan Gram

Inkubasi *NA slant* yang telah *distreak* baik dari atas maupun bawah untuk konfirmasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Lakukan pewarnaan Gram dan periksa di bawah mikroskop. *B. cereus* akan tampak sebagai basil gram positif besar dalam rantai pendek hingga panjang, spora berbentuk elips, dari tengah hingga subterminal dan tidak membengkakkan sporangium.

b) Uji Biokimia

Pindahkan 3mm kultur ini ke dalam tabung yang berisi 0,5ml pengencer steril. Homogenkan dengan *vortex*. Inokulasikan atau lakukan *pour culture* yang tersuspensi ke dalam media berikut (Tabel Uji Biokimia *B. cereus*) dan baca hasil reaksi biokimianya.

Tabel 3. Uji Biokimia *B. cereus*

Media	Inkubasi pada suhu 35°C	Reaksi Khas
<i>Phenol Red Dextrose Broth</i>	Inkubasi secara anaerobik	Produksi asam (warna berubah dari merah menjadi kuning)
<i>Nitrate Broth</i>	Selama 24 jam	Reduksi nitrat menjadi nitrit
<i>Modified VP Medium</i>	Selama 48 jam	Positif
NA dengan tyrosine	Selama 48 jam	Positif
NB dengan <i>lysozyme</i>	Selama 24 jam	Pertumbuhan positif

Tabel 4. MPN

Per 1 Gram Spesimen, Menggunakan 3 Tabung (Seri 333) dengan Porsi Masing-Masing 0,1; 0,001; dan 0,001 Gram

Tabung Positif				Tabung Positif				Tabung Positif				Tabung Positif			
0,1	0,001	0,001	MPN	0,1	0,001	0,001	MPN	0,1	0,001	0,001	MPN	0,1	0,001	0,001	MPN
0	0	0	<3	1	0	0	3,6	2	0	0	9,1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7,2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7,3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6,1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9,2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6,2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9,3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9,4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100

F. EVALUASI

1. *Bacillus cereus* umumnya dapat ditemukan pada:
 - A. Darah manusia dan jaringan otot
 - B. Susu segar saja
 - C. Tanah, air, tumbuhan, dan makanan bertepung
 - D. Air steril dan media sintetik
 - E. Lingkungan rumah sakit saja
2. Penyakit yang disebabkan oleh *Bacillus cereus* terutama adalah:
 - A. Demam tifoid dan kolera
 - B. Diare dan muntah akibat toksin emetik serta enterotoksin
 - C. Pneumonia dan meningitis
 - D. Difteri dan batuk rejan
 - E. Tuberkulosis
3. Dosis infeksi *Bacillus cereus* yang dapat menimbulkan gejala mencapai lebih dari:
 - A. $10^2/g$
 - B. $10^3/g$
 - C. $10^4/g$
 - D. $10^5/g$
 - E. $10^6/g$
4. Koloni khas *Bacillus cereus* pada media umumnya tampak:
 - A. Kecil, tidak berwarna, halus, rata
 - B. Besar, buram, tepi tidak teratur, kadang terdapat hemolisis β
 - C. Bundar, hitam pekat dengan halo opak
 - D. Hijau metalik berkilau
 - E. Transparan dengan pigmen merah bata
5. Uji biokimia yang digunakan untuk konfirmasi *Bacillus cereus* adalah, kecuali:
 - A. Phenol Red Dextrose Broth
 - B. Nitrate Broth
 - C. Uji Lysozyme
 - D. Modified VP Medium
 - E. Uji Koagulase

G. RUBRIK PENILAIAN ASPEK PSIKOMOTORIK

No.	Unit kompetensi	Bobot	Nilai (10-100)	B x N
1.	Persiapan spesimen	1		
2.	Teknik Aseptik	1		
3.	Inokulasi bakteri dan spesimen pada media	2		
4.	Teknik Pewarnaan Gram	2		
5.	Pembacaan Hasil Uji Koagulase	2		
6.	Perhitungan Koloni	2		
7.	Penarikan Kesimpulan	2		
6.	Desinfeksi meja kerja serta kerapian alat dan bahan	1		
7.	Penanganan Limbah	1		
Nilai Total				

H. DAFTAR PUSTAKA

- Bottone E.J. 2010. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Review*, 23(2), 382-398. doi:10.1128/CMR.00073-09.
- Dewi A. and Tamba S. 2022. Epidemiologi Penyakit Menular *Bacillus cereus*. Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Sam Ratulangi.
- Dietrich R., Jessberger N., Ehling-Schulz M., Martsbauer E., & Granum PE. 2021. The Food Poisoning Toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins*,13(98). <https://doi.org/10.3390/toxins13020098>.
- Ministry of Health and Family Welfare Government of India. 2012. Manual Methodes of Analysis of Food: Microbiology Testing.
- Mustopa R., Silviani Y., Bangun S.R., Wijayanti D.R., Artanti D., & Dwiyantri RD. 2024. Modul Praktikum Bakteriologi Bagi Mahasiswa Prodi Teknologi Laboratorium Medik. AIPTLMI.
- Rahayu W.P., Dewanti-Hariyadi R., Kartasasmita E., Hudiyono S., Kusumaningrum H.D., & Ambarwati S. 2012. Pedoman Kriteria Cemarana Pada Pangan Siap saji dan Pangan Industri Rumah Tangga. BPOM RI.
- Yennie Y., Dewanti R.H., Kusumaningrum H.D., & Poernomo A. 2022. Kontaminasi *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus cereus* Pada Susy Di Tingkat Ritel di Wilayah Jabodetabek. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 25(2), 331-344. <http://dx.doi.org/10.17844/jphpi.v25i2.42066>.

JURNAL PRAKTIKUM
PEMERIKSAAN BAKTERI *Bacillus cereus*

Hasil Pengamatan pada spesimen nomor :

Hari Kedua:

1. Pengamatan pertumbuhan positif atau negatif

.....

2. Karakteristik koloni bakteri yang tumbuh

.....

