

PENENTUAN MIKROORGANISME KEAMANAN PANGAN LAUT

Penulis :

Komariah Tampubolon



**DEPARTEMEN TEKNOLOGI HASIL PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2008**



**DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
DEPARTEMEN TEKNOLOGI HASIL PERAIRAN (THP)**

Kampus IPB Dramaga - Bogor 16680, Telp. (0251) 622915-622916. Fax. : (0251) 622915-622916 E-mail : thp_ipb@ipb.ac.id

Perihal : Ucapan Terima Kasih


Kepada Yth. : **Ir. Komariah Tampubolon, MS.**
Staf Pengajar Dept. Teknologi Hasil Perairan FPIK
Institut Pertanian Bogor
di Bogor

Dengan ini kami ucapkan terima kasih atas sumbangan Karya Ilmiah berupa :
Buku/Jurnal/Makalah yang tidak dipublikasikan sebanyak 4 (empat) judul sebagai berikut :

No.	Judul Karya Ilmiah	Keterangan
1.	Mikroorganisme Dalam Pangan Laut, <i>Makalah tahun 2008, Departemen Teknologi Hasil Perairan FPIK IPB</i>	<u>Tulisan Tunggal :</u> Komariah Tampubolon
2.	Penentuan Mikroorganisme Pangan Laut, <i>Makalah tahun 2008, Departemen Teknologi Hasil Perairan FPIK IPB</i>	<u>Tulisan Tunggal :</u> Komariah Tampubolon
3.	Penentuan Mikroorganisme Keamanan Pangan Laut, <i>Makalah tahun 2008, Departemen Teknologi Hasil Perairan FPIK IPB</i>	<u>Tulisan Tunggal :</u> Komariah Tampubolon
4.	Mikrobiologi Keamanan Pangan Laut, <i>Makalah tahun 2008, Departemen Teknologi Hasil Perairan FPIK IPB</i>	<u>Tulisan Tunggal :</u> Komariah Tampubolon

Adapun Buku/Jurnal/Makalah tersebut disimpan di Perpustakaan Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.

Bogor, 26 Juni 2008
Perpustakaan
Dep. Teknologi Hasil Perairan FPIK IPB


Dedy Wibowo, A.Md.
NIP. -



**DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
DEPARTEMEN TEKNOLOGI HASIL PERAIRAN (THP)**

Kampus IPB Dramaga - Bogor 16680, Telp. (0251) 622915-622916, Fax. : (0251) 622915-622916 E-mail : thp_ipb@ipb.ac.id

SURAT KETERANGAN

Yang bertanda tangan di bawah ini menerangkan bahwa:

Nama : Ir. Komariah Tampubolon, MS.

NIP : 130 355 555

Pangkat/Jabatan : Pembina Tk. I/ IV b / Lektor Kepala

Unit Kerja : Departemen Teknologi Hasil Perairan

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB

Telah mendokumentasikan Makalah (Hasil Karya Ilmiah) yang berjudul :

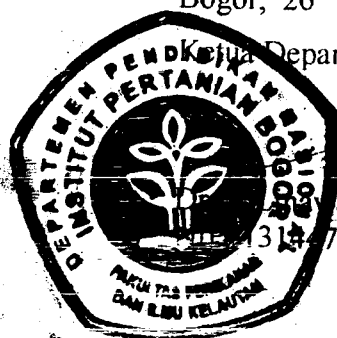
No.	Judul	Keterangan
1.	Mikroorganisme Dalam Pangan Laut, 2008, Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.	<u>Tulisan Tunggal :</u> <i>Komariah Tampubolon</i>
2.	Penentuan Mikroorganisme Pangan Laut, 2008, Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.	<u>Tulisan Tunggal :</u> <i>Komariah Tampubolon</i>
3.	Mikrobiologi Keamanan Pangan Laut, 2008, Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.	<u>Tulisan Tunggal :</u> <i>Komariah Tampubolon</i>
4.	Penentuan Mikrobiologi Keamanan Pangan Laut, 2008, Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.	<u>Tulisan Tunggal :</u> <i>Komariah Tampubolon</i>

pada Perpustakaan Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.

Demikian Surat keterangan ini dibuat, agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Bogor, 26 Juni 2008

Kepala Departemen THP FPIK-IPB,



Yati Hardjito, M.Sc.

318 7395

KATA PENGANTAR

Buku Penentuan Mikroorganisme Keamanan Pangan Laut ini disusun untuk memberikan pengetahuan tambahan bagi pembaca dalam menentukan berbagai mikroorganisme yang berkaitan dengan keamanan pangan laut dan sanitasi serta higiene dari pangan laut. Selanjutnya diharapkan para pengguna dapat melaksanakan penilaian, dan pengawasan terhadap mutu produk hasil perikanan yang sesuai dengan standar, khususnya Standar Nasional Indonesia.

Penulis menyadari bahwa buku ini masih belum sempurna, sehingga perlu perbaikan dan tambahan yang disesuaikan dengan kemajuan teknologi. Penulis berharap semoga buku ini dapat diambil manfaatnya.

Bogor, Mei 2008,

Penulis

DAFTAR ISI

I. Uji Mikrobiologi Daging dan Ikan	1
II. Penentuan <i>Coliform</i> dan <i>Escherichia coli</i>	6
III. Metoda Pengujian <i>Salmonella</i>	11
IV. Praktikum Sanitasi	22
Daftar Pustaka	42
Lampiran	43

I. UJI MIKROBIOLOGI DAGING DAN IKAN

Pertumbuhan mikroba dipengaruhi oleh berbagai faktor lingkungan, diantaranya adalah suhu, pH, aktifitas air, adanya oksigen, dan tersedianya zat makanan. Oleh karena itu kecepatan pertumbuhan mikroba akan berubah dengan berubahnya berbagai faktor lingkungan tersebut. Di dalam bab ini akan dipelajari pengaruh suhu penyimpanan terhadap pertumbuhan mikroba pada beberapa bahan pangan hewani yaitu daging sapi dan ayam, ikan laut dan ikan air tawar.

