

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.5K Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 1 dari 14
<b>CARA UJI SALMONELLA SP. PADA BISKUIT</b>		

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

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.5K Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 2 dari 14
<b>CARA UJI SALMONELLA SP. PADA BISKUIT</b>		

#### A. Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media yang selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *salmonella sp*, pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan konfirmasi melalui uji biokimia dan uji serologi untuk menyakinkan dan atau tidaknya bakteri *salmonella sp*.

#### B. Peralatan

1. Inkubator terkalibrasi ( $35\pm2$ ) $^{\circ}\text{C}$
2. Inkubator *refrigerated* atau laboratory *refrigerator* terkalibrasi ( $4\pm2$ ) $^{\circ}\text{C}$
3. Otoklaf terkalibrasi
4. Oven terkalibrasi
5. Penangas air ( $49\pm1$ ) $^{\circ}\text{C}$
6. Penangas air, bersirkulasi, *thermostat* ( $43\pm0,2$ ) $^{\circ}\text{C}$
7. Penangas air, bersirkulasi, *thermostatically-controlled* ( $42\pm0,2$ ) $^{\circ}\text{C}$
8. Neraca, kapasitas 2000 g terkalibrasi, dengan ketelitian 0,1 g
9. Neraca, kapasitas 120 g terkalibrasi, dengan ketelitian 5 mg
10. Blender dengan kecepatan putar 10000-12000 rpm dan blender jar (botol) steril
11. Botol bertutup ulir bermulut lebar 16 oz (500 ml) steril, erlenmeyer 500 ml steril, beaker 500 ml steril, *sterile glass* atau *paper funnel* dengan ukuran sesuai dan pilihan lain, kontainer dengan kapasitas sesuai untuk mengakomodasi contoh komposit.
12. Bent glass atau batang penyebar plastik steril
13. Sendok steril, atau peralatan lain untuk memindahkan contoh makanan
14. Cawan petri steril, 15X100 mm, kaca atau plastik
15. Pipet steril, 1 ml dengan ketelitian 0,01 ml, dan pipet steril 10 dan 5 ml terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 ml
16. Jarum ose (diameter  $\pm 3$  mm), *nichrome*, *platinum-iridium chrowel wire* atau plastik steril,
17. Tabung reaksi atau tabung kultur steril, 10 X 150 mm dan 20 X 150 mm, tabung serologikal, 10 X 75 mm atau 13 X 100 mm
18. Botol pengencer 1000 ml
19. Rak tabung reaksi atau rak tabung kultur
20. Vortex mixer

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.5K Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 3 dari 14
<b>CARA UJI SALMONELLA SP. PADA BISKUIT</b>		

- 21. Lampu (untuk mengamati reaksi serologi)
- 22. *Bunsen burner*
- 23. Kertas pH (kisaran pH 6-8) dengan ketelitian maksimal 0,4 unit pH per perubahan warna
- 24. pH meter
- 25. kantong plastik steril 28-37 cm dapat diikat
- 26. *Beaker* plastik, 4 liter, dapat diotoklaf, untuk menyangga kantong plastik selama pengocokan dan inkubasi
- 27. gunting, gunting besar, pisau bedah, dan *forceps* steril.

### C. Perbenihan dan pereaksi

- 1. universal preenrichment broth
- 2. *tertathionate (TT) broth*
- 3. *Rappaport-Vassiliadis (RV) medium* (RV medium harus dibuat dari bahan-bahan yang terdapat dalam komposisi RV medium tersebut. Formulasi yang tersedia secara komersial tidak dapat diterima)
- 4. *Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar*
- 5. *Hektoen enteric (HE) agar*
- 6. *Bismuth sulfite (BS) agar*
- 7. *Triple sugar iron (TSI) agar*
- 8. *Tryptone (tryptophane) broth*
- 9. *Trypticase soy broth* dengan ferrous sulfate
- 10. *Trypticase soy-tryptose broth*
- 11. *Methyl red-voges Proskeaur (MR-VP) broth*
- 12. *Simmons citrate agar*
- 13. *Urea broth*
- 14. *Urea broth (rapid)*
- 15. *Malonate broth*
- 16. *Lysine iron agar (LIA) (Edward dan Fife)*
- 17. *Lysine decarboxylase broth*
- 18. Medium uji motilitas (semi padat)
- 19. *Kalium sianida (KCN) broth*
- 20. *Phenol red carbohydrate broth*

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.5K Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 4 dari 14
<b>CARA UJI SALMONELLA SP. PADA BISKUIT</b>		

