

No : 09
Judul : Uji kualitatif dan kuantitatif Bakteri Coli (Coliform)
Tujuan : - Untuk menentukan kehadiran bakteri coliform dalam sampel air
- Untuk memperkirakan jumlah bakteri coliform dalam sampel air dengan metode Jumlah perkiraan terdekat (JPT).

Teori Dasar :

Pemeriksaan air secara mikrobiologis sangat penting dan dapat dilakukan terhadap semua jenis air yang ada, terutama dilakukan untuk menentukan standar kualitas air. Mengingat bahwa air merupakan sumber kehidupan yang utama bagi semua makhluk hidup.

Pencemar biologis yang mungkin terdapat dalam air, minuman atau makanan, terutama adalah mikroorganisme penyebab penyakit (patogen), penghasil racun atau yang dikenal sebagai pencemar.

Pemeriksaan air secara mikrobiologis baik secara kualitatif maupun secara kuantitatif dapat dipakai sebagai pengukur derajat pencemaran. Selain adanya mikroorganisme dalam air, juga adanya bahan organik perlu mendapat perhatian sebab jumlah bahan organik yang mencemari air sangat mempengaruhi kesuburan pertumbuhan mikroorganisme.

Bakteri golongan coliform dinyatakan sebagai bakteri indikator pencemaran air. Kehadirannya dalam air terutama air sumber MCK sangat tidak diharapkan. Dalam pemeriksaan bakteri golongan coliform ada dua macam, yaitu bakteri golongan coliform non fekal dan bakteri coliform fekal. Coliform non fekal berasal dari hewan atau tanaman yang sudah mati, misalnya *Enterobacter aerogenes*. Sedangkan coliform fekal berasal dari kotoran manusia dan hewan, misalnya *Escherichia coli*.

Untuk mengetahui jumlah coliform dalam suatu sampel dapat digunakan metode Jumlah perkiraan terdekat (JPT) bakteri coliform. Prinsip dari metode ini adalah fermentasi laktosa selama 24 jam oleh bakteri coliform yang akan menghasilkan asam dan gas yang tertangkap oleh tabung Durham dalam tabung uji. Bakteri coliform memiliki kemampuan menguraikan laktosa sebagai sumber karbon sedangkan kelompok mikroba usus yang lain tidak. Sebagai indikator adanya proses penguraian laktosa menjadi asam,

maka ke dalam medium ditambahkan indikator bromcressol purple (Bcp) yang berwarna ungu dalam keadaan netral dan berwarna kuning dalam suasana asam.

Uji kualitatif coliform secara lengkap terdiri dari tiga tahap, yaitu uji penduga, uji penguat, dan uji lengkap. Hasil pengujian uji lengkap, selain membuktikan uji pertama juga dapat menentukan jenis bakteri coliform yang terdapat dalam sampel.

Alat dan Bahan :

- Tabung reaksi
- Tabung Durham
- Autoklaf
- Inkubator
- Lampu bunsen
- Beaker gelas dan kaca pengaduk
- Gelas ukur
- Pipet volume
- Akuades
- Medium kaldu laktosa
- Indikator Brom cressol purple (Bcp)
- Sampel (air ledeng, air sumur, makanan, minuman)

Cara Kerja :

- Menyiapkan medium kaldu laktosa (kaldu 1000 ml, pepton 10 gr, NaCl 5 gr, laktosa 5 gr dan indikator Bcp sebanyak 0,01 gram) larutkan semua bahan dan panaskan, atur agar pH 7 – 7,2. kemudian masukkan medium ke dalam tabung reaksi masing-masing 10 ml bersama tabung Durham yang terbalik dan berisi media (tidak boleh ada gelembung udara dalam tabung Durham), tutup rapat semua tabung dengan kapas. Sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit, angkat dan dinginkan.
- Memasukkan sampel masing-masing sebanyak 10 ml ke dalam 3 tabung medium kaldu laktosa, 1 ml sampel masing-masing ke dalam 3 tabung medium laktosa, 0,1 ml sampel ke dalam 3 tabung medium kaldu laktosa serta 1 ml akuades steril ke dalam 1

tabung medium kaldu laktosa untuk kontrol. Pengisian tabung dilakukan secara aseptik.

