

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.1T Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 1 dari 9
<b>CARA UJI COLIFORM DAN E.COLI PADA AIR DAN AIR LIMBAH</b>		

Disetujui oleh :  Kepala Seksi SS	Diajukan oleh :  Penyelia
--	--

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.1T Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 2 dari 9
<b>CARA UJI COLIFORM DAN E.COLI PADA AIR DAN AIR LIMBAH</b>		

### A. Prinsip

Pertumbuhan bakteri coliform yang ditandai dengan terbentuknya gas dalam tabung Durham, setelah contoh uji diinkubasikan dalam pemberian yang cocok pada suhu  $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  selama 24-48 jam yang selanjutnya dirujuk kepada tabel APM (Angka Paling Mungkin)

### B. Pemberian dan pengencer

1. Buffered Peptone Water (BPW)
2. Lauryl Sulfate Tryptose (LST) broth atau Lactose Broth
3. Brilliant green lactose bile (BLGB) broth 2%
4. E.C. broth
5. Eosine methylene blue (EMB) agar
6. Nutrient Agar
7. Gram stain
8. Tryptone broth
9. Preaksi Kovacs
10. MR – VP medium
11. Simon Citrate Agar atau Koser Citrat
12. Violet Red-Bile Agar (VRBA)
13. Preaksi Voges Proskauer
14. Larutan Methyl Red
15. Koser's Citrate Medium
16. Preaksi Indole
17. Larutan Kalium Hidroksida 40%

### C. Peralatan

1. Pinggan petri gelas (90 mm x 100 mm)
2. Pipet 1 ml, 10 ml berskala
3. Penangas air dengan termostat untuk mengatur suhu agar,  $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
4. Lemari pengering (incubator),  $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$
5. Tabung reaksi (16mm x 150 mm) untuk diisi 10 ml medium.
6. Tabung Durham (10 x 75 mm)
7. Rak untuk tabung reaksi
8. Jarum untuk inokulasi, dengan diameter 3mm (ose)

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.1T Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 3 dari 9
<b>CARA UJI COLIFORM DAN E.COLI PADA AIR DAN AIR LIMBAH</b>		

#### D. Prosedur Pengujian

##### 1. *Persumptive test* untuk Bakteri Coliform (uji dugaan)

- a. Persiapan contoh uji.
  - a. Contoh jenis cairan: Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh dengan cara mengocok botol contoh 25 kali hingga homogeny, lalu cuplikan segera diambil dengan pipet yang sesuai.
  - b. Contoh jenis padatan: ditimbang 25 gram cuplikan kedalam erlenyemer atau wadah lain yang sesuai yang telah berisi 225 ml larutan pengencer hingga diperoleh pengenceran 1:10. Dikocok dengan baik kemudian dilanjutkan dengan pengenceran yang diperlukan.
- b. Kocok tiap botol contoh tanpa pengenceran untuk melarutkan bahan yang mengendap, lalu pipet 10 ml dari setiap contoh untuk dimasukkan kedalam masing –masing 5 tabung yang berisi 10 ml *Lauryl sulphate tryptose (LST) broth* atau *Lactose broth (LB) double strength* yang telah diberi label .
- c. Dengan menggunakan pipet steril yang berbeda, pipet masing-masing 1 ml dan 0,1 ml contoh tanpa pengenceran ke dalam 5 tabung yang kedua dan 5 tabung yang ketiga, yang berisi 10 ml *LST broth* atay *LB broth single strength*.
- d. Simpan semua tabung dalam inkubator pada suhu  $36 \pm 1$  °C selama 24 dan 48 jam.
- e. Setelah 24 jam, catat jumlah tabung yang membentuk gas pada masing-masing pengenceran dan simpan lagi tabung yang tidak membentuk gas dalam inkubator pada suhu  $36 \pm 1$  °C selama 24 jam kembali, kemudian catat tabung yang membentuk gas.
- f. Tabung-tabung yang negatif diinkubasikan lagi selama 24 jam.
- g. Catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun, setelah inkubasi  $48 \pm 2$  jam, karena ini adalah presumptive test yang positif untuk bakteri coliform.
- h. Lakukan uji konfirmasi terhadap semua tabung yang positif untuk presumptive test.