21. *Purple carbohydrate broth*
22. *MacConkey agar*
23. *Nutrient broth*
24. *Brain heart infusion (BHI) broth*
25. Larutan papain, 5%
26. Larutan selulosa, 1%
27. *Tryptose blood agar base*
28. Bubuk kalium sulfit, anhidrat
29. Larutan chlorine, 200 ppm, mengandung 0,1% natrium dodecyl sulfate
30. Etanol 70%
31. Pereaksi Kovacs'
32. Pereaksi uji Voges-Proskauer (VP)
33. Kristal creatine phosphate
34. Larutan kalium hidroksida, 40%
35. Larutan natrium hidroksida 1 N
36. Asam hidroklorat 1 N
37. Larutan *brilliant green dye* 1%
38. Larutan *bromcresol purple dye* 0,2%
39. Indikator merah metil
40. Air suling steril
41. Larutan *physiological saline* 0,85% steril
42. Larutan *formalinized physiological saline*
43. *Salmonella polyvalent somatic (O) antiserum*
44. *Salmonella polyvalent flagellar (H) antiserum*
45. *Salmonella somatic group (O) antisera*: A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>, E<sub>4</sub>, F, G, H, I, Vi,  
atau kelompok lain yang sesuai
46. *Salmonella Spicer-Edwards flagellar (H) antisera*.

#### D. Cara Kerja

##### 1. Homogenesi contoh dan pra-pengkayaan

- Pipet 100 ml contoh kedalam blender yang steril dan tambahkan 900 ml universal/preenrichment broth steril. Kocok selama 2 menit.

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.5K Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 5 dari 14
<b>CARA UJI SALMONELLA SP. PADA BISKUIT</b>		

- Pindahkan secara aseptic kedalam botol pengencer 1000 ml dan biarkan pada suhu ruang selama ( $60\pm 5$ ) menit dalam wadah tertutup, kemudian kocok perlahan.
- Tambahkan 0,45 ml larutan brilliant green dye 1 %, kocok hingga tercampur merata. dan
- Kendurkan tutup wadah secukupnya/  $\frac{1}{4}$  putaran. Inkubasikan selama ( $24\pm 2$ ) jam pada  $35^{\circ}\text{C}$ .

## 2. Pengkayaan (enrichment)

- Kencangkan tutup wadah dan kocok secara perlahan contoh yang telah selsai diinkubasi
- Pipet 0,1 ml biakan pra-pengkayaan kedalam 10 ml media Rappaport-Vassiliadis (RV) dan 1 ml biakan pra-pengkayaan lainnya kedalam 10 ml tetrathionate (TT) broth dan votex masing-masing campuran tersebut, dan.
- Inkubasikan media RV pada suhu ( $42\pm 0,2$ ) $^{\circ}\text{C}$  selama ( $24\pm 2$ ) jam dan TT broth pada ( $35\pm 2,0$ ) $^{\circ}\text{C}$  selama ( $24\pm 2$ ) jam dalam penangas air bersirkulasi

## 3. Penanaman pada pemberian pilih/selektif

- Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum Ose, goreskan sepanjang 3 mm biakan pengkayaan TT broth kedalam cawan petri yang berisi media XLD, HE, dan BS agar. Siapkan BS agar sehari sebelum digunakan dan dimpan di tempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores,
- Ulangi cara diatas dari media pengkayaan RV
- Inkubasikan cawan-cawan BS, HE, dan XLD selama ( $24\pm 2$ ) jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ .
- Amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella* sp.

Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut :

Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* sp. Dari masing-masing media agar selektif setelah ( $24\pm 2$ ) jam inkubasi. Koloni-koloni *Salmonella* sp adalah sebagai berikut :

XLD : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* sp membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.

HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* sp. Membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.

<b>LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG</b>	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.5K Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 6 dari 14
<b>CARA UJI SALMONELLA SP. PADA BISKUIT</b>		

BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam.

Jika masa inkubasi bertambah maka warna media disekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.

- Jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BS setelah inkubasi ( $24\pm 2$ ) jam, jangan mengambil koloni tiap inkubasi kembali media selama ( $24\pm 2$ ) jam. Jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BS setelah inkubasi ( $48\pm 2$ ) jam, ambil 2 atau lebih koloni yang tidak khas..
- Jangan menggunakan jarum inoculasi steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inoculasikan kedalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, gunakan jarum yang sama untuk menginoculasikan media LIA miring harus mempunyai tusukan yang dalam (4cm). Simpan media agar selektif yang telah diambil koloni pada suhu ( $5-8$ )°C.
- Inkubasi TSI dan LIA pada suhu 35°C selama ( $24\pm 2$ ) jam dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya H<sub>2</sub>S yang berlebihan. Pada TSI, kultur Salmonella sp. Yang khas memberikan reaksi alkalin (merah) pada bagian miring dan asam (kuning) pada tusukan, dengan atau tanpa H<sub>2</sub>S (warna kehitaman pada agar). Pada LIA kultur Salmonella sp yang khas memberikan reaksi alkalin (ungu) pada keseluruhan tabung. Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai kultur negatif. Jangan hanya melihat perubahan warna pada tusukan untuk menyatakan kultur negatif. Umumnya kultur salmonella sp. Membentuk H<sub>2</sub>S pada agar miring LIA. beberapa kultur non Salmonella sp. Membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA.
- Semua biakan yang memberikan reaksi alkalin pada bagian tusukan didalam media LIA tanpa memberikan reaksi TSI akan potensial sebagai Salmonella sp. dan dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan dimedia LIA dapat dinyatakan sebagai bukan Salmonella sp. bila kultur TSI tidak menunjukkan reaksi khas Salmonella sp. (alkali pada goresan dan asam pada tusukan), ulangi lagi pengujian dengan mengambil koloni yang mencurigakan dari medium selektif yang tidak memberikan kultur dugas positif dan inokulasi dengan menggores media TSI dan LIA seperti cara mulai pasal di atas.
- Lakukan uji identifikasi biokimia dan serologi terhadap:

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.5K Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 7 dari 14
<b>CARA UJI SALMONELLA SP. PADA BISKUIT</b>		

- a. Kultur jaring presumtif TSI dari 1 set media selektif (HE, XLD, dan BS) yang diinokulasi dari TTB, dan tiga kultur presumtif yang diinokulasikan dari RV.
- b. Jika tiga kultur presumtif positif TSI tidak terisolasi dari 1 set media selektif, uji presumtif positif TSI dari media agar yang lain. Uji sedikitnya 6 kultur TSI untuk setiap 100 ml contoh minuman.

**E. Identifikasi *Salmonella* sp.**

**1. Kultur campuran**

- a. Apabila kultur TSI agar terlihat tercampur, maka goreskan kembali kedalam media *MacConkey agar*, HE agar atau XLD *broth*. Inkubasi selama (24±2) jam pada suhu 35°C. Amati koloni yang disuga *Salmonella* sp. :
  - *Mac Conkey agar*. Koloni yang khas tampak transparan dan tidak berwarna, kadang-kadang dengan inti hitam. Koloni-koloni *Salmonella* sp. akan membentuk area yang terang dari pengendapan bile disebabkan oleh bakteri lain yang muncul atau tumbuh.
  - *Hektoen enteric* (HE) agar. Koloni-koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam,
  - *Xylose lysine desoxycholate* ( XLD) agar. Koloni merah muda dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.
- b. Pindahkan sedikitnya 2 koloni terduga *Salmonella* sp. pada media TSI dan LIA seperti pada pasal 8.5.4.3.f dan lanjutkan seperti pada pasal 8.5.4.3.g

**2. Kultur Murni**

- a. Uji urease (konvensional). dan

Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* sp. dengan jarum inokulasi kedalam *urea broth*. Inokulasikan selama (24±2) jam pada suhu 35°C dan

- b. Uji urease (cepat).

Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* sp. dengan jarum inokulase kedalam *rapid urea brot*. Inokulasikan 2 jam dalam penangas air pada suhu

(37±0,5)°C. Reaksi *Salmonella* sp. yang untuk uji urease memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna).

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.5K Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 8 dari 14
<b>CARA UJI SALMONELLA SP. PADA BISKUIT</b>		

### 3. Pengujian kultur urase negative

a) Lysine decarboxylase ( LD ) broth.

Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan. Ambil 1 ose dari TSI dan inokulasikan kedalam media LDB. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama ( 48 ± 2 ) jam pada suhu 35°C, tetapi amati setelah 24 jam. *Salmonella* sp. Memberikan reaksi alkalin ditandai dengan warna ungu pada seluruh media. Reaksi negative ditunjukkan dengan warna kuning pada seluruh media. Jika hasil reaksi tidak menunjukkan warna kuning atau ungu tambahkan beberapa tetes 0,2% bromocresol purple dye dan amati perubahan warnanya.

b) Phenol red dulcitol atau purple brothbase dengan 0,5% dulcitol dan inokulasi media dulcitol broth dari biakan TSI. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama ( 48 ± 2 ) jam pada suhu 35°C, tetapi amati setelah 24 jam. Pada umumnya *salmonella* sp. Memberikan hasil positif yang ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung durham dan pH asam ( kuning ) pada media. Reaksi negative ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham dan warna merah ( phenol red sebagai indicator) atau ungu ( bromocresol purple sebagai indicator ) pada seluruh media.

c) Tryptone ( tryptophane ) broth ( TB )

Inokulasi media tryptone broth dari biakan TSI. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 35°C dan selanjutnya ikuti prosedur dibawah ini :

- Potassium cyanide ( KCN ) broth

Pindahkan 1 sengkelit biakan dari TB 24 jam kedalam media KCN broth. Tutup tabung rapat – rapat dan lapisi dengan kertas parafilm. Inkubasikan selama ( 48 ± 2 ) jam pada suhu 35°C, tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan ( ditandai dengan adanya kekeruhan ). Umumnya *salmonella* sp. Tidak tumbuh pada media ini dengan ditandai dengan tidak terjadinya kekeruhan.

- Malonate broth

Pindahkan satu sengkelit dari biakan TB kedalam media malonate broth. Inkubasikan selama ( 48 ± 2 ) jam pada suhu 35°C, tetapi amati setelah 24 jam. Kadang – kadang tabung malonate broth yang tidak diinokulasi berubah menjadi biru. Oleh karena itu gunakan malonate broth sebagai control. Reaksi positif

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.5K Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 9 dari 14
<b>CARA UJI SALMONELLA SP. PADA BISKUIT</b>		

ditandai dengan perubahan warna menjadi biru. Umumnya salmonella sp. Memberikan reaksi negative ( hijau atau tidak ada perubahan warna ) pada broth ini.

- Uji indol

Dari media TB yang tersisa pindahkan 5 mL kultur kedalam tabung reaksi steril, tambahkan 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL pereaksi Kovacs. Amati segera setelah penambahan pereaksi. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya salmonella sp. Memberikan reaksi negative ( tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media ). Reaksi yang warnanya berada antara jingga dan merah muda dinyatakan sebagai positif.

Nyatakan kultur sebagai bukan salmonella sp. Bila reaksi indol positif dan flagellar ( H ) negative, atau KCN positif dan LDB negative.

#### 4. Uji Serologi polyvalent Flagellar (H)

- a) Inokulasi dari masing-masing TSI yang memberikan reaksi urease negatif ke dalam :
  - BHI broth , dan inkubasi selama 4 jam sampai dengan 6 jam pada suhu 35°C sampai terlihat pertumbuhan ( untuk di uji pada hari yang sama ) , atau
  - Trypticase soy trypticase (TST) broth dan inkubasi selama (24 ±2 ) jam pada suhu 35°C ( untuk di uji hari berikutnya ) . tambahkan 2,5 mL larutan formanilized physiological saline ke dalam 5 mL kultur di atas.
- b) Siapkan 2 kultur dari TSI ( contoh dan kontrol ) yang telah diberi formanilized physiological saline dan uji dengan salmonella polyvalent flagellar (H) antisera. Masukkan ±0,5 mL larutan salmonella polyvalent flagellar (H) antisera dalam tabung serologi 10mmx75mm atau 13 mmx 100 mm . Tambahkan 0,5 mL antigen yang akan di uji. Siapkan control saline dengan mencampur 0,5 mL formanilized physiological saline dengan 0,5 mL antigen. Inkubasikan campuran tersebut dalam penangas air pada suhu 48°C sampai dengan 50°C. Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya dalam 1 jam .
  - Positif apabila terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam control

<b>LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG</b>	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.5K Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 10 dari 14
<b>CARA UJI SALMONELLA SP. PADA BISKUIT</b>		

- Negatif apabila tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan dalam control , dan
- Non spesifik terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan control.