.....

.....

3. Karakteristik terduga *Bacillus cereus*

.....

.....

.....

Hari Ketiga: (TPC jika diduga kurang dari 1000 *B. cereus*/gram)

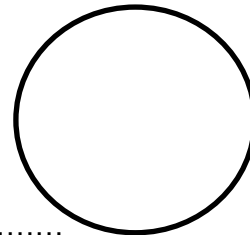
1. Pewarnaan Gram :

Bentuk :

Susunan :

Warna :

Sifat Gram :



2. Perhitungan Koloni

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Hari Keempat (MPN jika terduga lebih dari 1000 *B. cereus*/gram)

1. Karakteristik koloni bakteri yang tumbuh

.....

.....

.....

.....

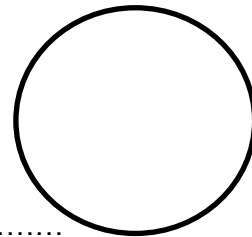
2. Perhitungan Koloni

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Hari Kelima (MPN)

1. Pewarnaan Gram :

- Bentuk :.....
Susunan :.....
Warna :.....
Sifat Gram :.....



2. Uji Biokimia

Media	Reaksi Khas	Dokumentasi
Phenol Red Dextrose Broth		
Nitrate Broth		
NB Lysozyme		

Hari Keenam

1. Uji Biokimia

Media	Reaksi Khas	Dokumentasi
Modified VP Medium		

Kesimpulan

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Pembimbing Praktikum

.....

Praktikan

(.....)

(.....)

BAB XI

PEMERIKSAAN BAKTERI *Listeria monocytogenes*

A. TUJUAN UMUM

Mahasiswa mampu merencanakan, mengambil, melakukan pemeriksaan bakteriologis spesimen air, makanan dan minuman sesuai standar operasional prosedur.

B. TUJUAN KHUSUS

- a. Mahasiswa mampu memahami teknik pemeriksaan bakteri *Listeria monocytogenes* pada spesimen makanan dan minuman
- b. Mahasiswa mampu melakukan pemeriksaan isolasi dan identifikasi bakteri *Listeria monocytogenes* pada spesimen air, makanan dan minuman
- c. Mahasiswa mampu melakukan interpretasi dan verifikasi hasil isolasi dan identifikasi bakteri *Listeria monocytogenes*

C. DASAR TEORI

Listeria monocytogenes adalah spesies bakteri dari genus *Listeria* yang paling penting sebagai penyebab spektrum luas penyakit pada hewan dan manusia. *Listeria monocytogenes* adalah bakteri batang pendek, gram positif, dan tidak membentuk spora. Bakteri ini bersifat katalase positif dan memiliki motilitas ujung-ke-ujung yang berputar pada suhu 22–28°C tetapi tidak pada suhu 37°C. *Listeria* tumbuh baik pada media seperti agar darah domba 5% yang memperlihatkan zona hemolisis kecil yang khas di sekitar dan di bawah koloni. Organisme ini bersifat anaerob fakultatif, dan hidrolisis esculin positif. *Listeria* menghasilkan asam tetapi tanpa gas dari pemanfaatan berbagai karbohidrat. Klasifikasi serologis hanya dilakukan di laboratorium rujukan dan terutama digunakan untuk studi epidemiologi. Ada 13 serovar yang diketahui berdasarkan antigen O (somatik) dan H (flagela). Serotipe 1/2a, 1/2b, dan 4b mencakup lebih dari 95% isolat dari manusia. Serotipe 4b menyebabkan sebagian besar wabah bawaan makanan.

Listeria monocytogenes mampu tumbuh dan bertahan hidup dalam berbagai kondisi lingkungan. Bakteri ini dapat bertahan hidup pada suhu lemari es (4°C), dalam kondisi pH rendah dan kadar garam tinggi. Ketahanan bakteri ini terhadap pengawetan makanan, menjadikannya sebagai patogen *foodborne* yang penting.

Listeria monocytogenes masuk ke dalam tubuh melalui saluran pencernaan setelah mengonsumsi makanan yang terkontaminasi seperti keju atau sayuran. Bakteri ini memiliki beberapa protein adhesin (Ami, Fbp A, dan protein flagelin) yang

memfasilitasi pengikatan bakteri ke sel inang dan berkontribusi terhadap virulensi. Bakteri ini memiliki protein permukaan dinding sel yang disebut internalin A dan B yang berinteraksi dengan E-kaderin, reseptor pada sel epitel, yang mendorong fagositosis ke dalam sel epitel. Setelah fagositosis, bakteri tersebut terkandung dalam fagolisosom, tempat pH rendah mengaktifkan bakteri untuk memproduksi listeriolisin O. Enzim ini melisiskan membran fagolisosom dan memungkinkan *Listeria* keluar ke dalam sitoplasma sel epitel. Bakteri berkembang biak, dan ActA, protein permukaan *Listeria* lainnya, menginduksi polimerisasi aktin sel inang, yang mendorongnya ke membran sel. Dengan terdorongnya membran sel inang, akan menyebabkan pembentukan tonjolan memanjang yang disebut filopoda. Filopoda ini ditelan oleh sel epitel, makrofag, dan hepatosit yang berdekatan, *Listeria* dilepaskan, dan siklus dimulai lagi. *Listeria monocytogenes* dapat berpindah dari satu sel ke sel lain tanpa terpapar antibodi, komplemen, atau sel polimorfonuklear. Zat besi merupakan faktor virulensi yang penting. *Listeria* menghasilkan siderofor dan mampu mengikat zat besi dari transferin.