1. Pengaruh Pendinginan

Seperti telah kita ketahui, pendinginan dapat memperpanjang masa simpan suatu makanan, karena selama pendinginan pertumbuhan mikroba dapat dicegah atau diperlambat. Pertanyaan yang sering timbul adalah: Bagaimana pendinginan dapat memperlambat suhu maksimum dan suhu minimum sebagai yang terbaik untuk pertumbuhannya. Suhu yang terbaik untuk pertumbuhan mikroba disebut suhu optimum. Pengaruh suhu terhadap pertumbuhan mikroba disebabkan suhu mempengaruhi aktifitas enzim yang mengkatalis reaksi-reaksi biokimia di dalam sel mikroba. Dibawah suhu optimum, keaktifan enzim di dalam sel mikroba menurun dengan semakin rendahnya suhu, akibatnya pertumbuhan sel juga terhambat. Pada suhu pembekuan keaktifan metabolisme akan berhenti disebabkan keaktifan enzim akan berhenti, juga karena sel kekurangan cairan disekelilingnya yang digunakan untuk menyerap zat-zat makanan dan mengeluarkan sisa-sisa metabolisme, akibatnya pertumbuhan sel akan berhenti sama sekali.

Berdasarkan suhu minimum, optimum dan maksimum untuk pertumbuhan, mikroba dibedakan atas tiga grup yaitu:

1. Grup *psikrofilik*, yaitu mikroba yang dapat tumbuh pada suhu 0 C, dengan suhu optimum 5-15 C dan suhu maksimum sekitar 20 C.
2. Grup *mesofilik*, yaitu mikroba yang tumbuh baik pada suhu 20-45 C. beberapa mikroba mesofilik dapat tumbuh pada suhu rendah yaitu 5 C atau

dibawahnya, sehingga sifatnya menyerupai psikofilik. Berdasarkan sifat tersebut, dikenal dua grup mikroba yaitu *psikotrofik* atau mikroba yang tumbuh baik pada suhu rendah tetapi tidak membutuhkan suhu tersebut untuk pertumbuhannya, dan *psikrodurik* yaitu mikroba yang lebih menyukai suhu pertengahan untuk pertumbuhannya tetapi masih tahan hidup pada suhu rendah.

3. Grup *termofilik*, yaitu mikroba yang dapat tumbuh pada suhu yang relatif tinggi dengan suhu minimum 25 C, suhu optimum 45-55 C, dan suhu maksimum 60-65 C. Beberapa bakteri termofilik bahkan masih dapat hidup dan tumbuh sampai suhu 75 C, misalnya *Bacillus stearothermophilus* dan *Clostridium thermosaccharolyticum*. Bakteri yang masih tahan dan tidak mati pada suhu pasteurisasi disebut bakteri *termodurik*.

2. Bahan dan Alat

Bahan :

Kelompok	Bahan	Penyimpanan	Pemupukan per cawan
I	Daging sapi, ikan laut	Freezer (7hari)	10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ml
II	Daging sapi, ikan laut	Refrigerator (1 hari)	10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ml
III	Daging ayam, ikan air tawar	Freezer (7 hari)	10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ml
IV	Daging ayam, ikan air tawar	Refrigerator (1 hari)	10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ml

Per kelompok : 100 ml PCA cair

100 ml agar VRB (violet Red Bile) cair

2 tabung berisi 5 ml air steril

7 tabung larutan pengencer @ 9 ml

Bahan-bahan pewarnaan gram

Larutan H_2O_2 3%

Alat : Per kelompok

12 cawan petri steril

2 batang pengoles

Pipet-pipet 1 ml

Gelas obyek

Inkubator 20-22 C

Mikroskop

3. Cara Kerja

Analisa yang dilakukan terhadap daging sapi, daging ayam dan ikan adalah: (1) Jumlah mikroba (medium PCA), (2) Jumlah bakteri gram negatif (medium VRB), (3) Pewarnaan gram terhadap cairan daging/ikan, dan (4) Uji katalase terhadap koloni yang tumbuh.

(1) Metode Hitungan Cawan

Pengenceran. Dengan menggunakan batang pengoles (swab), yaitu batang lidi yang pada bagian ujungnya dibungkus kapas, oleskan permukaan contoh seluas 4 cm² (2 cm x 2 cm) dengan cara mengoles kekiri dan kekanan masing-masing sebanyak tiga kali. Kemudian rendam batang pengoles tersebut di dalam 5 ml air destilata steril, dan diputar-putar dan diperas pada dinding tabung untuk melepaskan mikroba yang melekat pada kapas pengoles tersebut. Dari contoh steril pengolesan, buatlah pengenceran sampai 10⁻³ untuk contoh yang dibekukan (freezer) atau sampai 10⁻⁴ untuk contoh yang didinginkan (refrigerator).

