

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.4N Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 1 dari 8
<b>UJI KADAR ANGKA LEMPENG TOTAL (ALT) DALAM AIR DEMINERAL</b>		

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

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.4N Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 2 dari 8
<b>UJI KADAR ANGKA LEMPENG TOTAL (ALT) DALAM AIR DEMINERAL</b>		

#### **A. Prinsip**

Menginokulasikan contoh atau hasil pengenceran contoh dengan volume terukur pada cawan Petri dan mencampurkannya dengan media tertentu. Menginkubasi satu set cawan pada suhu  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  selama  $44\text{ jam} \pm 4\text{ jam}$ , dan set lainnya pada  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  selama  $68\text{ jam} \pm 4\text{ jam}$ . Menghitung jumlah koloni per mililiter (mL) contoh dari jumlah koloni yang terbentuk pada media.

#### **B. Peralatan**

1. Alat untuk sterilisasi dengan uap air (autoklaf)
2. Inkubator yang dapat mempertahankan suhu  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
3. Inkubator yang dapat mempertahankan suhu  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$
4. Cawan Petri dari gelas atau plastik dengan diameter 90 mm atau 100 mm
5. Penangas air atau alat serupa yang dapat mempertahankan suhu  $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
6. Alat penghitung koloni dengan metode iluminasi terhadap dasar gelap.

#### **E. Media pembiakan dan pengencer**

##### **1. Bahan dasar**

Untuk persiapan media, gunakan bahan-bahan dengan kualitas seragam dan bahan kimia dengan kualitas analitik; sebagai alternatif gunakan media lengkap dehidrat yang setara dan ikuti instruksi dari pabrikan. Untuk pembuatan media, gunakan air suling atau air terdeionisasi sesuai ISO 3696 *grade 3* dan bebas dari bahan-bahan yang mungkin menghambat pertumbuhan pada kondisi pengujian.

#### **Persyaratan air *grade 3***

##### **Parameter Spesifikasi *grade 3***

- Nilai pH pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$  (*inclusive range*) 5.0 – 7.5
- Konduktivitas listrik maksimum (mS/m pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$ ) 0.5
- Kandungan maksimum unsur oksigen *oxydizable* (mg/L) 0.4
- Absorbansi maksimum pada panjang gelombang 254 nm dan panjang jarang optik 1 cm (unit absorbansi)
- Tidak spesifik
- Residu maksimum setelah penguapan pada pemanasan  $110^{\circ}\text{C}$  (mg/kg) 2

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.4N Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 3 dari 8
<b>UJI KADAR ANGKA LEMPENG TOTAL (ALT) DALAM AIR DEMINERAL</b>		

- Kandungan Silika (SiO<sub>2</sub>) maksimum (mg/L) Tidak spesifik

### 2. Pengencer

- Kasein yang dihidrolisa secara enzimatis (pepton) 1,0 g
- Air (*Grade 3*) 1000 mL

Larutkan bahan-bahan dalam air, panaskan jika diperlukan. Sesuaikan pH dengan menambahkan larutan sodium hidroksida [c(NaOH) = 1 mol/L] atau asam klorida [c(HCl) = 1 mol/L] sehingga setelah sterilisasi dalam autoklaf pada (121 ± 3) °C selama (15 ± 1) menit pH akan menjadi 7,0 ± 0,5 pada 25 °C.

### 3. Yeast extract agar

- Tripton (Pepton dari Kasein, pankreatik) 6,0 g
- *Yeast extract* dehidrat 3,0 g
- Agar, bubuk atau serpihan 10 g sampai 20 g (tergantung kekuatan gel)
- Air 1 000 mL

Tambahkan bahan-bahan, atau media lengkap dehidrat, ke dalam air dan larutkan dengan pemanasan. Sesuaikan pH apabila diperlukan sehingga setelah sterilisasi menjadi 7,2 ± 0,2 pada 25 °C Tuang sebanyak 15 mL sampai 20 mL ke tabung, botol atau wadah lainnya. Untuk penyimpanan dalam wadah yang lebih besar, gunakan wadah dengan kapasitas sampai 500 mL. Sterilisasi dalam autoklaf pada (121 ± 3) °C selama (15 ± 1) menit. Untuk penggunaan, cairkan media pembiakan, biarkan dingin dan jaga suhunya pada (45 ± 1) °C menggunakan penangas air (3.28.1.3.5). Dianjurkan untuk menyimpan media pembiakan ini tidak lebih dari 4 jam pada 45 °C, apabila melebihi maka harus dibuang.

