



<p>LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG</p>	<p><b>INSTRUKSI KERJA</b></p>	<p>Nomor : IK-LAB-5.4.1.40 Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 1 dari 8</p>
<p><b>UJI PSEUDOMONAS AERUGINOSA DALAM AIR DEMINERAL</b></p>		

<p>Disetujui oleh :</p>  <p>Kepala Seksi SS</p>	<p>Diajukan oleh :</p>  <p>Penyelia</p>
--	--

<p>LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG</p>	<p><b>INSTRUKSI KERJA</b></p>	<p>Nomor : IK-LAB-5.4.1.40 Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 2 dari 8</p>
<p><b>UJI PSEUDOMONAS AERUGINOSA DALAM AIR DEMINERAL</b></p>		

## A. Prinsip

### 1. Penyaringan

Contoh air atau hasil pengenceran contoh, dengan volume terukur, disaring melalui penyaring membran 0,45 µm. Penyaring membran ditempatkan pada media selektif dan diinkubasi pada kondisi yang ditentukan untuk media.

### 2. Enumerasi

Jumlah *P. aeruginosa* terduga diperoleh dengan menghitung jumlah koloni tipikal pada penyaring membran setelah inkubasi. Koloni penghasil piosianin dianggap sebagai *P. aeruginosa*, tetapi koloni yang berpendar lain atau koloni cokelat kemerahan memerlukan konfirmasi.

### 3. Konfirmasi

Koloni yang membutuhkan konfirmasi yang berasal dari penyaring membran ditumbuhkan ke atas cawan nutrient agar (atau media lain, selama media tersebut tidak selektif dan tidak mengandung karbohidrat yang dapat difermentasi). Sesudah inkubasi, biakan yang awalnya tidak berfluoresens diuji untuk reaksi oksidase, sedangkan biakan yang positif-oksidase diuji untuk produksi fluoresein dan kemampuan untuk menghasilkan amonia dari *acetamide*. Biakan yang awalnya berpendar, diuji untuk kemampuan pembentukan amonia dari *acetamide*.

## B. Pengencer, media pembiakan dan pereaksi

### Media pembiakan untuk uji pendugaan

#### a) Pseudomonas agar base/CN-agar

Pepton gelatin 16,0 g

Hidrolisat kasein 10,0 g

Kalium sulfat (anhidrat) (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 10,0 g

Magnesium klorida (anhidrat) (MgCl<sub>2</sub>) 1,4 g

Gliserol 10 mL

Agar 11,0 g sampai 18,0 g

Air suling atau yang setara 1000 mL

**CATATAN** jumlah agar yang diperlukan tergantung pada kekuatan gel. Ikuti instruksi dari pabrikan untuk penggunaan agar.

<p>LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG</p>	<p><b>INSTRUKSI KERJA</b></p>	<p>Nomor : IK-LAB-5.4.1.40 Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 3 dari 8</p>
<p><b>UJI PSEUDOMONAS AERUGINOSA DALAM AIR DEMINERAL</b></p>		

b) Suplemen CN

*Hexadecyltrimethyl ammonium bromide (cetrimide)* 0,2 g

Asam Nalidiksat 0,015 g

Suspensikan pepton, hidrolisat kasein, kalium sulfat, magnesium klorida dan agar dalam 1 000 mL air suling (atau yang setara). Tambahkan 10 mL gliserol. Panaskan sampai mendidih untuk melarutkan sempurna dan sterilisasi dengan autoklaf pada  $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$  selama 15 menit. Biarkan media turun suhunya sampai  $(45 \text{ sampai } 50) ^\circ\text{C}$ . Tambahkan 2 mL air suling steril ke dalam suplemen CN, kocok rata dan tambahkan ke media basal cair steril. Campurkan hingga merata dan tuang ke dalam cawan Petri sehingga menghasilkan ketebalan agar sedikitnya 5 mm. pH akhir media padat harus sesuai  $(7,1 \pm 0,2)$  pada  $25 ^\circ\text{C}$ . Simpan cawan-cawan yang telah siap dalam gelap, lindungi dari pengeringan pada  $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$  dan gunakan dalam 1 bulan. Jangan menyimpan agar cair selama lebih dari 4 jam. Jangan mencairkan kembali media.