Pemupukan. Buatlah pemupukan dengan jumlah seperti yang ditetapkan di atas, masing-masing 2 cawan untuk setiap pengenceran, yaitu satu cawan untuk medium PCA dan cawan lainnya untuk medium VRB. Tuangkan PCA dan agar VRB masing-masing ke dalam satu seri cawan petri, goyangkan, dan biarkan membeku. Inkubasikan pada suhu 20-22 C selama 2-3 hari. Hitung jumlah koloni yang tumbuh pada PCA dan VRB. Agar VRB akan menghambat pertumbuhan

@

bakteri gram positif, sehingga yang tumbuh hanya bakteri gram negatif. Lakukan perhitungan sebagai berikut :

(2) Pewarnaan Gram

Buatlah pewarnaan gram terhadap cairan yang keluar dari daging/ikan seperti cara yang tercantu pada Bab 4. Amati di bawah mikroskop menggunakan lensa minyak imersi. Setelah mengamati beberapa bidang pandang, nyatakan kira-kira dalam persen jumlah bakteri gram positif dan gram negatif.

(3) Uji Katalase

Teteskan larutan H_2O_2 3% di atas koloni-koloni yang tumbuh pada PCA atau VRB. Amati terbentuknya gelembung-gelembung udara yang menunjukkan adanya bakteri-bakteri yang bersifat katalase positif.

Laporan

Percobaan : Mikrobiologi daging dan ikan

Nama :

Nrp :

Gol./Kelompok :

A. Laporkan hasil pengamatan saudara dalam bentuk tabel sebagai berikut

Tabel . Hasil pengamatan mikrobiologi daging dan ikan

Bahan	Penyimpanan	Jml. Koloni/cm ²		% Gram		Katalase
		Total	Gram -	Gram -	Gram +	
Daging sapi	Freezer					
	Refrig.					
Daging ayam	Freezer					
	Refrig.					
Ikan laut	Freezer					
	Refrig.					
Ikan air tawar						

B. Berikan pembahasan mengenai pengaruh suhu penyimpanan terhadap jenis mikroba yang tumbuh pada keempat bahan pangan tersebut.

Pertanyaan

1. Jelaskan mengapa dalam uji mikrobiologi daging dan ikan pengambilan contoh biasanya dilakukan dengan cara oles pada permukaan (swab)
2. Jelaskan mengapa dalam uji mikrobiologi daging dan ikan biasanya digunakan suhu inkubasi 20-22 C
- (4) Jelaskan mengapa medium VRB dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif

II. PENENTUAN *Coliform* DAN *Escherichia coli* (SNI – 01 – 2332 – 1991/M₆)

1. Pendahuluan

Mikroorganisme coliform termasuk bakteri gram negatif tidak berspora, aerob sampai fakultatif anaerob, berbentuk batang dan dapat memfermentasikan laktosa dengan menghasilkan asam dan gas pada suhu 35° selama 48 jam. Golongan coliform terdiri dari beberapa genera, beberapa, ada yang berasal dari perut (*Escherichia*) dan ada yang berasal dari tumbuh tumbuhan dan tanah (*Entrobacter*). Coliform digunakan sebagai mikroorganisme indikator dalam pengawasan sanitasi. Sebagian besar tidak berbahaya kecuali pada beberapa strain, seperti *Escherichia coli* yang mempunyai sifat patogenik, terutama terhadap orang tua dan anak.

2. Media dan Reagensia

1. Larutan butterfield's buffered phosphate, (R.3).
2. Brilliant green lactose bile broth 2 % / BGLB, (M.11).
3. Lauryl tryptose broth / LTB, (M.13).
4. EC broth, (M.21).
5. Lefine's eosin methylene blue agar / L-EMB, (M.32).
6. Tryptone atau trypticase broth 1%, (M.73).
7. MR-VP broth, (M.45).
8. Koser's citrate broth, (M.29).
9. Plate Count Agar / PCA, (M.53).
10. Reagen Kovac's, (R.9).
11. Reagen Voges Proskaur / VP, (R.18).
12. Reagen Pewarnaan gram (Appendiks III).
13. Reagen Methyl Red indikator, (R.10).

3. Peralatan

1. Sama dengan peralatan yang digunakan pada pengujian ALT.
2. Water bath tertutup dengan sistem sirkulasi, ($45,5^{\circ} \pm 0,005^{\circ}\text{C}$).
3. Jarum inokulasi dengan diameter bagian dalam 3 mm.

4. Prosedur

1) Persiapan Contoh

Persiapan contoh seperti pada pengujian ALT

2) Tahapan Analisa

a. Uji Pendugaan (*presumtif*) *Coliform*

1. Siapkan larutan dengan pengenceran 10^{-1} , sampai 10^{-3} atau lebih bila perlu. Kocok sampai homogen.
2. Dengan menggunakan pipet steril, pindahkan sebanyak 1 ml larutan dari tiap pengenceran ke setiap 3 tabung LTB yang berisi tabung Durham.
3. Inkubasikan tabung-tabung tersebut selama 48 ± 2 jam pada suhu 35°C .
4. Perhatikan gas yang terbentuk selama 48 ± 2 jam, tabung-tabung ini adalah hasil positif dalam pendugaan untuk mikroorganisme *Coliform*.
5. Lakukan "Uji Penegasan (konfirmasi)" untuk tabung-tabung yang positif.

b. Uji Penegasan *Coliform*

1. Pindahkan dengan menggunakan jarum inokulasi berdiameter 3 mm biakkan dari tabung LBT yang positif ke tabung-tabung BGLB broth 2% yang berisi tabung Durham.
2. Inkubasi BGLB broth selama 48 ± 2 jam pada suhu 35°C .
3. Perhatikan gas yang terbentuk selama 48 ± 2 jam. Tabung-tabung ini adalah hasil positif dalam uji penegasan *Coliform*.
4. Dengan menggunakan tabel "Angka Paling Memungkinkan (APM)"

tentukan nilai APM berdasarkan pada jumlah tabung-tabung BGLB yang mengandung gas pada 48 ± 2 jam dengan suhu 35°