- Inkubasikan pada suhu 37 °C selama 24-48 jam.
- Mengamati semua tabung, bila terbentuk gas dan asam berarti hasilnya positif. Adanya asam dan gas disebabkan karena fermentasi laktosa oleh bakteri coliform, asam dilihat dari perubahan warna ungu menjadi kuning dan gas dapat dilihat dalam tabung Durham berupa gelembung udara.

Banyaknya kandungan bakteri coliform dapat dilihat dengan menghitung tabung yang menunjukkan reaksi positif dan lihat tabel MPN/JPT (Most Probable Number/Jumlah Perkiraan Terdekat). Bila inkubasi 1 X 24 jam negatif, inkubasi lanjutkan 2 X 24 jam. Langkah-langkah tersebut di atas disebut **Presumptive Test** atau **uji dugaan**.

Uji Ketetapan (Confirmed test)

Hasil dari uji dugaan kemudian dilanjutkan dengan uji ketetapan. Dari tabung yang positif gas dan asam (terutama pada inkubasi 1 X 24 jam), tanamkan suspensi pada medium EMB agar (Eosin Metilen Blue agar) secara aseptik dengan menggunakan jarum inokulasi.

Inkubasikan pada suhu 37°C selama 1 X 24 jam.

Koloni bakteri *E. coli* (Coliform fekal) tumbuh berwarna merah kehijauan dengan kilat metalik atau koloni merah muda atau merah muda dengan lendir untuk kelompok coliform lainnya.

Uji Kelengkapan (Completed Test)

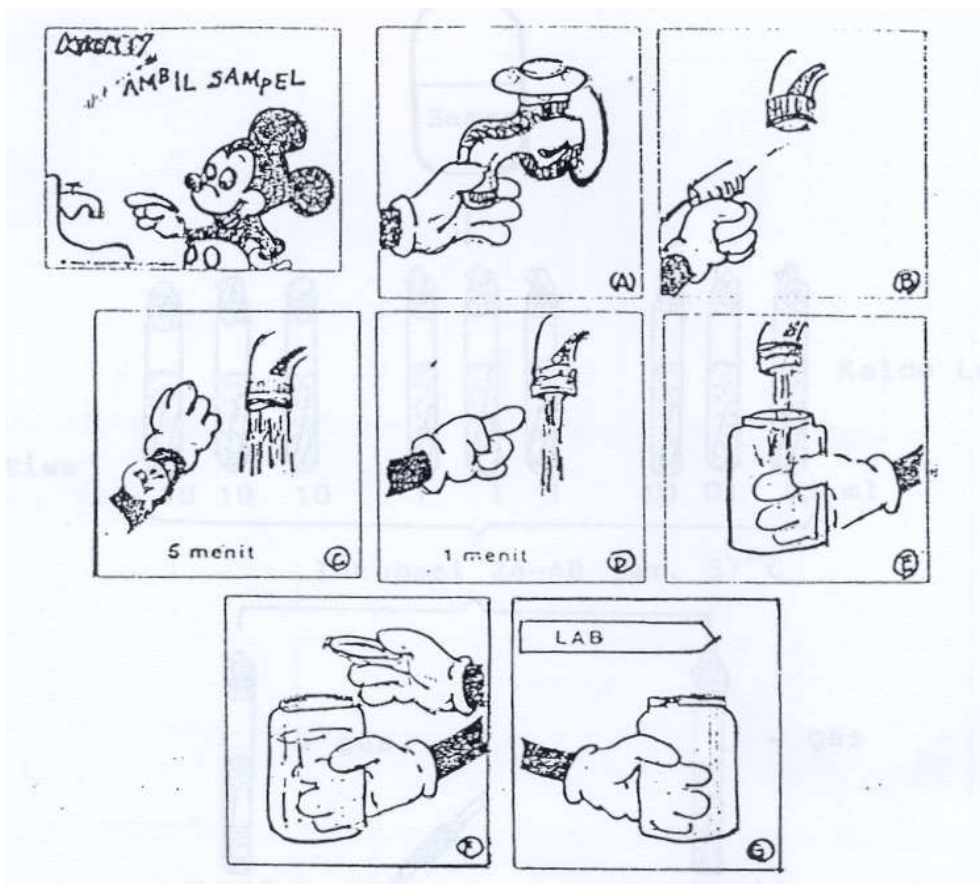
Pengujian dilanjutkan dengan uji kelengkapan untuk menentukan golongan bakteri coliform.

Dari koloni yang berwarna tadi diinokulasikan ke dalam medium kaldu laktosa dan medium KNA agar miring, dengan jarum inokulasi secara aseptik. Inkubasikan pada suhu 37 °C selama 1 X 24 jam.