#### **5. Uji serologi polyvalent somatic (o)**

- a) Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi panjang berukuran 1 cm x 2 cm diatas kaca atau cawan petri plastik berukuran 15mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan.
- b) Emulsikan biakan dari TSI miring umur 24 jam sampai dengan 48 jam dengan 2 mL 0,8 % saline menggunakan jarum ose ( dapat juga menggunakan biakan dari tryptose blood agar base tanpa darah )
- c)Tambahkan 1 tetes suspensi biakan diatas masing- masing bagian empat persegi panjang yang telah di beri tanda dengan pensil
- d) Tambahkan 1 tetes larutan saline pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes polyvalent somtic (o) antiserum ke dalam bagian yang lain
- e) Campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum ose yang bersih dan steril selam 1 menit , dan
- f) Klasifikasi uji polyvalent somatic (o) mnunjukan hasil sebagai berikut:
  - Positif : terjadi penggumpalan di dalam encampuran uji , pada control saline tidak terjadi penggumpalan
  - Negatif: tidak terjadi penggumpalan di dalam pencampuran uji , dan control saline
  - Non spesifik : terjadi penggumpalan di dalam pencampuran uji dan pada control saline.

#### **6. Uji Biokimia Tambahan**

Nyatakan sebagai salmonella sp kultur yang memberikan reaksi yang khas seperti pada tabel 6. Jika 1 kultur TSI dari setiap 100 mL contoh menunjukan salmonella sp uji biokimia tambahan tidak diperlukan. Kultur yang memberikan reaksi positif pada uji serologi flagellar (H) tapi tidak menunjukan karakteristik salmonella sp pada uji biokimia , harus di murnikan dan di uji kembali.

**Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap kultur yang tidak memberikan reaksi yang khas seperti tabel A.3 :**

<b>LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG</b>	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.5K Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 11 dari 14
<b>CARA UJI SALMONELLA SP. PADA BISKUIT</b>		

- a. Phenol red lactose atau purple lactose broth
- Inokulasi broth ini dengan kultur TSI agar miring yang telah di inkubasi selama 24 jam sampai 48 jam . Inkubasi selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ , tetapi amati setelah 24 jam
  - Nyatakan positif apabila terjadi pembentukan asam ( kuning) dan gas pada tabung durham. Apabila hanya terjadi pembentukan asam , maka dapat di nyatakan positif. Umumnya salmonella sp. Memberikan hasil negative, di tunjukan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham dan warna merah ( phenol red sebagai indicator) atau ungu ( bromocesrol purple sebagai indicator ) pada seluruh media
  - Jika kultur memberikan reaksi lactose positif, maka nyatakan sebagai bukan salmonella sp, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif pada LIA atau reaksi positif pada malonate broth.

b. Phenol red sucrose atau purple sucrose broth

Ikuti prosedur seperti pada pasal 6 . Nyatakan sebagai bukan salmonella sp pada kultur yang memberikan reaksi positif uji sukrosa, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif ( alkalin) pada LIA

c. Merah metil-Voges-proskauer (MR-VP) broth

Inokulasi medium dengan sedikit biakan TSI agar miring dan inkubasikan selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ .

Lakukan uji Voges – Proskauer (VP) pada suhu ruang sebagai berikut :

- Pindahkan 1 mL MR –VP broth yang telah di inkubasi selama  $(48 \pm 2)$  jam ke dalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali MR-VP broth selama  $(48 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$
- Tambahkan 0,6 mL alpha naphtol dan aduk
- Tambahkan 0,2 mL larutan KOH 40% dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit Kristal keratin dan amati hasilnya setelah 4 jam , dan
- Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima pada media menunjukan reaksi poitif . Umumnya salmonella sp memberikan reaksi VP negative.

Uji merah metal (MR) :

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.5K Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 12 dari 14
<b>CARA UJI SALMONELLA SP. PADA BISKUIT</b>		

- Tamabahkan 5 tetes sampai dengan 6 tetes indicator merah metal ke dalam 5 mL media MR-VP yang telah di inkubasi selama 96 jam
- Amati hasilnya dengan segera , dan
- Umumnya salmonella sp memberikan reaksi positif, di tandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya warna kuning menunjukan reaksi negatif. Nyatakan sebagai bukan salmonella sp kultur yang memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif.

d. Simmons citrate agar

- Inokulasi medium dengan menggunakan jarum yang mengandung biakan dari TSI agar miring, dengan cara menggoreng agar miring dan menusuk bagian tegak. Inkubasikan selama ( $96 \pm 2$  ) jam pada suhu 35°C
- Nyatakan positif apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya di ikuti dengan perubahan warna hijau menjadi biru. Umumnya salmonella sp memberikan hasil sitrat positif.
- Negatif apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.