## D. Prosedur

### 1. Persiapan dan Inokulasi

- Gunakan metode cawan tuang (3.28.1.6.1.1).
- Tempatkan sejumlah contoh uji (atau hasil pengencerannya) tidak melebihi 2 mL di cawan Petri,
- Tambahkan 15 mL sampai dengan 20 mL media cair steril (3.28.1.5.3) dan campur hati-hati dengan memutar pelan-pelan, biarkan media untuk membeku. Waktu antara penambahan bahan yang diuji (atau pengencerannya) dan penambahan media cair tidak

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.4N Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 4 dari 8
<b>UJI KADAR ANGKA LEMPENG TOTAL (ALT) DALAM AIR DEMINERAL</b>		

boleh melebihi 15 menit. Inokulasi paling tidak satu cawan untuk inkubasi di masing-masing suhu

## 2. Teknik cawan tuang

### Persiapan contoh

- Sebelum pengujian, campur contoh dengan baik dengan pengocokan yang kuat untuk memperoleh distribusi mikroorganisme yang merata. Tergantung pada contoh air dan kandungan mikroorganisme yang diperkirakan, buat pengenceran yang diperlukan.
- Pada metode hitungan cawan umumnya digunakan pengenceran secara desimal. Untuk pengenceran desimal (satu per sepuluh kali), ukur 90 mL atau 9 mL pengencer dan masukkan pada botol atau tabung pengencer steril. Sebagai alternatif, dapat digunakan pengencer dengan volume tersebut yang telah disterilisasi terlebih dahulu pada botol bertutup ulir. Satu atau lebih pengenceran desimal dilakukan dengan cara memindahkan satu volume contoh air ke dalam sembilan volume pengencer.
- Campur larutan sepenuhnya (dengan pipet baru atau secara mekanis) dan pindahkan satu volume dari pengenceran ini pada sembilan volume pengenceran berikutnya. Siapkan volume yang cukup untuk setiap pengenceran sesuai dengan yang diperlukan untuk semua pengujian terhadap contoh..Beberapa pendekatan dapat dilakukan, misalnya seri pengenceran 3 atau 4 kali atau seri pengenceran desimal dimana dilakukan penyaringan dengan volume 10 mL dan 30 mL. Pengenceran empat kali dapat dilakukan sebagaimana yang dilakukan untuk pengenceran desimal, tetapi dalam hal ini satu volume contoh air dicampur dengan tiga volume pengencer. Jika konsentrasi target mikroorganisme diperkirakan tinggi, tahap pengenceran seratus kali (satu per seratus) dapat digunakan.

### Porsi uji

Volume porsi uji (bagian yang diuji) dari contoh atau hasil pengenceran contoh, dapat bervariasi antara 0,1 mL dan 2 mL, tergantung pada ukuran cawan Petri dan volume media pembiakan yang digunakan. Pengenceran harus dipilih sedemikian rupa sehingga jumlah koloni yang terbentuk di cawan dengan diameter 90 mm sampai 100 mm diharapkan antara 10 dan 300 (lihat ISO 7218). Walaupun demikian, perlu dicatat bahwa jumlah total koloni

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.4N Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 5 dari 8
<b>UJI KADAR ANGKA LEMPENG TOTAL (ALT) DALAM AIR DEMINERAL</b>		

yang dapat dihitung tergantung pada ukuran koloni dan jumlahnya mungkin harus dikurangi untuk koloni yang berukuran besar.