##### 2. Uji konfirmasi (Uji Penegasan) untuk Bakteri Coliform:

- a. Tabung LST/LB yang positip dikocok secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung.
- b. Pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST/LB yang positip ke dalam tabung BGLB yang berlainan.

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5. 4. 1.1T Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 4 dari 9
<b>CARA UJI COLIFORM DAN E.COLI PADA AIR DAN AIR LIMBAH</b>		

- c. Inkubasi tabung-tabung BGLB 2% ini selama 24 jam pada suhu  $36^0 \pm 1^0$  C.
- d. Catat semua tabung BGLB yang positip menghasilkan gas dan dengan menggunakan tabel Angka Paling Mungkin (APM) tentukan APM berdasarkan jumlah tabung BGLB yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama  $48 \pm 2$  jam pada suhu  $36^0 \pm 1^0$  C.
- e. Laporkan sebagai APM bakteri coliform per gram atau per ml. Angka Paling Mungkin dari coliform dilihat Tabel 2 dan 3.

**3. *Confirmed Test untuk Escherichia coli:***

- a. Tabung LST/LB yang positip dikocok secara hati-hati atau dicampur dengan cara memutar-mutar tabung.
- b. Pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST/LB yang positip ke dalam tabung EC broth yang berlainan.
- c. Inkubasi tabung-tabung EC broth tersebut ke dalam penangas air yang bersirkulasi airnya, selama  $48 \pm 2$  jam pada  $36^0 \pm 1^0$  C.
- d. Penangas air yang dipertahankan supaya tetap bersih, tertutup dan dengan tinggi permukaan air di atas permukaan tertinggi media dalam tabung.
- e. Terbentuknya gas dalam jumlah berapapun setelah inkubasi 24 jam atau  $48 \pm 2$  jam dianggap positip.
- f. Tabung-tabung EC yang positip dikocok hati-hati lalu dari setiap tabung digoreskan / ditanamkan pada EMB/VRBA Agar dalam cawan petri.
- g. Inkubasikan selama 18 – 24 jam pada suhu  $36^0 \pm 1^0$  C.
- h. Periksa pinggan-pinggan terhadap adanya koloni yang khas berinti dengan atau tanpa kilat logam.
- i. Dari tiap pinggan EMB/VRBA, ambil dengan jarum, paling sedikit 2 koloni yang mencurigakan yang letaknya terpisah dan pindahkan pada tabung agar miring Nutrient Agar untuk digunakan sebagai inokulum pada uji biokimia.
- j. Tabung-tabung agar miring dengan koloni yang dicurigai ini diinkubasikan selama 18– 24 jam pada suhu  $36^0 \pm 1^0$  C. Pada waktu yang sama buatlah pewarnaan gram dari tiap biakan E. coli. E.coli adalah gram negatif dan berbentuk batang tak berspora. Pembuatan pewarnaan gram sebagai berikut: buat sedian di atas kaca alas. Keringkan di udara dan fiksasikan dengan panas. Warnai sedian dengan larutan crystal violet-amonium oxalat selama 1 menit. Cuci dengan air dan tiriskan. Bubuhkan larutan lugol selama 1 menit.

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.1T Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 5 dari 9
<b>CARA UJI COLIFORM DAN E.COLI PADA AIR DAN AIR LIMBAH</b>		

Cuci dengan air kran dan tiriskan. Cuci (hilangkan warna) dengan alkohol 95% selama 30 detik. Cuci dengan air kran, tiriskan dan bubuhkan larutan safranin selama 10-30 detik. Cuci dengan air kran, tiriskan, serap dengan kertas saring, keringkan dan periksa dibawah mikroskop.