**Media dan pereaksi untuk uji konfirmasi**

a) Media King's B

Pepton 20,0 g

Gliserol 10 mL

Di-kalium hidrogen posfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 1,5 g

Magnesium sulfat heptahidrat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 1,5 g

Agar 15,0 g

Air suling (atau yang setara) 1000 mL

Larutkan bahan dalam air dengan pemanasan. Dinginkan sampai  $(45 \text{ sampai } 50) ^\circ\text{C}$  dan atur pH  $7,2 \pm 0,2$  pada  $25 ^\circ\text{C}$ , menggunakan asam klorida atau natrium hidroksida. Tuang 5 mL ke dalam tabung reaksi tertutup dan autoklaf pada  $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$  selama 15 menit. Biarkan tabung-tabung dingin dan menjadi padat dalam bentuk agar miring. Simpan dalam gelap pada suhu  $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$  dan gunakan dalam jangka waktu 3 bulan.

b) *Acetamide broth*

Larutan A

Kalium di-hidrogenposfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1,0 g

Magnesium sulfat (anhidrat) ( $\text{MgSO}_4$ ) 0,2 g

LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG	<b>INSTRUKSI KERJA</b>	Nomor : IK-LAB-5.4.1.40 Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 4 dari 8
<b>UJI PSEUDOMONAS AERUGINOSA DALAM AIR DEMINERAL</b>		

*Acetamide* 2,0 g

Natrium klorida (NaCl) 0,2 g

Air suling (atau yang setara, bebas ammonia) 900 mL Larutkan bahan dalam air dan kemudian atur pH  $7,0 \pm 0,5$  pada  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  menggunakan asam klorida atau natrium hidroksida.

**PERHATIAN:** *Acetamide* adalah bahan yang bersifat karsinogenik (dapat menyebabkan kanker) dan iritasi — tindakan pencegahan yang tepat harus diambil ketika menimbang, mempersiapkan dan membuang media.

Larutan B

Natrium molibdat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 0,5 g

Besi sulfat heptahidrat ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0,05 g

Air suling 100 mL

Untuk mempersiapkan *acetamide broth*, tambahkan 1 mL larutan B ke 900 mL larutan A yang baru disiapkan. Tambahkan air dengan pengadukan konstan sampai volume total 1 L. Tuang sebanyak 5 mL campuran ini ke dalam tabung reaksi lalu tutup dan sterilisasi dengan autoklaf pada  $(121 \pm 3)\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. Simpan dalam gelap pada  $(5 \pm 3)\text{ }^{\circ}\text{C}$  dan gunakan dalam waktu 3 bulan.

c) *Nutrient agar*

Pepton 5,0 g

*Meat extract* 1,0 g

*Yeast extract* 2,0 g

Natrium klorida (NaCl) 5,0 g

Agar 15,0 g

Air suling 1000 mL

Larutkan bahan dalam air dengan pemanasan. Sterilisasi dengan autoklaf pada  $(121 \pm 3)\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. pH media padat harus sesuai  $(7,4 \pm 0,2)$  pada  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Keringkan cawan-cawan untuk menghilangkan kelebihan kondensat pada permukaan sebelum digunakan. Simpan cawan-cawan yang siap dalam gelap terlindung dari pengeringan pada  $(5 \pm 3)\text{ }^{\circ}\text{C}$  dan gunakan dalam 1 bulan.

d) Pereaksi oksidase

Tetrametil-p-fenilendiamina dihidroklorida 0,1 g

<p>LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG</p>	<p><b>INSTRUKSI KERJA</b></p>	<p>Nomor : IK-LAB-5.4.1.40 Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 5 dari 8</p>
<p><b>UJI PSEUDOMONAS AERUGINOSA DALAM AIR DEMINERAL</b></p>		

Air suling 10 mL

Larutkan Tetrametil-p-fenilendiamina dihidroklorida dalam air segera sebelum digunakan dan lindungi dari cahaya. Pereaksi ini tidak stabil. Siapkan segar dalam jumlah kecil sebelum digunakan. Cara lain, gunakan uji oksidase yang tersedia secara komersial.