Imunitas manusia terhadap *Listeria monocytogenes* terutama dimediasi oleh sel, seperti yang ditunjukkan dengan terjadinya infeksi intraseluler. Kekebalan dapat dijalankan oleh limfosit yang tersensitisasi, tetapi tidak oleh antibodi. Ada dua bentuk *listeriosis* perinatal pada manusia. Sindrom awal (*granulomatosis infantiseptica*) merupakan hasil infeksi di dalam rahim dan merupakan bentuk penyakit yang menyebar, yang ditandai dengan sepsis neonatal, lesi pustular, dan granuloma yang mengandung *Listeria monocytogenes* di beberapa organ. Kematian dapat terjadi sebelum atau setelah kelahiran. Sindrom lanjutan menyebabkan terjadinya meningitis antara periode kelahiran dan minggu ketiga kehidupan; sering kali disebabkan oleh serotipe 4b dan memiliki tingkat kematian yang signifikan.

Orang dewasa dapat terinfeksi meningoensefalitis *Listeria*, bakteremia, dan (jarang) infeksi fokal. Meningoensefalitis dan bakteremia paling sering terjadi pada pasien dengan immunosupresi, dan *Listeria* merupakan salah satu penyebab meningitis yang paling umum. Manifestasi klinis meningitis *Listeria* pada pasien immunosupresi memiliki gejala bervariasi dari yang tidak berbahaya hingga yang parah dan tidak spesifik. Pada individu yang memiliki kekebalan tubuh yang baik, penyakit mungkin tidak terjadi meskipun mengonsumsi makanan yang terkontaminasi, atau pasien mungkin mengalami gastroenteritis demam simptomatik. Penyakit ini berkembang setelah masa inkubasi 6–48 jam. Gejalanya meliputi demam, menggigil, sakit kepala, mialgia, nyeri perut, dan diare. Penyakit ini biasanya sembuh sendiri dalam 1–3 hari; sebagian besar laboratorium klinis tidak secara rutin melakukan kultur *Listeria* dari sampel tinja rutin. Diagnosis *listeriosis* didasarkan pada isolasi organisme

dalam kultur darah dan cairan tulang belakang.

Listeria monocytogenes menunjukkan kemampuan beradaptasi yang tinggi terhadap kondisi lingkungan yang buruk dan umum dalam industri makanan, terutama pada makanan siap saji. Strain *Listeria monocytogenes* menimbulkan tantangan terhadap keamanan pangan karena kemampuannya membentuk biofilm, peningkatan resistensi terhadap disinfektan, antiseptik dan beberapa jenis antibiotik (trimetoprim-sulfametoksazol dan eritromisin), dan persistensi jangka panjang di lingkungan.

Temuan pada berbagai penelitian tentang kontaminasi *Listeria monocytogenes* pada berbagai produk makanan siap saji menekankan pentingnya pemantauan yang kuat, termasuk karakterisasi kontaminasi, untuk pencegahan dan pengendalian *L. monocytogenes*. Langkah-langkah pengendalian perlu disusun dalam pemrosesan daging segar dan meningkatkan desain fasilitas dan peralatan agar dapat meningkatkan kebersihan secara keseluruhan dan mengurangi persistensi *L. monocytogenes*. Selain itu, pihak-pihak terkait perlu menekankan adanya pengawasan berkelanjutan, penilaian risiko yang efektif, dan langkah-langkah pengendalian yang ketat untuk meminimalkan risiko kesehatan masyarakat yang terkait dengan infeksi berat, khususnya wabah *listeriosis*. Pemahaman yang lebih baik tentang dinamika kompleks patogen dalam produk makanan dan lingkungan terkaitnya dapat membantu meningkatkan keamanan pangan secara keseluruhan dan mengembangkan strategi yang lebih efektif untuk mencegah konsekuensi kesehatan yang parah dan kerugian ekonomi.

Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 13 tahun 2019 tentang Batas Maksimal Cemarkan Mikroba Dalam Pangan Olahan menyebutkan bahwa *Listeria monocytogenes* termasuk bakteri yang dipersyaratkan dalam kriteria pangan olahan. Beberapa pangan olahan memiliki variasi persyaratan mengenai keberadaan bakteri ini; mulai dari syarat tidak boleh mengandung *Listeria monocytogenes* (negatif) atau dapat diterima dalam jumlah 102 koloni/g sampel yang diperiksa. Syarat tersebut dijumpai pada produk-produk susu dan analognya; produk sayuran, rumput laut, dan biji-bijian; daging dan produk daging, termasuk daging unggas dan daging hewan buruan; ikan dan produk perikanan termasuk moluska, krustase dan ekinodermata serta amfibi dan reptil; telur dan produk-produk telur.

B. ALAT & BAHAN

1. Alat

- a. Neraca
- b. Erlenmeyer
- c. Kaca objek dan kaca penutup

- d. Ose/sengkelit
- e. Tabung reaksi dan tabung durham
- f. Cawan petri
- g. Pipet ukur
- h. Inkubator
- i. Mikroskop fase kontras

2. Media Reagen

- | | |
|--|---|
| 1. Asam asetat 5N | 18. <i>Phenyl Ethanol Agar (PEA)</i> |
| 2. <i>Acriflavir HCl</i> | 19. <i>Purple carbohydrate fermentation broth base (M 57)</i> |
| 3. <i>Media Blood Agar Plate (BAP)</i> | 20. <i>SIM motility medium</i> |
| 4. <i>Cycloheximide</i> | 21. <i>Trypticase soy broth</i> |
| 5. <i>Etanol absolut</i> | 22. <i>Trypticase soy agar</i> |
| 6. <i>Enrichment Broth (EB M-61)</i> | 23. <i>Trypticase</i> |
| 7. <i>Fluorescent Antibody (FA) buffer</i> | 24. <i>Triple Sugar Iron Agar (TSIA)</i> |
| 8. <i>Glycine anhidride</i> | 25. <i>Yeast Extract</i> |
| 9. Reagen pewarnaan Gram | 26. <i>Modified McBride Agar (MMA)</i> |
| 10. KOH 40% | 27. <i>Lithium Chloride Phenyl Ethanol Moxalactam Medium</i> |
| 11. Larutan H ₂ O ₂ 3% | 28. <i>Oxford Listeria Selective Agar</i> |
| 12. <i>Listeria-typing sera set</i> | 29. Reagen pendeteksi nitrit (reagen A, B, C) |
| 13. <i>Lithium chloride</i> | 30. <i>Zinc powder</i> |
| 14. <i>Moxalactam</i> | 31. Media uji MR-VP |
| 15. <i>Nalidixic acid</i> | 32. Reagen uji MR-VP |
| 16. Garam fisiologis | 33. Media uji urea |
| 17. <i>Nutrient Broth (NB)</i> | 34. <i>Nitrate broth</i> |