5. Hitung sebagai APM *Coliform* (lihat lampiran)

c. Uji pendugaan *E. Coli*

1. Pindahkan biakan dengan menggunakan jarum inokulasi berdiameter 3 mm dari setiap tabung LTB yang positif ke tabung EC yang berisi tabung durham
2. Inkubasi EC broth yang telah diinokulasi pada water bath sirkulasi dengan suhu $45,5^\circ$ selama 48 ± 2 jam. Water bath harus dalam keadaan bersih, dan air didalamnya harus lebih tinggi dari ketinggian cairan (medium) yang ada dalam tabung.
3. Setelah di inkubasi selama 48 ± 2 jam, tabung-tabung yang menghasilkan gas dinyatakan positif dan diduga *E.coli*

d. Uji Penegasan *E. Coli*

1. Dari tabung EC broth yang positif perlahan-lahan buat goresan pada LEMB Agar dengan menggunakan jarum inokulasi berdiameter 3 mm dan hindarkan terjadinya selaput.
2. Inkubasi biakan pada LEMB dengan suhu 35° selama 18-24 jam.
3. Perhatikan koloni tersangka, yaitu hitam atau gelap pada bagian pusat koloni dengan atau tanpa metalik kehijauan.
4. Dengan menggunakan jarum inokulasi, ambil koloni tersangka dari masing-masing LEMB dan pindahkan ke PCA miring yang digunakan untuk uji biokimia.
5. Inkubasikan agar miring tersebut pada suhu 35°C selama 18-24 jam.
6. Kemudian buat pewarnaan gram dari setiap koloni *E. coli*. *E. coli* termasuk gram negatif dan tidak berspora.

7. Lakukan uji biokimia dengan reaksi IMVIC :

a. Produksi Indol

Inokulasi tabung Tryptone Broth, dengan biakan yang berasal dari masing-masing PCA dan inkubasikan pada suhu 35°C , selama 24 ± 2 jam, uji indol dengan menambahkan 0.2-0.3 ml reagen kovac. Hasil positif adalah terbentuknya cincin merah pada lapisan bagian atas media.

b. Uji Voges Proskuser

Inokulasi tabung media MRVP dengan biakan dari masing-masing PCA dan inkubasikan pada suhu 35°C , selama 48 ± 2 jam. Pindahkan sebanyak 1 ml MRVP ke tabung reaksi kecil (13 x 100 mm), dan tambahkan 0.6 ml larutan Alphanapthol dan 0.2 ml 40% KOH, digoyang dan tambahkan sedikit kristal kreatin. Hasil positif adalah terbentuknya warna merah muda eosin dalam waktu 2 jam.

c. Uji Methyl Red

Inkubasi kembali tabung MRVP (tabung b diatas) selama 48 ± 2 jam pada suhu 35°C , setelah dilakukan uji VP. Tambahkan 5 tetes indikator methyl red pada setiap tabung. Hasil reaksi methyl red dinyatakan positif jika terbentuk warna merah kuning.

d. Penggunaan citrat (Kosers Citrate broth)

Secara hati-hati inokulasi tabung berisi koser's citrate medium dengan biakan dari masing-masing PCA menggunakan jaruk inokulasi (loop). Penggunaan inokulum terlalu banyak akan menyebabkan terbawanya nutrisi lainnya. Inkubasi pada suhu 35°C selama 96 jam. Uji positif jika menunjukkan terjadinya pertumbuhan pada tabung.

e. Pembentukan gas dari laktosa. Inokulasi tabung LTB dari masing-masing PCA inkubasi pada suhu 35°C selama 48 jam. Perhatikan terbentuknya gas dan ini memberikan reaksi positif.

5. Interpretasi Hasil

Tabel : Hasil Reaksi IMVIC

No.	Tipe Organisma	Indol	MR	VP	Citrate
1.	<i>E. coli</i> spesifik	+	+	-	-
2.	<i>E. coli</i> tidak spesifik	-	+	-	-
3.	Typical intermediate	+	+	-	+
4.	Atypical intermediate	-	+	-	+
5.	Typical <i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	+	+
6.	Atypical <i>Enterobacter aerogenes</i>	+	-	+	+

Diklasifikasikan *E. coli* apabila:

- Reaksi IMVIC adalah ++-- atau -+--
- Membentuk gas di LTB pada inkubasi selama 48 ± 2 jam.
- Pewarnaan gram menunjukkan gram negatif, tidak berspora dan berbentuk bulat atau coccus.
- Menentukan APM untu *E. coli* dengan menggunakan tabel APM (lihat lampiran) berdasarkan jumlah tabung-tabung uji penegasan dengan IMVIC, fermentasi laktosa dan pewarnaan gram.

III. METODA PENGUJIAN *Salmonella* (SNI – 01 – 2335 – 1991/M₉)

1. Pendahuluan

Terdapatnya serotipe *Salmonella* pada makanan adalah sangat berbahaya, karena bakteri ini merupakan sumber penyakit bagi manusia. Baik karena secara langsung yaitu dengan cara mengkonsumsi makanan tersebut atau secara tidak langsung yaitu melalui kontaminasi dari peralatan rumah tangga atau peralatan pengolahan.

Bakteri ini mampu tumbuh dengan baik pada makanan yang sudah mengalami perlakuan panas, suhu dingin, suhu beku atau pengeringan. Masa inkubasi pada tubuh manusia adalah 6 hari sampai 48 jam, menyebabkan diare yang disertai mual-mual, demam dan muntah-muntah. Dalam keadaan akut dapat menyebabkan kematian, karena bakteri ini dapat merusak hati, ginjal dan empedu.