- k. Lakukan pengujian IMVIC atau uji sifat-sifat biokimia reaksi IMVIC (indol, merah metil, *Voges-Proskauer* dan sitrat dari biakan *nutrien agar*)

I. Pengujian IMVIC

- Uji indol
  - Dari biakan murni *nutrien agar* miring, inokulasikan 1 ose biakan ke dalam *tryptone broth*.
  - Inkubasi selama  $24 \pm 2$  jam pada suhu  $35^0 \pm 1^0$  C.
  - Uji adanya indol dengan menambahkan 0,2 – 0,3 ml pereaksi Kovacs/pereaksi indol dan kocok selama 10 menit, warna merah tua pada permukaan menunjukkan reaksi indol positif, warna kuning menunjukkan reaksi indol negatif.
  - Uji ini positip bila lapisan atas berwarna merah.
- Uji Methyl Red
  - Dari biakan murni *nutrien agar* miring, inokulasikan 1 ose biakan ke dalam pembentahan MR – VP dan inkubasikan selama  $48 \pm 2$  jam pada suhu  $35^0 \pm 1^0$  C.
  - Dengan menggunakan pipet, pindahkan 5 ml ke dalam tabung reaksi, tambahkan 5 tetes merah metil dan kocok. Warna kuning menunjukkan reaksi negative dan warna merah menunjukkan reaksi positif.
- Uji VP (*Voges Proskauter*)
  - Dari biakan murni *nutrien agar* miring, inokulasikan 1 ose biakan ke dalam pembentahan MR – VP dan inkubasikan selama  $48 \pm 2$  jam pada suhu  $35^0 \pm 1^0$  C.
  - Dengan menggunakan pipet, pindahkan 1 ml suspense ke dalam tabung, tambahkan 0,6 ml larutan *alfa naftol* dan 0,2 ml larutan kalium hidroksida dan kocok. Diamkan selama 2-4 jam. Warna merah muda hingga merah tua menunjukkan reaksi positif, warna tidak berubah menunjukkan reaksi negatif.
- Uji Sitrat

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.1T Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 6 dari 9
<b>CARA UJI COLIFORM DAN E.COLI PADA AIR DAN AIR LIMBAH</b>		

- Dari baiakan murni nutrient agar miring diinokulasikan 1 ose biakan kedalam perbenihan *Simmons Citrate* atau *Koser's citrate* diinokulasi dengan menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan medium. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat-zat lain.
- Inkubasikan selama 48-96 jam suhu  $35^0 \pm 1^0$  C.
- Adanya warna biru menunjukkan reaksi positif, warna hijau menunjukkan reaksi negatif (pada perbenihan *Simmons Citrate*) dan adanya kekeruhan pada perbenihan *Koser's citrate* menunjukkan reaksi positif.

m. Hasil dinyatakan sebagai berikut:

- Amati terbentuk tidaknya gas dalam tabung durham. Jika terbentuk gas, dengan menunjukkan ke Tabel Angka Paling Mungkin (tabel 2 dan 3), dapat dinyatakan Angka Paling Mungkin (APM) E.coli
- Tegaskan hasil uji pewarnaan gram dan reaksi biokimia. Jika pewarnaan gram menunjukkan adanya bakteri berbentuk batang dan warna merah muda (gram negative) serta reaksi biokimia menunjukkan uji indol dan merah metil positif dan uji VP serta uji sitrat negatif dapat dinyatakan penegasan adanya E.Coli.
- Tentukan APM untuk E coli dengan menggunakan tabel APM (tabel 2 dan 3) berdasarkan jumlah tabung yang telah dipastikan mengandung E coli dengan reaksi-reaksi IMVIC ( + + - - / - + - - ), fermentasi laktosa dan pewarnaan Gram laporkan sebagai APM E. coli per gram atau milliliter.
- Sifat-sifat bakteri coliform dengan uji IMVIC