C. PROSEDUR

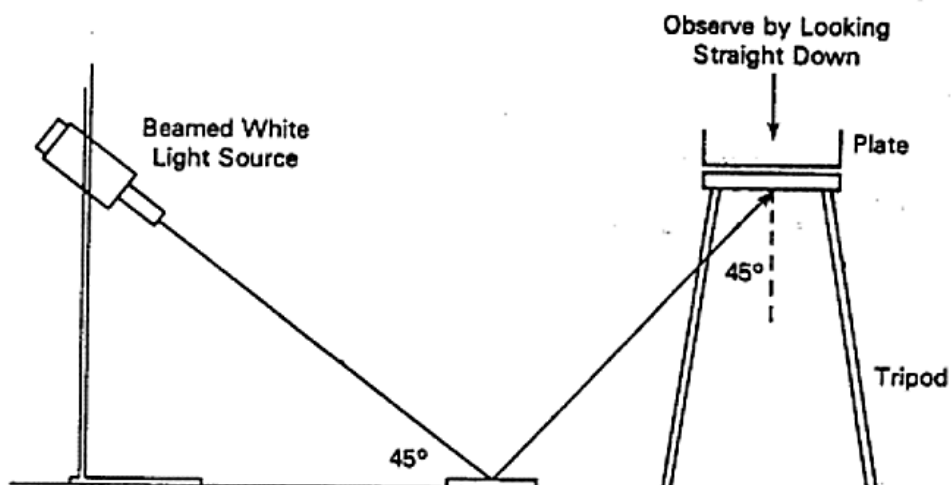
1. Pengkayaan

- b. Timbang 25g contoh padatan atau 25mL contoh cairan. (*prosedur preparasi sampel lihat Bab 1 Modul ini*)
- c. Tambahkan 225mL *Listeria Enrichment Broth (LEB)*.
- d. Lakukan homogenisasi dengan *blender* atau *stomacher* hingga benar-benar homogen.

e. Inkubasikan biakan LEB tersebut selama 48 jam (± 2 jam) pada suhu 30°C .

2. Isolasi

- a. Goreskan biakan LEB yang telah diinkubasi ke media selektif *Modified McBride Agar* (MMA), *Lithium Chloride Phenyl Ethanol Moxalactam Medium* (LPM), *Oxford Listeria Selective Agar*.
- b. Inkubasikan ketiga media selektif selama 48 jam (± 2 jam) pada suhu 30°C .
- c. Amati koloni tersangka pada media MMA dan LPM menggunakan cahaya putih yang cukup terang yang lebih dahulu dipantulkan pada kaca datar (*Hendy Illumination*, lihat gambar 1).
- d. Ciri khusus *Listeria monocytogenes* pada media-media selektif tersebut adalah sebagai berikut:
 - 1) Pada MMA: warna koloni biru keabu-abuan sampai biru
 - 2) Pada LPM: warna koloni biru mengkilat atau kadang-kadang mendekati putih mengkilat
 - 3) Pada Oxford: warna koloni coklat kehitaman disertai "halo" berwarna coklat di sekeliling koloni
- e. Ambil 5 koloni atau lebih koloni-koloni berciri khusus tersebut, goreskan pada media isolasi *Trypticase Soy Agar* dengan 0,6% *Yeast Extract* (TSA-YE).
- f. Inkubasikan cawan TSA-YE pada suhu 30°C selama 24 jam (± 2 jam) atau sampai tumbuh memuaskan.



Gambar 4. Skema Hendy Illumination (Mikulec & Savic, 2010)

3. Identifikasi

- a. Amati koloni-koloni tersangka pada cawan TSA-YE dengan menggunakan pencahayaan seperti gambar 1. Ciri khusus koloni *Listeria monocytogenes*

- akan nampak sama seperti yang diterangkan pada prosedur isolasi (poin d).
- b. Ambil koloni tersangka dan buat preparat basah menggunakan larutan garam fisiologis, dan ditutup dengan kaca penutup. Tetesi dengan minyak imersi, dan periksa di bawah mikroskop kontras fase. Koloni yang dipilih berasal dari pertumbuhan yang padat. Jika koloni diambil dari pertumbuhan yang jarang, sel bakteri akan menempel pada gelas objek dan tidak tampak bergerak. Spesies *Listeria* berbentuk tipis, batang pendek dengan sedikit berputar atau bergerak mendatar. Selalu bandingkanlah dengan biakan yang telah diketahui sebagai kontrol positif. Bakteri yang berbentuk kokus, batang yang besar atau batang dengan pergerakan seperti berenang dan cepat bukan sejenis *Listeria*.
 - c. Lakukan uji katalase pada koloni tersangka. Spesies *Listeria* bersifat katalase positif.
 - d. Buat pewarnaan Gram untuk biakan yang berumur 16-24 jam. Semua spesies *Listeria* berbentuk batang kecil, Gram positif, tetapi reaksi pewarnaan dapat berubah-ubah pada biakan yang lebih tua.
 - e. Ambil koloni tersangka dan tanam ke dalam tabung *Trypticase Soy Broth* dengan *Yeast Extract* (TSB-YE) untuk uji biokimia dan fermentasi. Inkubasi pada suhu 35°C selama 34 jam. Biakan ini memungkinkan disimpan pada suhu 4°C untuk beberapa hari dan digunakan sebagai inokulum.
 - f. Inokulasikan koloni dari TSA-YE pada media *Blood Agar Plate* (BAP) dengan menusuk lempengan agar yang telah dituang tebal dan kering sempurna (periksa adanya air sebelum digunakan). Buat lajur sebanyak 20-25 di bagian luar dari alas cawan petri. Tusukkan biakan pada setiap lajur. Selalu tusukkan biakan kontrol positif dari *Listeria ivanovii* dan *Listeria monocytogenes*, dan kontrol negatif dari *Listeria innocua*. Inkubasikan selama 48 jam pada suhu 35°C.
 - g. Amati lempengan BAP yang telah ditusuk dengan biakan pada cahaya terang. *Listeria monocytogenes* dan *Listeria seeligeri* menghasilkan daerah yang terang di sekeliling tusukan. *Listeria innocua* tidak menunjukkan daerah hemolisis, sedangkan *Listeria ivanovii* menghasilkan daerah yang bersih di sekitar tusukan. Perbedaan karakteristik spesies pada tahap ini jangan digunakan untuk menentukan spesies, namun catatlah reaksi hemolisis secara alami.
 - h. Lakukan uji urea dengan menggunakan biakan TSB-YE. Inokulasikan ke media urea agar miring dengan menggores permukaan miring tanpa