Metoda isolasi *Salmonella* ini mempunyai prinsip-prinsip baku yang terdiri dari lima tahap yaitu : tahap pra pengkayaan, pengkayaan seleksi, seleksi pada media agar, uji biokimia dan uji serologi.

2. Media dan Reagensia

- (1) Lactose broth
- (2) Selenite cystine broth
- (3) Tetrathionate broth
- (4) Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar
- (5) Hektoen Enteric (HE) agar
- (6) Bismuth sulfite (BS) agar
- (7) Triple Sugar Iron (TSI) agar
- (8) Tryptone (Tryptohane) broth
- (9) Trypticase Soy-Tryptose Broth/ TSTB
- (10) MR – VR broth
- (11) Simmons Cetrate Agar

- (12) Urea broth
- (13) Urea broth rapid
- (14) Malonate broth
- (15) Lysin Iron Agar (LIA)
- (16) Lysin decarboxylase broth
- (17) Motility Test Medium (Semi Solid)
- (18) Potassium Cyanide broth
- (19) Purple Carbohydrat broth
- (20) Brain Heart Infusion (BHI) broth
- (21) Potassium sulfite powder kering
- (22) Reagen Kovac's
- (23) \Reagen Voges-proskauer (VP)
- (24) Cratine phosphate crystals
- (25) Potassium hydroxide solution, 40%
- (26) 1 N sodium hydroxide
- (27) 1 N hydrochloric acid
- (28) Brillian green dye solution, 1%
- (29) Indikator Metyl red
- (30) Larutan Physiological saline
- (31) Larutan Formalinized physiological salne 0.85%
- (32) *Salmonella* polyvalent somatic (O) antiserum
- (33) *Salmonella* polyvalent flagelar (H) antiserum

3. Peralatan dan Bahan

- (1) Blender yang tahan pada suhu autoclave atau stomacher
- (2) Pippet steril
- (3) Botol bermulut lebar
- (4) Gelas preparat
- (5) Timbangan

- (6) Inkubator $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- (7) Water bath
- (8) Cawan petri
- (9) Jarum tanam/inokulasi
- (10) Spatulasi
- (11) Autoclave
- (12) Jarum loop

3. Prosedur

(34) Tahap Analisa

a. Pra pengayaan

1. Timbang 25 gr contoh, masukkan kedalam blender atau plastik steril dan tambahkan 225 ml Lactose broth. Homogenisasi selama ± 2 menit dengan kecepatan rendah.
2. Bila pH dibawah 6.6 sesuaikan sampai menjadi $\text{pH } 6.8 \pm 0.2$ dengan menambahkan 1 N NaOH steril.
3. Inkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam.

b. Pengayaan

1. Aduk perlahan-lahan biakan pra pengkayaan dan ambil masing-masing 1 ml pindahkan kedalam 10 ml Tetrathionate Broth (TTB) dan 10 ml Selenite Cystine Broth (SCB).
2. Inkubasikan TTB dan SCB pada suhu 35°C selama 24 jam.

c. Seleksi pada Media Agar

1. Masing-masing media pengkayaan diambil 1 (satu) loop diinokulasikan/digoreskan ke HE, XLD dan BSA.
2. Inkubasikan pada suhu 35°C selama 24 jam.
3. Pembacaan koloni *Salmonella* sebagai berikut:

4. Ambil koloni tersangka dari ketiga media diatas dengan menggunakan jarum inokulasi TSI agar miring dengan cara streak agar miring dan tusuk pada dasar.
 - a. Pada media HE koloni hijau kebiruan dengan atau tanpa titik hitam dari H_2S .
 - b. Pada media XLD koloni pink dengan atau tanpa titik mengkilat atau terlihat hampir seluruh koloni berwarna hitam.
 - c. Pada media BSA koloni ke abu-abuan atau kehitaman kadang-kadang metalik, media disekitar koloni berwarna coklat kemudian berubah hitam dengan makin lamanya waktu inkubasi.
5. Dari TSI tanpa mengambil koloni baru gunakan jarum yang sama inokulasikan ke LIA dengan cara menusukkan ke agar dasar lebih dahulu selanjutnya streak/goreskan pada agar miring.
6. Inkubasikan TSI dan LIA pada suhu $35^{\circ}C$ selama 24 ± 2 jam dengan membiarkan tutup sedikit dikendurkan untuk menghindarkan H_2S berlebih.
7. Koloni spesifik akan memberikan reaksi sebagai berikut :

Tabel. Reaksi biokimia *Salmonella* pada TSI dan LIA

Media	Agar Mirin	Agar Dasar	H_2S	Gas
	(Slant)	(Bult)		
TSI	Alkaline/K (merah)	Asam/A (Kuning)	+	-
LIA	Alkaline/K	Alkaline/K	+	-

4. Uji Biokimia

(1) Uji Urease

- a. Uji urease konvensional

Inokulasikan dari TSI tersangka dengan loop ke urea broth.

Inkubasikan 24 ± 2 jam pada 35°C

b. Uji urease cepat

Inokulasikan dari TSI tersangka dengan jarum loop ke rapid urea broth, inkubasikan 2 jam dalam water bath pada suhu $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

Reaksi spesifik *Salmonella* untuk uji urease memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna).