Tabel 1. Klasifikasi dari tipe tabel biokimia

Type	Indol	Methyl Red	Voges Proskauer	Citrate
<b>Escherichia coli</b>				
Varitas I (Typical E.Coli)	+	+	-	-
Varitas II (Atypical E.Coli)	-	+	-	-
<b>Non Escherichia coli</b>				
Typical Intermediate	+	+	-	+

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.1T Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 7 dari 9
<b>CARA UJI COLIFORM DAN E.COLI PADA AIR DAN AIR LIMBAH</b>		

Atypical Intermediate	-	+	-	+
Typical E. aerogenes	-	-	+	+
Atypical E. aerogenes	+	-	+	+

Tabel 2. Daftar APM menggunakan kombinasi untuk 3 tabung

Tabung yang positif 0,1    0,01    0,001	APM/MPN Gram/ml	Tabung yang positif 0,1    0,01    0,001	MPN Gram/ml
0    0    0	< 3	2    0    0	9,1
0    0    1	3	2    0    1	14
0    0    2	6	2    0    2	20
0    0    3	9	2    0    3	26
0    1    0	3	2    1    0	15
0    1    1	6,1	2    1    1	20
0    1    2	9,2	2    1    2	27
0    1    3	12	2    1    3	34
0    2    0	6,2	2    2    0	21
0    2    1	9,3	2    2    1	28
0    2    2	12	2    2    2	35
0    3    0	9,4	2    3    0	29
0    2    3	16	2    2    3	42
0    3    1	13	2    3    1	36
0    3    2	16	2    3    2	44
0    3    3	19	2    3    3	53
1    0    0	3,6	3    0    0	23
1    0    1	7,2	3    0    1	39
1    0    2	11	3    0    2	64
1    0    3	15	3    0    3	95
1    1    0	7,3	3    1    0	43
1    1    1	11	3    1    1	75
1    1    2	15	3    1    2	120
1    1    3	19	3    1    3	160
1    2    0	11	3    2    0	93
1    2    1	15	3    2    1	150

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.1T Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 8 dari 9
<b>CARA UJI COLIFORM DAN E.COLI PADA AIR DAN AIR LIMBAH</b>		

1	2	2	20	3	2	2	210
1	2	3	24	3	2	3	290
1	3	0	16	3	3	0	240
1	3	1	20	3	3	1	460
1	3	2	24	3	3	2	1100
1	3	3	29	3	3	3	>2400

Tabel 3. Daftar APM menggunakan kombinasi untuk 5 tabung

Kombinasi Jumlah tabung yang positif	APM/ 100 ml	Kombinasi Jumlah tabung yang positif	APM/100 ml
0-0-0	< 2	4-2-0	22
0-0-1	2	4-2-1	26
0-1-0	2	4-3-0	27
0-2-0	4	4-3-1	33
		4-4-0	34
1-0-0	2	5-0-0	23
1-0-1	4	5-0-1	30
1-1-0	4	5-0-2	40
1-1-1	6	5-1-0	30
1-2-0	6	5-1-1	50
		5-1-2	60
2-0-0	4	5-2-0	50
2-0-1	7	5-2-1	70
2-1-0	7	5-2-2	90
2-1-1	9	5-3-0	80
2-2-0	9	5-3-1	110
2-3-0	12	5-3-2	140
3-0-0	8	5-3-3	170
3-0-1	11	5-4-0	130
3-1-0	11	5-4-1	170
3-1-1	14	5-4-2	220
3-2-0	14	5-4-3	280
3-2-1	17	5-5-4	350
4-0-0	13	5-5-0	240
4-0-1	17	5-5-1	300
4-1-0	17	5-5-2	500
4-1-1	21	5-5-3	900
4-1-2	26	5-5-4	1600
		5-5-5	>1600

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.1T Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 9 dari 9
<b>CARA UJI COLIFORM DAN E.COLI PADA AIR DAN AIR LIMBAH</b>		

**E. Dokumen Acuan**

SNI 01-2897-1992 Cara Uji Cemaran Mikroba

**F. Dokumen Terkait**

F-LAB-5.4.1.0.2 Rekaman Mutu Hasil Pengujian