melakukan tusukan. Inkubasikan pada suhu 35°C selama 5 hari. Amati perkembangan/ perubahan warna ungu (sebagai hasil positif) setiap hari. *Listeria* tidak menghidrolisis urea dan tidak akan terjadi perubahan warna.

i. Uji reduksi nitrat

Lakukan uji reduksi nitrat dengan menggunakan biakan TSB-YE. Inokulasikan ke dalam *nitrate broth*, inkubasikan pada suhu 35°C selama 5 hari. Tambahkan 0,2mL reagen A, lanjutkan dengan 0,2mL reagen B. Warna merah menunjukkan terdapatnya nitrit, misal dari nitrat yang telah direduksi. Jika tidak terjadi perubahan warna, tambahkan *zinc powder* dan diamkan selama 1 jam. Perubahan warna merah menunjukkan bahwa nitrat masih terdapat dan belum tereduksi. Hanya *Listeria murrayi* yang mereduksi nitrat. Sebagai prosedur alternatif, tambahkan 0,2mL reagen A, lanjutkan dengan 0,2mL reagen C dan terbentuknya warna oranye menunjukkan reduksi nitrat. Jika tidak terjadi perubahan warna, tambahkan 0,2mL reagen *cadmium*. Terbentuknya warna oranye menunjukkan tidak tereduksi. Prosedur ini meniadakan penggunaan karsinogen *alpha naphthylamine*.

j. Inokulasikan media SIM *motility* dengan biakan TSB-YE. Inkubasikan selama 7 hari pada suhu ruangan. Amatilah setiap hari spesies *Listeria* bergerak dan memberikan bentuk khas seperti payung terkembang.

k. Inokulasikan tabung media MR-VP dengan menggunakan biakan TSB-YE. Inkubasikan pada suhu 35 selama 48 jam. Pindahkan 1 mL ke tabung bersih dan tambahkan 0,5mL alfa naftol, selanjutnya dengan 0,2mL 40% KOH. Kocok dan amati, warna merah yang nyata menunjukkan hasil positif. Inkubasikan sisa biakan 2 hari lagi. Tambahkan reagen *methyl red* ke dalam tabung, dan akan berubah menjadi merah untuk hasil positif. Uji MR dan VP untuk spesies *Listeria* adalah positif.

l. Dengan menggunakan biakan TSB-YE, inokulasikan TSIA dengan cara menggoreskan pada agar miring dan tusukan lurus ke dasar. Inkubasikan hingga 5 hari pada suhu 35°C. Spesies *Listeria* memberikan reaksi asam pada media miring, dan asam pada tusukan, tetapi tidak menghasilkan H₂S.

m. Inokulasikan biakan TSB-YE ke dalam media karbohidrat 0,5% dalam *purple carbohydrate broth: dextrose, esculin, maltose, rhamnose, mannitol, dan xylose*. Inkubasikan selama 7 hari pada suhu 35°C. Spesies *Listeria* menghasilkan asam tanpa gas, atau tak ada reaksi. Cocokkan ke lampiran 1 untuk reaksi-reaksi *xylose, rhamnosa*, dan spesies *Listeria*. Semua spesies akan menghasilkan positif *dextrose, esculin, dan maltose*. Semua spesies

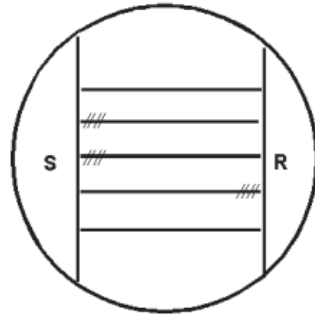
Listeria kecuali *Listeria grayi* dan *Listeria murrayi* akan menghasilkan reaksi negatif pada mannitol.

4. Serologi

Uji ini digunakan bila ada pertimbangan epidemiologi yang sangat mendesak. Gunakan biakan TSB-YE untuk diinokulasikan pada media *Tryptose Broth*, inkubasikan selama 24 jam pada suhu 30°C. Cuci kedua agar miring dengan 3mL Difco FA *buffer* dan pindahkan ke tabung tertutup 16mm X 125mm steril. Panaskan dalam *waterbath* 80°C selama 1 jam. Putar pada 1600 x g selama 30 menit. Pindahkan 2,2-2,3 mL cairan lapisan atas dan encerkan kembali padatan dalam *buffer*. Ikutilah rekomendasi-rekomendasi untuk prosedur pengenceran serum dan penggumpalan. Jika perlakuan *serotype flagelar* (H) dan sub faktor (O) diperlukan, prosedur-prosedurnya dapat diperoleh dari *Food Microbiology Methods Development Branch (HFF-234) Division of Microbiology, FDA 200C street W, Washington DC 20204*.