(2) Lysine decarboxylase broth

Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan, ambil 1 loop dari TSI inokulasikan ke LDB, inkubasikan 48 ± 2 jam dengan 35°C tetapi amati setiap interval 24 jam. *Salmonella* memberikan reaksi alkalin ditandai dengan warna ungu pada seluruh media, reaksi negatif memberikan warna kuning. Jika hasil reaksi meragukan (bukan ungu dan bukan kuning) tambahkan beberapa tetes 0.2 % bromeresol purple dye dan amati perubahan warnanya.

(3) Phenol red dulcitol broth atau purple broth base dengan 0.5% dulcitol.

Inokulasikan dulcitol broth dari TSI, longgarkan tutupnya dan inkubasikan 48 ± 2 jam dengan 35°C , tetapi amati tiap 24 jam. Kebanyakan spesies *Salmonella* memberikan hasil positif, ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung durham dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham dan pH alkalin merah (untuk indikator phenol red) atau ngun (indikator bromeresol purple) warna pada media.

(4) Tryptone (tryptophane) broth

Sejumlah kecil biakan dari TSI Agar miring, diinokulasikan TB dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu $\pm 35^{\circ}\text{C}$ selanjutnya ikuti prosedur di bawah ini :

a. Potassium cyanida (KCN) broth.

Pindahkan 1 loop penuh biakan dari TB 24 jam ke KCN broth, tutup tabung rapat-rapat dan dilapisi lilin. Inkubasikan selama 48 ± 2 jam dengan 35°C tetapi amati tiap 24 jam. Hasil positif menunjukkan pertumbuhan (ditandai adanya kekeruhan) *Salmonella* tidak dapat tumbuh pada media ini (negatif).

b. Malonate broth

Pindahkan 1 loop penuh dari TB 24 jam ke malonate broth inkubasikan 48 ± 2 jam dengan 35°C amati tiap 24 jam. Reaksi positif menunjukkan perubahan warna menjadi biru. *Salmonella* memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna) pada broth ini.

c. Indol test

5 ml TB 24 jam tambahkan 0.2-0.3 ml reagent kovacs, amati segera setelah penetesan. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan, reaksi negatif terbentuk cincin kuning. *Salmonella* memberikan reaksi negatif.

d. MR – VP broth

Inokulasikan MR-VP ini dengan sejumlah kecil dari TSI agar miring, inkubasikan pada suhu 35°C .

(5) Uji VP (Voges – Proskauer)

Pindahkan 1 ml MR – VP broth 48 ± 2 jam kedalam tabung reaksi dan sisa MR – VP broth diinkubasi kembali 48 ± 2 jam dengan 35°C . Tambahkan 0.6 ml alpha naphthol aduk sempurna, tambahkan 0.2 ml larutan 40% KOH dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin, baca hasil setelah 4 jam. Perubahan warna menjadi pink sampai

merah delima pada media adalah reaksi positif. Pada umumnya *Salmonella* adalah VP – negatif, ditandai tidak terjadi perubahan warna pada media.

(6) Uji Methyl Red (MR)

Kedalam 5 ml dari 96 jam MR-VP broth tambahkan 5-6 tetes indikator methyl red baca hasil segera. Pada umumnya *Salmonella* memberikan hasil positif ditandai dengan terjadinya difusi warna merah dalam media. Terjadinya warna kuning merupakan reaksi negatif.

a. Simmons citrate agar

Inokulasikan agar slant ini dengan menggunakan jarum loop yang berisi pertumbuhan dari TSI agar miring, dengan menggores pada agar miring dan menusuk pada agar dasar. Inkubasikan 96 ± 2 jam dengan 35°C . Positif jika terjadi pertumbuhan biasanya dibarengi dengan perubahan warna dari hijau menjadi biru. Kebanyakan *Salmonella* memberikan hasil citrate positif. Negatif - tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.

b. Phenol Red Lactose broth atau Purple Lactose broth

Inokulasi broth ini dengan koloni dari pertumbuhan TSI agar miring, inkubasikan selama 48 ± 2 jam dengan 35°C baca tiap 24 jam. Kebanyakan *Salmonella* memberikan hasil citrate positif. Negatif, tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.

c. Phenol Red Sucrose broth atau Purple Sucrose broth

Ikuti prosedur seperti no. 7 diatas. *Salmonella* memberikan hasil eaksi negatif untuk sucrose.

5. Uji Serologi

(1) Polyvalent Somatic (O) test.

Letakkan koloni dari TSI atau dari LIA pada gelas preparat sebanyak 1 loop, beri 1 tetes fisiological saline (0.85% NaCl) steril ratakan dengan kultur. Beri 1 tetes *Salmonella* polyvalent somatic (O) antiserum disamping suspensi koloni, kemudian campurkan suspensi koloni ke antiserum sedikit demi sedikit sampai tercampur sempurna. Miringkan campuran tersebut kekiri dan kekanan, amati seera pada latar belakang yang gelap. Juga lakukan kontrol dengan menggunakan larutan fisiological saline dan antiserum.

Positif – terjadinya penggumpalan pada larutan kultur dan tidak terjadi penggumpalan pada kontrol

Negatif – tidak terjadi penggumpalan.

Non spesifik – penggumpalan pada kedua uji campuran dan kontrol.

(2) Uji Polivalen Flagelar (H)

Dari pertumbuhan TSI agar miring yang ureasenya negatif diinokulasikan ke:

1. BHI broth, diinkubasikan 4-6 jam pada suhu 35°C sampai nampak terjadi pertumbuhan (untuk diuji pada hari yang sama).
2. Trypticase Soy-Tryptose Broth (TSTB, diinkubasikan selama 24 ± 2 jam dengan 35°C untuk diuji hari berikutnya).