e) Pereaksi *Nessler*

Merkuri klorida (HgCl<sub>2</sub>) 10 g

Kalium yodida (KI) 7 g

Natrium hidroksida 16 g

Air suling (bebas amonia) Sampai 100 mL

Larutkan 10 g HgCl<sub>2</sub> dan 7 g KI dalam sedikit air dan pelan-pelan tambahkan campuran ini, dengan pengadukan, ke larutan 16 g NaOH yang dilarutkan dalam 50 mL air yang telah dingin. Encerkan sampai 100 mL. Simpan dalam gelas borosilikat bertutup karet hindari dari sinar matahari selama maksimum 1 tahun

**PERHATIAN: HgCl<sub>2</sub> adalah senyawa yang bersifat toksik, jangan sampai tertelan**

### C. Peralatan

- Alat gelas : sterilisasi seluruh peralatan gelas pada  $(170 \pm 5) ^\circ\text{C}$  selama 1 jam dalam oven kering atau  $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$  selama 15 menit dalam autoklaf sebelum digunakan
- Inkubator yang dapat mempertahankan suhu  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ;
- Lampu ultra violet (UV) yang dapat memancarkan radiasi panjang gelombang  $(360 \pm 20)$  nm;
- Penyaring membran steril, dengan ukuran diameter pori 0,45  $\mu\text{m}$

### D. Prosedur

#### Persiapan contoh uji

Lakukan teknik penyaringan membran sesuai petunjuk pada ISO 8199

#### Penyaringan membran dan inkubasi

- Gunakan sebanyak 250 mL contoh air minum dalam kemasan.
- Saring sejumlah volume contoh air di atas atau hasil pengenceran contoh melalui penyaring membran *cellulose ester* steril dengan diameter pori setara dengan 0,45  $\mu\text{m}$ .

<p>LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG</p>	<p><b>INSTRUKSI KERJA</b></p>	<p>Nomor : IK-LAB-5.4.1.40 Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 6 dari 8</p>
<p><b>UJI PSEUDOMONAS AERUGINOSA DALAM AIR DEMINERAL</b></p>		

- Tempatkan masing-masing membran di atas cawan Petri yang berisi CN agar, pastikan tidak ada udara yang terperangkap di bawah membran.
- Inkubasi cawan-cawan Petri pada  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$  selama  $(44 \pm 4)$  jam dalam wadah dan lindungi terhadap pengeringan.

#### **Pengamatan membrane**

- Amati pertumbuhan pada membran sesudah  $(22 \pm 2)$  jam dan  $(44 \pm 4)$  jam.
- Hitung semua koloni yang menghasilkan warna biru/hijau (piosianin) sebagai *P. aeruginosa* terkonfirmasi. Periksa membran di bawah radiasi UV  $(360 \pm 20)$  nm. Sebagai catatan, periode berkepanjangan di bawah sinar UV harus dihindari, jika tidak, koloni dapat terbunuh dan gagal tumbuh pada media konfirmasi.
- Hitung semua koloni yang berpendar tetapi tidak menghasilkan piosianin (non-piosianin) sebagai *P. aeruginosa* terduga dan lakukan uji konfirmasi dengan menggunakan *acetamide broth* seperti yang dijelaskan di bawah ini.
- Hitung semua koloni lain berpigmen cokelat kemerahan yang tidak berpendar sebagai *P. aeruginosa* terduga dan lakukan uji konfirmasi dengan menggunakan uji oksidase, *acetamide broth*, dan media King'B seperti yang dijelaskan di bawah ini. Pembacaan setelah  $(22 \pm 2)$  jam dilakukan jika pertumbuhan koloni terlalu cepat, sehingga penggabungan koloni yang mungkin terjadi setelah  $(44 \pm 4)$  jam dapat dihindari. Langkah-langkah untuk uji konfirmasi sebagai berikut :

#### **Uji Konfirmasi**

##### **- Nutrient Agar**

Subbiakan semua atau sebanyak mungkin koloni yang diperlukan untuk uji konfirmasi dari penyaring membran ke permukaan media *Nutrient agar* dalam cawan Petri dan inkubasi selama  $(22 \pm 2)$  jam pada  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ . Uji kemurnian koloni yang di subbiakan dan uji koloni yang pada awalnya cokelat kemerahan untuk uji reaksi oksidase.