5. Uji CAMP (Christie, Atkins, Munch-Peterson)

Kultur *Staphylococcus aureus* dan *Rhodococcus equi* untuk uji CAMP dapat diperoleh dari *Food Microbiology Methods Development Branch (HFF-234) Division of Microbiology, FDA 200C street W, Washington DC 20204*. Goreskan beta hemolitik *S.aureus* (CIP 5710 atau NCTC 7428) dan *R.equi* (NCTC 1621) secara vertikal pada media BAP. Di antara kedua garis vertikal ini digariskan koloni tersangka secara horisontal tanpa bersentuhan. Sesudah diinkubasi 24 jam dan 48 jam pada suhu 35°C, amati adanya hemolisis yang dipengaruhi oleh goresan-goresan vertikal (lihat gambar 2). Hemolisis *Listeria monocytogenes* terjadi di sekitar goresan *S.aureus*. Hemolisis *Listeria ivanovii* terjadi di sekitar goresan *S.aureus*. Hemolisis *Listeria seeligeri* terjadi di dekat goresan *S.aureus*. Uji CAMP membedakan *Listeria ivanovii* dari *Listeria seeligeri*, dan dapat membedakan *Listeria seeligeri* yang mempunyai hemolisis lemah dari *Listeria welshimeri* yang non hemolitik. Isolasi-isolasi yang memberikan reaksi berciri *Listeria monocytogenes* untuk hasil hemolisin harus diuji CAMP sebelum diidentifikasi sebagai *Listeria innocua* non hemolitik. Suatu faktor yang dengan mudah disiapkan dari biakan *S.aureus* dapat digunakan untuk mendorong terjadinya hemolisis oleh *Listeria monocytogenes* dan *Listeria seeligeri* pada lempengan BAP.



Gambar 5. Tes CAMP pada media BAP.

Garis horisontal mewakili spesies yang diuji.

Garis vertikal mewakili *Staphylococcus aureus* (R) dan *Rhodococcus equi* (R).

5. Interpretasi hasil

Semua *Listeria spp* adalah bentuk batang kecil, gram positif, yang menunjukkan gerakan pada preparat basah dan pada media SIM. *Listeria* bersifat katalase positif, tidak menghidrolisis urea. Pada media TSIA menghasilkan asam pada agar miring dan asam pada tusukan, namun tidak menghasilkan H₂S. *Listeria* menggunakan *dextrose*, *esculin*, dan maltosa, dan beberapa spesies menggunakan *mannitol*, *rhamnosa*, dan *xylose* dengan menghasilkan asam. Semua spesies menggunakan *mannitol*, dengan menghasilkan asam adalah *Listeria grayi* atau *Listeria murrayi*. Reduksi nitrat membedakan keduanya: *Listeria murrayi* yang mereduksi nitrat. *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, dan *Listeria seeligeri* menghasilkan hemolisis pada tusukan BAP dan oleh karena itu, uji CAMP positif. Dari ketiga spesies tersebut, hanya *Listeria monocytogenes* yang gagal menggunakan *xylose*, namun positif menggunakan *rhamnose*. Kesukaran dalam membedakan *Listeria ivanovii* dari *Listeria seeligeri* dapat ditetapkan dengan uji CAMP.

Listeria seeligeri menunjukkan peningkatan hemolisis pada goresan *S.aureus*. *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua* bias memberikan reaksi sama *rhamnose-xylose* seperti *Listeria monocytogenes* tetapi negatif pada uji CAMP. *Listeria innocua* adalah spesies yang kadang-kadang memberikan hasil negatif untuk penggunaan *rhamnose-xylose*. *Listeria welshimeri* yang menghasilkan *rhamnose* negatif mungkin atau kadang-kadang keliru dengan hemolisis yang lemah *Listeria seeligeri*, kecuali ditentukan dengan uji CAMP. Setelah semua hasil-hasil diperoleh, *serotype* isolat *Listeria* menjadi sangat berarti. Secara biokimia, serologi dan patogenitas dijabarkan pada tabel 5 sampai 7. Semua data yang diperoleh sebelum penentuan spesies.

Tabel 5. Perbedaan beberapa spesies *Listeria*

Spesies	Reaksi						
	Hemolisis (beta)	Reduksi nitrat	Mannitol	Rhamnose	Xylose	Sheep blood	Virulence (mouse test)
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	-	+	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. innocua</i>	-	-	-	Va	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	Va	-	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>L. murrayi</i>	-	+	+	Va	-	-	-

Va = variasi

Tabel 6. Serologi untuk spesies *Listeria*

Spesies	Serotype
<i>L. monocytogenes</i>	1/2A, 1/2B, 1/2C, 3A, 3B, 3C, 4A, 4AB, 4B, 4C, D, 4E, "7"
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	4AB, 6A, 6B, Un
<i>L. welshimeri</i>	6A, 6B
<i>L. seeligeri</i>	1/2B, 4C, 4D, 6B, Un

Un = tidak mutlak

Tabel 7. Reaksi CAMP untuk *Listeria*

Spesies	Reaksi hemolisis	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	-
<i>L. ivanovii</i>	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-
<i>L. seeligeri</i>	-	-