6. Interpretasi Hasil

Tabel. Reaksi biokimia dan serologi, *Salmonella*

No.	TEST SUBSTRATE	HASIL REAKSI		SALMONELLA
		POSITIF	NEGATIF	
1.	Glucose	Tusukan Kuning	Tusukan Merah	+
2.	Lysine Decarboxylase (LIA)	Tusukan ungu	Tusukan Kuning	+
3.	H ₂ S (TSI dan LIA)	Hitam	Titik Hitam	+
4.	Urease	Warna ungu sampai merah	-	
5.	Lysine Decarboxylase Brith	Warna ungu	Warna kuning	+
6.	Phenol Red Dulcitol broth	Warna kuning dengan/gas	Tanpa tidak terbentuk gas, tidak berubah	+ b
7.	KCN Broth	Pertumbuhan	warna	-
8.	Malonate Broth	Warna Biru	Tidak ada pertumbuhan	- c
9.	Indole test	Permukaan warna merah	Tidak berubah warna	-
10.	Polypalent flagelar test	Agglutinasi	Permukaan warna	+
11.	Polypalent Somatic test	Agglutinasi	kuning	+
12.	Phenol Red Lactose Broth	Warna kuning dgn/tanpa gas	Tidak agglutinasi Tidak agglutinasi	- c
13.	Phenol Red Sucrose Broth	Warna kuning dgn/tanpa gas	Tidak terbentuk gas dan tidak berubah warna	-
14.	Voges-prokauese test	Ungu sampai merah	Tidak terbentuk gas dan	-
15.	Methyl Red test	Merah menyebar	tidak berubah warna	+
16.	Simmont Citrate	Pertumbuhan, warna biru	Tidak berubah warna Warna kuning menyebar Tidak ada pertumbuhan, tidak ada perubahan	-

Keterangan : b = Mayoritas dari culture Arijona : Negatif

c = Mayoritas dari culture Arijona : Positif

Tambahkan 2.5 ml larutan formalinized Saline kedalam 5 ml dari kedua kultur diatas. Dari kedua kultur dan uji dengan Salmonella polyvalent Flagela (H) antisera. Letakkan ± 0.5 ml larutan Salmonella polyvalent (H) antisera dalam tabung serologi 10 x 75 mm atau 13 x 100 mm, kemudian tambahkan 0.5 ml antigen yang akan diuji. Siapkan kontrol saline dengan mencampur 0.5 ml formalinized antigen. Inkubasi campuran tersebut dalam water bath pada suhu 48-50°C. Amati setiap interval waktu 15 menit dan pengamatan terakhir sebagai hasil akhir setelah 1 jam.

Positif : Penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol.

Negatif : Tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol.

Non spesifik : penggumpalan pada kedua uji campuran dan kontrol.

Tabel. Kriteria untuk pemisahan Biakan non *Salmonella*

No.	Test Substrat	Hasil
1.	Urease	Positif (warna ungu-merah)
2.	Test Indol	Positif (warna merah pada permukaan)
	Test Polyvalent flagellar (H) atau test flagellar spicer-Edwards	Negatif (tidak ada penggumpalan)
3.	Lysin decarboxylase KCN broth	Negatif (warna kuning)
		Positif (ada pertumbuhan)
4.	Phenolred lactose broth	Positif (warna kuning ada/tidak ada gas) ^{a,b}
5.	Phenolred sucrose broth	
6.	Voges – Proskauer tes	Positif (warna kuning ada/tidak ada gas) ^b
	Methyl red test	Positif (warna pink sampai merah)
		Negatif (warna kuning menyebar)

- a. Test Malone broth positif lebih lanjut untuk mengamati jika biakan tersebut *Salmonella Arizona*.
- b. Jangan dibuang biakan positif jika biakan pada LIA menunjukkan reaksi bercirikan *Salmonella*, test lebih lanjut untuk mengamati jika spesies *Salmonella*.

IV. PRAKTIKUM SANITASI

Telah disajikan pada tulisan sebelumnya bahwa sanitasi yang baik diperlukan dalam menghasilkan produk pangan yang bermutu dan aman bagi kesehatan. Tulisan ini menyajikan cara pengujian sanitasi di industri pangan yang meliputi uji sanitasi udara dan ruangan, uji sanitasi wadah dan peralatan pengolahan, uji sanitasi pekerja dan uji sanitasi bahan pangan segar.

1. Uji Sanitasi Udara Dan Ruangan

Pada dasarnya udara tidak mengandung mikroflora secara alami. Namun adanya kontaminasi dari lingkungan di sekitarnya akan mengakibatkan udara mengandung berbagai mikroorganisme. Sebagai contoh adanya debu, proses aerasi air, fermentasi dan pekerja yang mengalami infeksi saluran pernapasan dapat mengakibatkan kontaminasi udara. Mikroorganisme yang terdapat di udara umumnya menempel pada benda padat (misalnya debu) ataupun terdapat di dalam droplet air.

Di udara umumnya terdapat mikroorganisme yang tahan pada kondisi kering sehingga mampu hidup lama di udara. Spora kapang berukuran relatif kecil dan ringan serta tahan kondisi kering sehingga sering terdapat di udara. Spora bakteri di udara biasanya menempel pada benda padat (debu) atau dalam droplet air. Di udara lebih sering ditemukan bakteri berbentuk kokus dibandingkan bakteri berbentuk batang. Selain itu juga seringkali ditemukan khamir terutama khamir yang membentuk warna dan tidak membentuk spora.