Bila hasilnya positif (gas dan asam) sama seperti uji dugaan maka benar sampel mengandung bakteri coliform.

Dari KNA agar miring buat pewarnaan Gram, bakteri coliform menunjukkan hasil Gram negatif bentuk batang. Untuk membedakan bakteri golongan coliform dari golongan coliform fekal, buat pekerjaan di atas secara duplo (rangkap dua), satu seri inkubasikan pada suhu 37°C (golongan coli) dan satu seri inkubasikan pada suhu 42°C (golongan coliform non fekal).

Bakteri golongan coliform non fekal tidak dapat tumbuh baik pada suhu 42°C , sedangkan golongan coli fekal dapat tumbuh baik pada suhu 42°C .

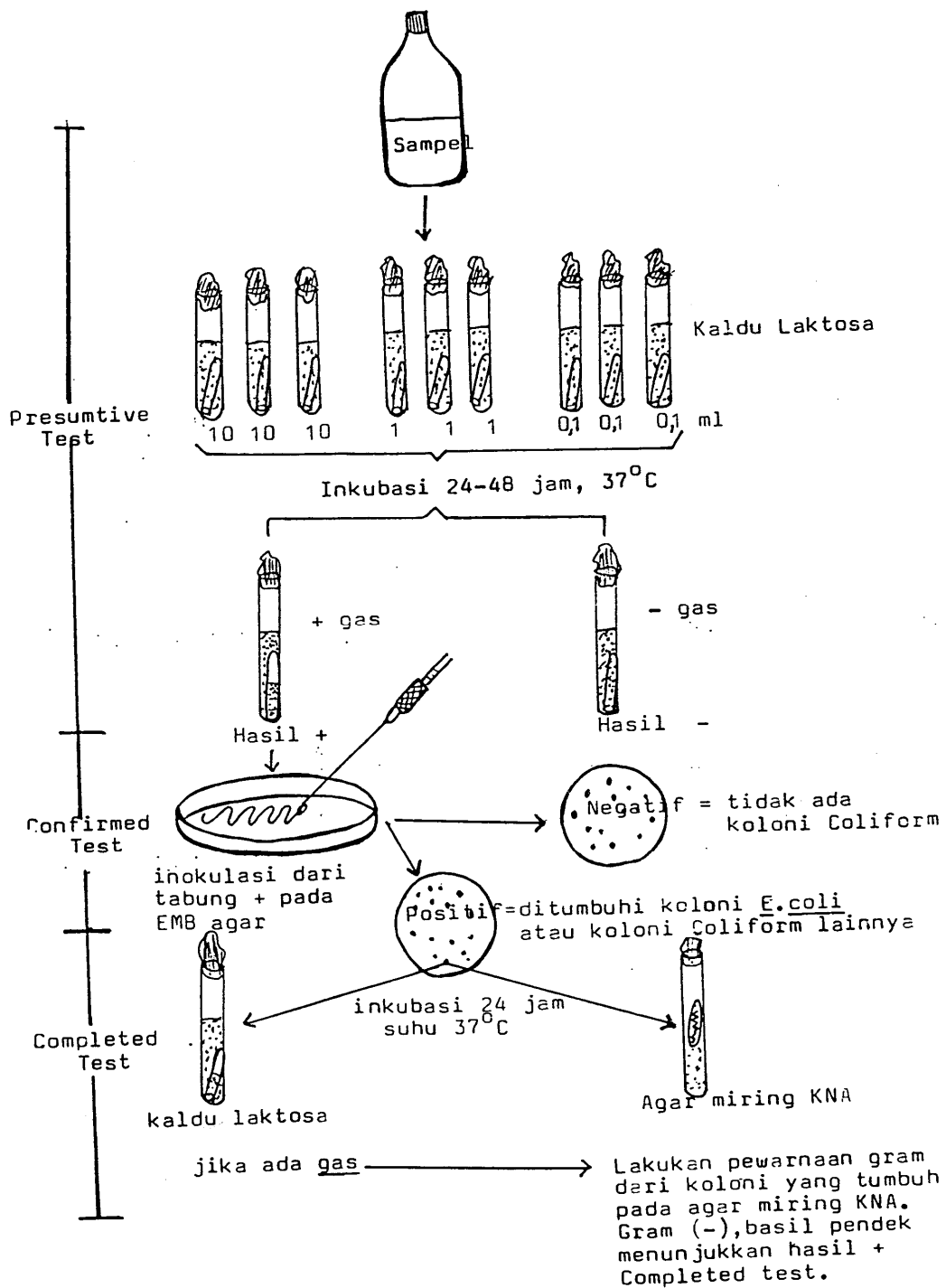


Prosedur Pengambilan Sampel dari Air Ledeng.