F. EVALUASI

1. Seorang TTLM melakukan isolasi bakteri *Listeria* dari sampel produk daging olahan dengan cara menggoreskan biakan LEB yang telah diinkubasi ke media selektif *Modified McBride Agar* (MMA), *Lithium Chloride Phenyl Ethanol Moxalactam Medium* (LPM), dan *Oxford Listeria Selective Agar*. Media tersebut diinkubasikan selama 48 jam (± 2 jam) pada suhu 30°C. Setelah inkubasi, TTLM tersebut mengamati pertumbuhan koloni secara langsung di ruangan laboratorium. Hasil pengamatan tidak dapat disimpulkan sesuai interpretasi hasil yang menjadi acuan. Apa kesalahan dari TTLM tersebut?
 - A. Waktu inkubasi terlalu lama
 - B. Media yang digunakan salah
 - C. Suhu inkubasi kurang tepat
 - D. Cahaya untuk pengamatan tidak tepat
 - E. Sampel yang dipilih salah
2. TTLM melakukan uji CAMP dari isolat tersangka *Listeria* pada media BAP yang telah digores vertikal menggunakan bakteri *Rhodococcus equi* dan *Escherichia coli*. Setelah isolat digoreskan secara vertikal kemudian diinkubasi 24 jam dan 48 jam pada suhu 35°C, hasilnya ternyata tidak dapat diamati. Apa kesalahan dari TTLM tersebut?
 - A. Waktu inkubasi tidak sesuai
 - B. Media yang digunakan salah
 - C. Suhu inkubasi kurang tepat
 - D. Arah penggoresan isolat terbalik
 - E. Bakteri uji salah
3. Apa yang menyebabkan *Listeria monocytogenes* termasuk patogen *foodborne* yang penting?
 - A. Kemampuannya membentuk endospora untuk perlindungan
 - B. Ketahanannya terhadap berbagai kondisi pengawetan
 - C. Keistimewaannya dalam membentuk endotoksin yang sangat poten
 - D. Keunggulannya dalam berkompetisi dengan bakteri lain yang terdapat dalam produk pangan
 - E. Keahliannya dalam melakukan mutasi genetik secara cepat untuk bertahan terhadap antibiotik
4. Hasil pengamatan koloni yang tumbuh disimpulkan sementara sebagai *Listeria monocytogenes*, karena menghasilkan warna koloni coklat kehitaman disertai “halo” berwarna coklat di sekeliling koloni. Apa nama media yang digunakan pada uji tersebut?

- A. *Modified McBride Agar* (MMA)
 - B. *Lithium Chloride Phenyl Ethanol Moxalactam Medium* (LPM)
 - C. *Oxford Listeria Selective Agar*
 - D. *Trypticase Soy Agar* dengan *Yeast Extract* (TSB-YE)
 - E. *Blood Agar Plate* (BAP)
5. Uji identifikasi untuk bakteri *Listeria monocytogenes* memerlukan waktu yang lama dan proses yang cukup rumit, sehingga tidak semua uji perlu dilakukan, terutama uji serologi. Kapan uji tersebut perlu dilakukan?
- A. Jika ada pertimbangan epidemiologi yang cukup mendesak
 - B. Saat ada kelebihan waktu dari TTLM
 - C. Apabila ada permintaan dari produsen produk pangan
 - D. Jika ada reagen uji serologi yang tidak digunakan
 - E. Apabila di laboratorium sedang tidak ada sampel lain untuk diperiksa

D. RUBRIK PENILAIAN ASPEK PSIKOMOTORIK

No.	Unit Kompetensi	Bobot	Nilai (10-100)	B x N
1.	Teknik aseptik	2		
2.	Pengambilan sampel	2		
3.	Penanaman bakteri pada media	2		
4.	Teknik Pewarnaan	2		
5.	Pembacaan Hasil Uji Biokimia	2		
6.	Penarikan Kesimpulan	2		
7.	Penanganan limbah	2		
Nilai Total				

E. DAFTAR PUSTAKA

- SNI 01-4502-1998, (1998), Metode Pengujian *Listeria monocytogenes*
- Badan Pengawas Obat dan Makanan, (2013), Peraturan BPOM Nomor 13 tahun 2019 tentang Batas Maksimal Cemaran Mikroba Dalam Pangan Olahan
- Mikulec DP, Savic NR, (2010), New Experiences in isolating *Listeria* spp in milk and dairy products, Radovi Sa XXIV savetovanja agronoma, veterinara i tehnologa, Vol. 16. Br 3-4. See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/277152131>
- Silva, A., Silva, V., Gomes, J. P., Coelho, A., Batista, R., Saraiva, C., Esteves, A., Martins, Â., Contente, D., Diaz-Formoso, L., Cintas, L. M., Igrejas, G., Borges, V., & Poeta, P. (2024). *Listeria monocytogenes* from Food Products and Food Associated Environments: Antimicrobial Resistance, Genetic Clustering and Biofilm Insights. *Antibiotics*, 13(5), 447. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13050447>
- Romero de Castilla López, B., Gómez Lozano, D., Herrera Marteache, A., Conchello Moreno, P., & Rota García, C. (2025). Control of Persistent *Listeria monocytogenes* in the Meat Industry: From Detection to Prevention. *Foods*, 14(9), 1519. <https://doi.org/10.3390/foods14091519>

JURNAL PRAKTIKUM
PEMERIKSAAN BAKTERI *Listeria monocytogenes*

Tanggal :

Data Sampel :

A. Pengamatan Isolasi (setelah 48 jam inkubasi dari hasil pengayaan)

Media	Hasil pengamatan ciri khusus	Interpretasi
<i>McBride Agar</i>		
<i>Lithium Chloride Phenyl Ethanol Moxalactam Medium</i>		
<i>Oxford Listeria Selective Agar</i>		

B. Identifikasi

Prosedur	Hasil pengamatan	Interpretasi
Inokulasi pada media TSA-YE		
Preparat mikroskopis basah		
Uji katalase		
Preparat pewarnaan Gram		
Inokulasi pada media BAP		
Uji urea		
Uji reduksi nitrat		
Uji motilitas		
Uji MR		
Uji VP		
Uji TSIA		
Uji <i>dextrose</i>		
Uji <i>esculin</i>		
Uji <i>maltose</i>		
Uji <i>rhamnose</i>		
Uji <i>mannitol</i>		

Uji xylose		
Uji serologi (jika diperlukan)		
Uji CAMP		

.....

Pembimbing Praktikum

Praktikan

(.....)

(.....)