## 7. Pernyataan hasil

Laporkan sebagai salmonella sp kultur- kultur yang mempunyai reaksi seperti pada tabel A.3 Laporkan sebagai bukan salmonella sp kultur- kultur yang memberikan reaksi seperti pada Tabel A.4 . Bila tidak ada 1 kultur TSI yang menunjukan reaksi salmonella sp pada uji biokimia, lakukan uji biokomia mulai dari pasal 8.5.5.3 terhadap kultur yang memberikan reaksi urease dari contoh yang sama.

**Tabel A.3 – reaksi biokimia dan serologi untuk salmonella sp**

No.	Substrat Uji	Hasil Reaksi		Salmonella sp Reaksi Species
		Positif	Negatif	
1.	Glukosa (TSI)	Tusukan kuning	Tusukan merah	+
2.	Lysine decarboxylase (LIA)	Tusukan ungu	Tusukan kuning	+
3.	H <sub>2</sub> S (TSI dan LIA)	Hitam	Tidak hitam	+
4.	Urease	Warna ungu	Tidak ada	-

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.5K Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 13 dari 14
<b>CARA UJI SALMONELLA SP. PADA BISKUIT</b>		

No.	Substrat Uji	Hasil Reaksi		Salmonella sp Reaksi Species
		Positif	Negatif	
		sampai merah	perubahan warna	
5.	Lysine decarboxy broth	Warna ungu	Warna kuning	+
6.	Phenol red dulcitol broth	Warna kuning dan/ atau gas	Tanpa/ tidak terbentuk gas, tidak berubah warna	+ <sup>b</sup>
7.	KCN Broth	Pertumbuhan	Tidak ada pertumbuhan	-
8.	Malonate broth	Warna biru	Tidak berubah warna	- <sup>c</sup>
9.	Uji indol	Permukaan warna nila	Permukaan berwarna kuning	-
No.	Substrat uji	Hasil Reaksi		Salmonella sp Reaksi Species
		Positif	Negative	
10.	Uji polyvalent flagellar	Penggumpalan	Tidak penggumpalan	+
11.	Uji polyvalent somatic	penggumpalan	Tidak penggumpalan	+
12.	Phenol red lactose broth	Warna kuning, dan / atau gas	Tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	- <sup>c</sup>
13.	Phenol red sucrose broth	Warna kuning, dan / atau gas	Tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	-
14.	Uji voges- proskauer	Merah muda sampai merah	Tidak berubah warna	-
15.	Uji merah metal	Merah menyebar	Kuning menyebar	+
16.	Simmons citrate	Pertumbuhan, warna biru	Tidak ada pertumbuhan dan perubahan warna	V
Keterangan : <sup>a</sup> + adalah 90 % atau lebih positif dalam satu atau dua hari - Adalah 90% atau lebih negative dalam satu atau dua hari V adalah variable <sup>b</sup> adalah mayoritas dari kultur salmonella sp arizone: negatif <sup>a</sup> adalah mayoritas dari kultur salmonella sp arizone: positif				

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.5K Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 14 dari 14
<b>CARA UJI SALMONELLA SP. PADA BISKUIT</b>		

**Tabel A.5 – reaksi biokimia dan serologi untuk non salmonella sp**

No.	Substrat Uji	Hasil
1.	Urease	Positif ( warna ungu- merah)
2.	Uji indole dan polyvalent flagellar (H) atau uji indole dan uji spicer- edwards flagellar	Positif( permukaan warna nila ) Positif ( tidak ada penggumpalan) Positif ( permukaan warna nila) Positif ( tidak ada penggumpalan )
3.	Lysine decarboxylase dan KCN broth	Positif ( ada pertumbuhan ) Negative ( warna kuning)
4.	Phenol red lactose broth	Positif ( warna kuning, dan / atau gas ) <sup>a,b</sup>
5.	Phenol red sucrose broth	Positif ( warna kuning, dan / atau gas ) <sup>b</sup>
1.	KCN broth , Uji voges – proskuer, dan Merah metal	Positif ( ada pertumbuhan ) Positif ( warna merah muda sampai merah ) Negatif ( warna kuning menyebar)
Keterangan :		
<sup>a</sup> adalah uji malonate broth lebih lanjut pada biakan yang positif untuk menentukan salmonella arizone		
<sup>b</sup> adalah jangan di buang biakan positif jika biakan LIA menunjukkan reaksi bercirikan salmonella sp, uji lebih lanjut untuk mengamati apakah spesies tersebut salmonella sp.		

#### F. Dokumen Acuan

SNI 2973: 2011

#### G. Dokumen Terkait

F-LAB-5.4.1.0.2 Rekaman Mutu Hasil Pengujian.