#### **Inokulasi**

Cairkan media yang dibutuhkan (3.28.1.5.3) dalam penangas air atau cara lain yang sesuai (misal dengan inkubator udara yang sesuai, autoklaf dengan uap air mengalir atau oven *microwave*, apabila kombinasi waktu/suhu pemanasan telah divalidasi untuk pembuatan media). Hindari pemanasan yang berlebihan dan ambil media segera setelah mencair. Tempatkan media cair tersebut di penangas air pada suhu  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$  dalam waktu yang cukup sehingga suhu media sama dengan suhu penangas. Lebih diutamakan untuk tidak menyimpan media di penangas air lebih dari 4 jam. Jangan mencairkan media lebih dari satu kali. Siapkan dan tandai cawan Petri yang diperlukan. Buat pengenceran yang diperlukan. Setelah dikocok dengan merata, bagikan porsi uji kedalam cawan. Pindahkan setiap tabung atau wadah media yang sudah mencair dari penangas air, keringkan bagian luarnya dan lewatkan bagian lehernya pada api. Tambahkan media ke tiap cawan Petri tanpa menunda untuk meminimalkan porsi uji dari syok karena panas, dan campur dengan hati-hati sehingga diperoleh distribusi mikroorganisme yang merata pada cawan. Umumnya 15 mL media digunakan untuk porsi uji sebanyak 1 mL atau 2 mL. Biarkan cawan memadat pada permukaan datar. Segera sesudah agar memadat, inkubasi cawan

**CATATAN** Penggunaan alat penyiapan agar di cawan dengan menuang dan menumpuk cawan (*Agar preparator pourer-stacker systems*) dapat dimanfaatkan untuk laboratorium analisa yang mempunyai jumlah contoh yang banyak

#### **Inkubasi dan pengamatan**

- Balikkan cawan dan inkubasi satu set pada  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$  selama  $(44 \pm 4)$  jam; inkubasi set lainnya pada  $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$  selama  $(68 \pm 4)$  jam.
- Amati cawan segera setelah dikeluarkan dari inkubator; apabila tidak memungkinkan simpan pada suhu  $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$  dan amati dalam waktu 48 jam.
- Abaikan setiap cawan yang pertumbuhannya melebar (tidak ada batas sambungan) dan atau berlebihan menutupi cawan.

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.4N Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 6 dari 8
<b>UJI KADAR ANGKA LEMPENG TOTAL (ALT) DALAM AIR DEMINERAL</b>		

### Perhitungan koloni

Untuk setiap suhu inkubasi, hitung setiap koloni yang ada di tiap cawan dan perhitungkan estimasi jumlah koloni untuk tiap 1 mL contoh sesuai prosedur yang dijelaskan di ISO 8199

#### E. Perhitungan

##### Ketentuan Umum

Amati cawan segera setelah inkubasi. Jika tidak memungkinkan, dapat disimpan pada suhu  $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$  dalam periode waktu yang pendek (misal beberapa hari) yang dipastikan tidak mempengaruhi terhadap jumlah, penampakan atau konfirmasi koloni. Jika cawan disimpan, lakukan validasi periode penyimpanan sehingga sesuai dengan metode dan jenis contoh.

##### Koloni yang dihitung

Untuk jumlah "total" pada media tidak selektif, semua koloni dihitung.

##### Kasus umum

Perhitungan hasil pada bagian ini dapat digunakan pada kasus dimana jumlah total koloni pada cawan adalah antara 10 dan 300. Mengingat setiap koloni diasumsikan berasal dari satu mikroorganisme atau dari agregat tunggal mikroorganisme, maka hasil dinyatakan sebagai jumlah koloni dalam satu volume acuan spesifik dari contoh (umumnya 100 mL atau 1 mL) dengan menggunakan persamaan (1):