Keterangan Gambar :

- A. Pilih sebuah kran yang cukup sering digunakan (air dari kran yang jarang digunakan sudah berubah komposisinya). Lepaskan bagian untuk aerasi atau penyaring kalau ada.
- B. Bakar ujung kran dan bagian dalamnya dengan nyala api (lampu spirtus atau bunsen) selama $\frac{1}{2}$ - 5 menit, jangan memegang atau membersihkan kran tersebut sesudah dibakar (sebelum sampel diambil).
- C. Biarkan air ke luar dari kran dengan debit tinggi selama ± 5 menit.
- D. Kecilkan debit kran dan biarkan mengalir selama satu menit.
- E – G. Siapkan botol tertutup yang steril ; isi botol tersebut dengan sampel air kran sampai $\frac{3}{4}$ volume bersih. Bagian dalam botol dan tutup tidak boleh disentuh kecuali oleh sampel sendiri.

BAGAN PENENTUAN JPT BAKTERI COLI



Tabel JPT per 100 ml sampel dengan menggunakan tiga tabung dari setiap pengenceran.

Jumlah tabung yang positif dalam pengenceran			JPT / 100 ml	Jumlah tabung yang positif dalam pengenceran			JPT / 100 ml
10 ml	1 ml	0,1 ml		10 ml	1 ml	0,1 ml	
0	0	0	-	2	0	0	9,1
0	0	1	3,0	2	0	1	14,0
0	0	2	6,0	2	0	2	20,0
0	0	3	9,0	2	0	3	25,0
0	1	0	3,0	2	1	0	15,0
0	1	1	6,1	2	1	1	21,0
0	1	2	9,2	2	1	2	27,0
0	1	3	12,0	2	1	3	34,0
0	2	0	6,2	2	2	0	21,0
0	2	1	9,3	2	2	1	28,0
0	2	2	12,0	2	2	2	35,0
0	2	3	16,0	2	2	3	42,0
0	3	0	9,4	2	3	0	23,0
0	3	1	13,0	2	3	1	33,0
0	3	2	16,0	2	3	2	44,0
0	3	3	19,0	2	3	3	53,0
1	0	0	3,6	3	0	0	23,0
1	0	1	7,2	3	0	1	33,0
1	0	2	11,0	3	0	2	64,0
1	0	3	15,0	3	0	3	35,0
1	1	0	7,3	3	1	0	43,0
1	1	1	11,0	3	1	1	75,0
1	1	2	15,0	3	1	2	120,0
1	1	3	19,0	3	1	3	160,0
1	2	0	11,0	3	2	0	93,0
1	2	1	15,0	3	2	1	150,0
1	2	2	20,0	3	2	2	210,0
1	2	3	24,0	3	2	3	230,0
1	3	0	16,0	3	3	0	240,0
1	3	1	20,0	3	3	1	460,0
1	3	2	24,0	3	3	2	1100,0
1	3	3	29,0	3	3	3	1200,0

TABEL PENGAMATAN

Presumptive test	Tabung									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Asam										
Gas										
Confirmed test	warna kolori									
Tabung 1										
Tabung 2										
Tabung 3										
Completed test	kaldu laktosa					pewarnaan Gram				
Tabung 1										
Tabung 2										
Tabung 3										

Penentuan Coliform

Suhu 37°C	Tabung									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Asam										
Gas										
Suhu 42°C										
Asam										
Gas										

Pertanyaan :

1. Mengapa *Escherichia coli* (*Coliform fekal*) dijadikan sebagai indikator tercemar tidaknya suatu makanan atau minuman oleh limbah domestik ?
2. Mengapa digunakan medium kaldu laktosa untuk mengetahui adanya bakteri coliform ?
3. Jelaskan mengapa medium EMB agar yang digunakan dalam Confirmed test (uji ketetapan) disebut medium selektif diferensial ?