##### **- Uji oksidase**

Letakkan 2 sampai 3 tetes pereaksi oksidase segar ke atas kertas saring dalam cawan Petri. Dengan jarum inokulasi kawat platina (bukan Ni chrome), jarum inokulasi plastik, batang atau batang kaca, oleskan koloni yang tumbuh pada kertas saring yang tersedia. Lihat

<p>LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG</p>	<p><b>INSTRUKSI KERJA</b></p>	<p>Nomor : IK-LAB-5.4.1.40 Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 7 dari 8</p>
<p><b>UJI PSEUDOMONAS AERUGINOSA DALAM AIR DEMINERAL</b></p>		

munculnya warna biru-ungu dalam 10 detik sebagai reaksi positif. Cara lain, gunakan uji oksidase yang tersedia secara komersial mengikuti instruksi dari pabrikan.

- **Media King's B**

Subbiakan, biakan cokelat kemerahan yang positif oksidase yang diperoleh dari butir 3.28.3.6.4.1 (*Nutrient agar*) ke atas media King's B dan inkubasi sampai 5 hari pada  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ . Periksa pertumbuhan setiap hari di bawah radiasi UV dan catat adanya pendaran. Catat pendaran yang muncul sampai hari kelima sebagai hasil positif.

- **Acetamide broth**

Inokulasi tabung dengan subbiakan dari butir 3.28.3.6.4.1 (*Nutrient agar*), dan inkubasi pada  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$  selama  $(22 \pm 2)$  jam. Tambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi Nessler dan periksa tabung yang memproduksi amoniak, dicirikan oleh produksi warna bervariasi dari kuning sampai merah bata tergantung pada konsentrasi.

### E. Perhitungan

Hitung semua koloni yang dikonfirmasi sebagai *P. aeruginosa*, yaitu yang menghasilkan piosianin (pigmen biru/hijau), oksidase positif, berpendar di bawah sinar UV dan dapat menghasilkan amoniak dari *acetamide*.

**CATATAN** koloni-koloni yang berpendar pada membran utama adalah selalu positif oksidase sehingga mereka tidak perlu diuji untuk parameter ini (lihat tabel 16).

**Pernyataan hasil**

Dari jumlah koloni-koloni tipikal yang dihitung dari penyaring membran berdiameter pori 0,45  $\mu\text{m}$ , dan memperhitungkan proporsi uji konfirmasi yang dilakukan, hitung jumlah *P. aeruginosa* yang dikonfirmasi ada dalam volume air. Nyatakan hasilnya dalam koloni /250 mL.

**CONTOH**

Jika

- *P* adalah jumlah koloni biru/hijau; semua dihitung sebagai target terkonfirmasi;
- *F* adalah jumlah koloni yang berpendar;
- *R* adalah jumlah koloni cokelat kemerahan;
- *nF* adalah jumlah koloni berpendar yang diuji untuk produksi ammonia;
- *cF* adalah jumlah koloni berpendar yang positif untuk produksi ammonia;

<p>LABORATORIUM BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI PALEMBANG</p>	<p><b>INSTRUKSI KERJA</b></p>	<p>Nomor : IK-LAB-5.4.1.40 Revisi/ Edisi : 0/7 Tanggal Terbit : 01 April 2019 Halaman : 8 dari 8</p>
<p><b>UJI PSEUDOMONAS AERUGINOSA DALAM AIR DEMINERAL</b></p>		

-  $nR$  adalah jumlah koloni cokelat kemerahan yang diuji untuk ammonia dan produksi oksidase dan berpendar di atas King's B;

-  $cR$  adalah jumlah koloni cokelat kemerahan yang positif untuk ammonia dan produksi oksidase dan berpendar di atas King's B;

Maka, jumlah *P. aeruginosa* adalah sama (setara) dengan  $P + F(cF/nF) + R (cR/nR)$  per volume contoh yang diuji.

#### F. Dokumen Terkait

SNI 3554:2015