KUNCI JAWABAN EVALUASI

BAB I

1. B
2. A
3. C
4. C
5. C

BAB II

1. B
2. A
3. A
4. C
5. C

BAB III

1. A
2. B
3. A
4. A
5. D

BAB IV

1. C
2. C
3. B
4. C
5. C

BAB V

1. C
2. B
3. B
4. C
5. A

BAB VI

1. A
2. B
3. D
4. E
5. B

BAB VII

1. E
2. D
3. D
4. E
5. C

BAB VIII

1. B
2. C
3. D
4. E
5. A

BAB IX

1. A
2. A
3. A
4. A
5. A

BAB X

1. C
2. B
3. D
4. B
5. E

BAB XI

1. D
2. D
3. B
4. C
5. A

BIODATA PENULIS



Dr. Elisa Rinihapsari, M.Si.Med. lahir di Surakarta, 5 November 1975. Jenjang pendidikan penulis meliputi S1 Biologi Lingkungan UGM, S2 Ilmu Biomedik UNDIP, dan S3 Ilmu Lingkungan Soegijapranata Catholic University Semarang.

Saat ini penulis merupakan pengajar di Program Studi D3 Analis Kesehatan Politeknik Katolik Mangunwijaya Semarang.

Email : elisarinihapsari@gmail.com



Suryani M. Florence Situmeang, S.Pd, M.Kes lahir di Dolok Masihul, 28 September 1966. Jenjang pendidikan penulis meliputi D3 Analis Kesehatan, S1 Ilmu Pendidikan, S2 Kesehatan Masyarakat USU.

Saat ini penulis merupakan pengajar di D3 Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Medan.

Email: Situmeang.Suryani@gmail.com



Siti Aminah, S.Pd, M.Kes yang lahir di Jakarta, 21 April 1963 ini telah menjalani beberapa pendidikan formal Akademi Analis Medis UNAIR Surabaya, S1 Pendidikan Kimia UNILA Lampung, dan S2 Kesehatan Masyarakat UMITRA Lampung. Penulis merupakan Dosen Jurusan/ Prodi Teknologi Laboratorium Medis (TLM) Poltekkes Kemenkes Tanjung Karang sejak tahun 2000 hingga sekarang. Sebagai seorang yang sepenuhnya mengabdikan dirinya sebagai dosen, selain pendidikan formal yang telah ditempuhnya, penulis juga mengikuti berbagai pelatihan untuk meningkatkan kinerja dosen, khususnya di bidang pengajaran, penelitian dan pengabdian kepada masyarakat. Sebelumnya penulis telah menghasilkan buku yang disusun bersama tim *Book Chapter*

dengan judul Mikrobiologi Terapan, dan sebagai penulis tunggal pada buku ajar Bakteriologi Klinik. Selain itu, penulis juga aktif melakukan penelitian yang diterbitkan di berbagai jurnal nasional maupun internasional.

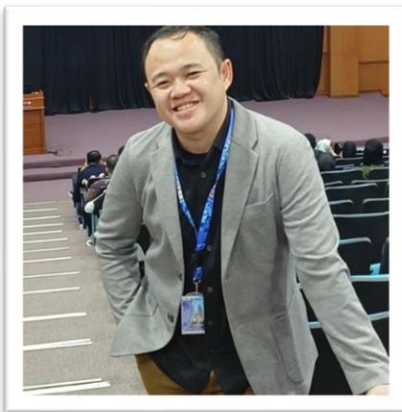
Email: sitiaminah@poltekkes-tjk.ac.id



Hafiz Al Farizi, S.Tr.Kes., M.Kes lahir di Banjarmasin, 06 Juni 1996. Jenjang pendidikan penulis meliputi D4 Poltekkes Kemenkes Banjarmasin Analis Kesehatan, dan S2 Universitas Lambung Mangkurat Fakultas Kedokteran Ilmu Kesehatan Masyarakat.

Saat ini penulis merupakan pengajar di D3 Teknologi Laboratorium Medik Politeknik Unggulan Kalimantan.

Email: hafizalfarisy06@polanka.ac.id



Andreas Putro Ragil Santoso, S.S.T, M.Si lahir di Mojokerto, 18 Juli 1987. Jenjang pendidikan penulis meliputi D-III Analis Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya, D-IV Analis Kesehatan Politeknik Kesehatan Kemenkes Surabaya, S2 Biologi konsentrasi Mikrobiologi di Universitas Udayana.

Saat ini penulis merupakan pengajar di D4 Teknologi Laboratorium Medik Universitas Nahdlatul Ulama Surabaya.

Email : andreasprs87@unusa.ac.id



Neiny Prisy Foekh, S.ST, M.Biomed lahir di Magelang, 16 Februari 1993. Jenjang pendidikan penulis meliputi D4 Analis Kesehatan Institut Ilmu Kesehatan Bhakti Wiyata Kediri dan S2 Ilmu Kedokteran Dasar Univeritas Udayana.

Saat ini penulis merupakan pengajar di Prodi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medik Politeknik Kesehatan Kemenkes Jakarta III.

Email : neinyprisy4@gmail.com



Anas Fadli Wijaya, SST, M.Imun lahir di Tanjung, 3 Januari 1994. Penulis adalah dosen tetap pada Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas dr. Soebandi. Penulis menempuh pendidikan Sarjana Terapan (D4) di Poltekkes Kemenkes Mataram Prodi Teknologi Laboratorium Medis pada tahun 2013-2017 dan melanjutkan pendidikan S2 di Universitas Airlangga Prodi Ilmu Imunologi pada tahun 2018-2020. Saat ini, penulis menjabat sebagai Ketua Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis di Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi dan mengampu mata kuliah Imunologi, Bakteriologi, Sitohistoteknologi dan Hematologi.
E-mail: anasfw94@gmail.com



Iis Herawati, S.Pd, M.Kes Lahir di Garut tanggal 06 Mei 1973, dosen tetap pada Program Studi Teknologi Laboratorium Medis (TLM) Fakultas Ilmu dan Teknologi Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani (FITKes Unjani). Menyelesaikan pendidikan Diploma 3 Analisis Kesehatan di Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung, S1 pada Program Studi Pendidikan Biologi Universitas Siliwangi serta S2 pada Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Konsentrasi Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran.
Email : iis.herawati@lecture.unjani.ac.id