$$Cs = (Z / V_{total}) \times V_s$$

**keterangan :**

- $Cs$  adalah estimasi jumlah koloni dalam volume  $V_s$  contoh;
- $Z$  adalah jumlah koloni yang dihitung pada cawan atau pada membran yang diperoleh dari pengenceran  $d_1, d_2, \dots, d_i$ , atau diperoleh dari volume tertentu porsi uji (contoh atau pengenceran)
- $V_s$  adalah volume acuan yang dipilih untuk menyatakan konsentrasi mikroorganisme dalam contoh;
- $V_{tot}$  adalah total volume contoh awal yang terhitung yang digunakan dalam cawan yang dienumerasi.  $V_{tot}$  adalah jumlah volume tertentu porsi uji (contoh atau pengenceran) atau dihitung menggunakan persamaan (2):

$$V_{tot} = (n_1 V_1 d_1) + (n_2 V_2 d_2) + \dots + (n_i V_i d_i) \quad (2)$$

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.4N Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 7 dari 8
<b>UJI KADAR ANGKA LEMPENG TOTAL (ALT) DALAM AIR DEMINERAL</b>		

**keterangan :**

$V_{tot}$  adalah total volume contoh awal terhitung yang digunakan dalam cawan yang dienumerasi  $n_1, n_2, \dots, n_i$  adalah jumlah cawan yang dihitung untuk pengenceran  $d_1, d_2, \dots, d_i$ ;

$V_1, V_2, \dots, V_i$  adalah volume uji yang digunakan dengan pengenceran  $d_1, d_2, \dots, d_i$ ;

$d_1, d_2, \dots, d_i$  adalah pengenceran yang digunakan untuk volume uji  $V_1, V_2, \dots, V_i$  ( $d \leq 1$  untuk contoh yang tidak diencerkan,  $d = 0,1$  untuk pengenceran sepersepuluh, dan seterusnya)

**CATATAN** Dengan demikian hasil akhir yang diperoleh adalah fungsi dari rata-rata tertimbang (*weighted average*) dari jumlah koloni pada setiap cawan. Kecuali dinyatakan lain, bulatkan hasil hitungan dengan dua angka penting ketika melaporkan hasil akhir. Untuk melakukan hal ini, jika angka ketiga adalah kurang dari 5 bulatkan ke bawah, sedangkan jika angka ketiga lebih besar atau sama dengan 5, maka bulatkan ke atas (satu angka lebih tinggi). Nyatakan hasil sebagai angka, sebaiknya, antara 1,0 and 9,9 kali pangkat 10 yang sesuai, atau seluruh angka dengan dua angka signifikan.

Contoh perhitungan untuk teknik cawan tuang (dienumerasi secara duplo) adalah sebagai berikut:

**CONTOH 1**

Jika volume larutan uji yang digunakan ( $V_i$ ) adalah 1 mL, dan jumlah berikut diperoleh dari pengenceran yang digunakan:

Pengenceran Jumlah

10-2 81 koloni dan 97 koloni

10-3 9 koloni dan 15 koloni

maka:

$$Z = 81 + 97 + 9 + 15 = 202$$

$$V_{tot} = (2 \times 1 \times 0,01) + (2 \times 1 \times 0,001) = 0,022$$

Dan jika  $V_s$  adalah 1 mL:

$$C_s = 202 / 0,022 = 9182$$

Maka setelah pembulatan:  $C_s = 9,2 \times 10^3$  koloni/mL.

**Pernyataan hasil**

Nyatakan hasil uji sebagai jumlah koloni per mL (koloni/mL) dari contoh tiap suhu inkubasi. Apabila tidak ada koloni pada cawan yang diinokulasi dengan volume uji dari contoh

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.4N Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 8 dari 8
<b>UJI KADAR ANGKA LEMPENG TOTAL (ALT) DALAM AIR DEMINERAL</b>		

yang tidak diencerkan, nyatakan hasilnya sebagai “tidak terdeteksi dalam satu mL”. Apabila ada lebih dari 300 koloni di cawan yang diinokulasi dengan tingkat pengenceran tertinggi, nyatakan hasilnya sebagai  $> 300$  atau hanya sebagai perkiraan.

- **Dokumen Terkait**

SNI 3554:2015