No : 10
Judul : Uji sensitivitas antimikroba dengan metode Difusi agar (tes Resistensi)
Tujuan : Untuk mempelajari aktivitas antimikroba dan menentukan resisten tidaknya suatu bakteri terhadap beberapa macam antibiotika dan desinfektan.

Teori Dasar :

Banyaknya senyawa baik senyawa organik maupun senyawa anorganik yang dapat membunuh mikroorganisme (antimikroba). Senyawa antimikroba ada yang termasuk kelompok antibiotika, desinfektan, dan antiseptik.

Antibiotika adalah suatu substansi yang dihasilkan mikroorganisme yang dalam jumlah amat sedikit menunjukkan kegiatan antimikroba.

Desinfektan adalah suatu zat kimia yang dapat mematikan sel vegetatif, tetapi belum tentu mematikan bentuk-bentuk spora mikroorganisme.

Antiseptik adalah suatu substansi untuk melawan infeksi atau mencegah pertumbuhan atau kerja mikroorganisme dengan cara menghancurkannya ataupun menghambat pertumbuhannya serta aktifitasnya. Istilah desinfektan dibedakan dari antiseptik dalam hal penggunaannya. Untuk desinfektan biasanya digunakan pada benda-benda atau materi tidak hidup, sedangkan antiseptik digunakan untuk jaringan hidup.

Dapat dilakukan evaluasi laboratoris terhadap efektifitas daya hambat zat-zat antimikroba (antibiotika, desinfektan, dan antiseptik), terhadap pertumbuhan mikroorganisme dengan berbagai cara, diantaranya dengan resistensi tes. Metode difusi agar (Metode Kirby-Bauer) banyak digunakan untuk menentukan kepekaan suatu bahan/obat antimikroba yang diisolasi dari proses infeksi. Metode ini merupakan metode cepat untuk menentukan obat yang tepat (manjur) dengan mengukur diameter zona hambat sekitar cakram kertas yang merupakan hasil difusi obat/bahan antimikroba ke dalam medium.

Pada resistensi tes, cakram kertas yang telah diresapi antibiotika, desinfektan atau antiseptik diletakkan pada permukaan cawan yang telah diinokulasi dengan bakteri. Setelah diinkubasi dilakukan pengamatan terhadap adanya zona penghambatan (daerah

jernih) di sekeliling cakram kertas. Ini menunjukkan organisme itu dihambat pertumbuhannya (sensitif) oleh senyawa antibiotika, desinfektan atau antiseptik yang merembes dari cakram kertas ke dalam agar. Apabila tidak terdapat zona penghambatan artinya bakteri tersebut resisten terhadap antibiotika, desinfektan, atau antiseptik.

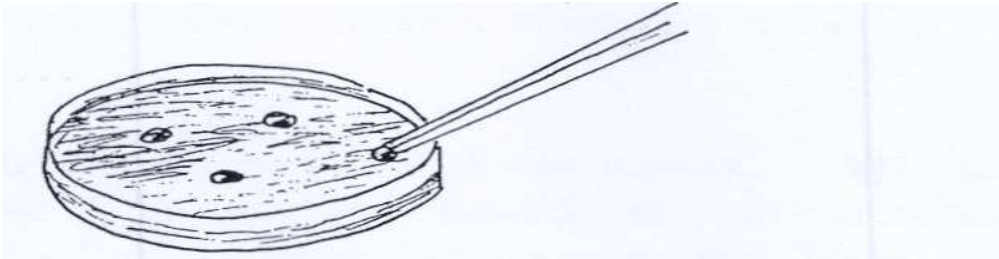
Alat dan Bahan :

- Cawan petri steril
- Cotton buds steril
- Beaker glass
- Gelas ukur 10 ml
- Pinset 5 buah
- Inkubator
- Penggaris
- Agar diri Kaldu Nutrisi Agar (KNA) 3 tabung
- Nutrien broth (NB)
- Aquadest steril
- Desinfektan berbagai merk
- Beberapa macam antibiotika konsentrasi 500 mg/10 ml = 50 mg/ml
- Cakram kertas (disks) atau potongan kertas saring diameter 0,6 cm
- Biakan murni bakteri dalam medium cair (Nutrient broth)

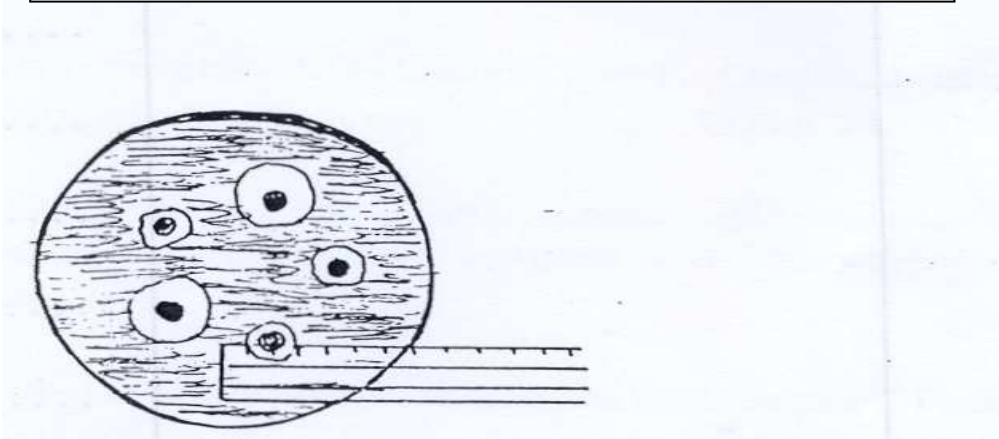
Cara Kerja :

- Siapkan medium cair (NB) untuk pembiakan bakteri uji (misalnya bakteri patogen tertentu yang ada di laboratorium). Inokulasikan sebanyak 1 ose bakteri uji kedalam 100 mL medium cair (NB). Inkubasikan selama 12-24 jam pada shaker inkubator dengan kecepatan 150 rpm. Biakan cair ini di kerjakan sehari sebelum praktikum.
- Cairkan medium agar diri (KNA) dengan memanaskanya pada penangas air.
- Masukkan 1 mL biakan bakteri uji yang telah diaktivasi ke dalam cawan Petri steril.
- Tuangkan agar diri KNA 45⁰C pada cawan petri tersebut dan homogenkan secara merata dengan cara memutar cawan di atas meja searah jarum jam dan sebaliknya sehingga bakteri uji tercampur merata dan biarkan membeku .

- Rendam cakram kertas dalam bahan desinfektanl berbagai merk, biarkan 2 menit.Pabila bahan desinfektan yang digunakan terlalu pekat dapat dicairkan dengan mensuspensikannya dengan akuades.
- Letakkan cakram kertas yang telah direndam dalam desinfektan dalam lempeng agar yang sudah diinokulasi dengan bakteri.
- Beri tanda bagian luar dari dasar cawan petri sesuai dengan merk bahan desinfektan yang digunakan. Jangan lupa tambahkan satu cakram kertas yang direndam dalam akuades steril sebagai kontrol.
- Inkubasikan selama 24 jam suhu 22 – 37 °C.
- Untuk antibiotika dalam kapsul/kaplet larutkan dalam aquades steril, rendam cakram kertas dalam larutan antibiotik selama 2 menit, kemudian letakkan di atas lempeng agar yang telah diinokulasi bakteri. Beri tanda bagian luar dasar cawan petri sesuai dengan macam antibiotik, inkubasikan selama 24 jam, 22 – 37 °C.
- Amati pertumbuhan koloni pada lempeng agar, ukurlah diameter zona penghambatan untuk tiap macam antibiotik dan bahan desinfektan yang digunakan.
- Catat hasil pengamatan pada tabel pengamatan !



.Cakram kertas yang diresapi antibiotik atau desinfektan diletakkan di atas lempeng agar yang telah diinokulasi bakteri.



Setelah diinkubasi, diukur diameter zona penghambatannya.

Tabel Pengamatan

Nama Bakteri Uji :

Senyawa Antimikroba	Diameter Zona Penghambatan	Keterangan
.....		
.....		
.....		
.....		
.....		
.....		

Pertanyaan

1. Apakah efektifitas daya hambat antibiotika, desinfektan atau antiseptik sama untuk setiap species mikroorganisme ?
2. Pada fase pertumbuhan yang mana dari mikroorganisme yang paling sensitif terhadap senyawa antimikroba ?
3. Apakah besarnya daerah hambatan menunjukkan tingkat efektifitas dari senyawa antimikroba ?
4. Faktor-faktor apakah yang mempengaruhi sensitivitas bahan antimikroba yang digunakan ?
5. Bagiamanakah hubungan antara ukuran diameter zona hambat dengan resistensi bakteri terhadap obat antibiotik atau agen kemoterapeutik lain ?