Bilamana dalam suatu ruangan terdapat banyak air dan debu maka mikroba yang ditemukan di ruangan tersebut juga bermacam-macam, misalnya mikroba tanah yang berasal dari tanah dan debu ataupun mikroba yang berasal dari semprotan air. Selain itu pada ruang fermentasi banyak terdapat mikroflora yang berperan pada fermentasi dan dari makanan terfermentasi (spora tempe, oncom).

Untuk mengetahui sanitasi ruangan dapat dilakukan beberapa uji sanitasi udara dan ruangan seperti metode cawan terbuka, metode RODAC dan metode oles.

1) Metode

(1) Metode cawan terbuka

Metode yang digunakan pada uji kontaminasi udara. Cawan petri berisi medium yang telah membeku diletakkan dalam keadaan tutup cawan terbuka di beberapa tempat yang akan diuji sanitasinya.

Untuk ruangan yang berukuran relatif kecil maka cukup disediakan dua agar cawan, sedangkan bilamana ruangnya cukup besar maka perlu disediakan empat cawan atau lebih. Setelah agar cawan dibiarkan terbuka selama beberapa waktu kemudian cawan diinkubasikan untuk mengetahui adanya pertumbuhan mikroba, dan ditentukan densitas bakteri (*Medium Nutrient Agar*) serta densitas kapang khamir (*Medium Acidified Potato Dextrose Agar*).

(2) Metode RODAC (*Replicate Organism Direct Agar Contact*)

Metode RODAC merupakan metode yang sering digunakan pada uji sanitasi meja dan lantai. Caranya yaitu dengan mengadakan kontak langsung dengan media terhadap meja atau lantai yang akan diuji. Dengan cara menempelkan langsung pada media agar pada bidang yang diuji maka mikroorganisme yang terdapat pada bidang kontak tersebut akan menempel pada media agar.

Media yang umum digunakan adalah *Plate Count Agar*. Media agar yang akan menempel pada lantai/meja dapat dipersiapkan dengan salah satu dari cara berikut ini :

a. Agar Cawan Mini

Disiapkan agar cawan mini yang diisi penuh dengan media (sampai pada permukaan cawan) dan diletakkan pada cawan petri steril bertutup yang berukuran lebih besar, tujuan pengisian penuh media agar pada cawan adalah bilamana agar cawan mini tersebut dibalikkan dan ditempelkan

pada suatu bidang maka mikroorganisme yang terdapat pada bidang tersebut dapat menempel pada media agar.

b. Agar Dalam Alat Suntik

Disiapkan media agar yang dituangkan pada alat suntik (diameternya sekitar 5 cm) kemudian ditutup dan disterilkan. Bilamana akan digunakan, maka alat suntik didorong hingga agar mencapai permukaan dan ditempelkan ke bidang yang diuji sanitasinya, kemudian agar dipotong dan dipindahkan ke cawan petri steril.

(3) Metode Oles

Metode oles dilakukan dengan cara menyeka permukaan meja atau lantai seluas misalnya 5 cm x 10 cm (50 cm²), terutama pada meja yang sering digunakan ataupun lantai yang sering dilalui. Pengujian dengan metode oles dilakukan di beberapa tempat yang terpisah dan cukup mewakili.

2) Tujuan

Untuk mengetahui adanya kontaminasi mikroba yang berasal dari udara maupun ruangan serta menghitung densitas/jumlah mikroba di udara dan ruangan tersebut.

3) Bahan dan alat

Bahan untuk tiap kelompok

- 2 Agar cawan NA (Nutrient Agar)
- 2 Agar cawan PDA (Potato Dextrose Agar)
- 3 Agar cawan mini PCA (Plate Count Agar) dalam cawan petri steril bertutup
- 1 Agar dalam alat suntik 80 ml PCA cair
- 2 Larutan pengencer @ 5 ml steril
- 2 Larutan pengencer @ 9 ml steril

Alat untuk tiap kelompok

7 Cawan petri steril
 Pipet 1 ml steril
 2 Batang pengoles steril
 Bunsen
 Pisau steril
 Inkubator 30-32°C

4) Prosedur Kerja**(1) Metode Cawan Terbuka**

- a. Disiapkan 2 agar cawan NA dan 2 agar cawan PDA, diberi tanda/nama ruangan dan waktu kontak dengan udara (30 menit)
- b. Cawan petri steril dibuka diruangan yang telah ditentukan sehingga media tersebut kontak dengan udara selama 30 menit, kemudian cawan petri ditutup kembali.
- c. Cawan petri diinkubasikan pada suhu 30-32°C selama 2 hari (posisi cawan terbalik).
- d. Diamati adanya pertumbuhan dan koloni yang tumbuh pada masing-masing agar cawan, kemudian dihitung dan dirata-ratakan untuk setiap medium.
- e. Dari data tersebut, dihitung densitas bakteri (*pada Nutrient Agar*) dan densitas kapang dan khamir (*pada Dextrose Agar*). Densitas mikroba di udara adalah jumlah mikroba yang jatuh pada permukaan seluas satu kaki (feet) persegi selama satu jam.

$$\text{Densitas bakteri Diudara cawan} = \frac{\text{Jumlah rata-rata koloni}}{\text{60 menit}} \times \frac{144 \text{ m}^2}{30 \text{ menit} \times \text{luas cawan (m}^2\text{)}}$$

$$\begin{array}{l} \text{Desitas kapang} \\ \text{Khamir diudara} \end{array} = \frac{\text{jumlah rata-rata koloni pada PDA}}{\text{60 menit}} \times \frac{144 \text{ m}^2}{30 \text{ menit} \times \text{luas cawan (m}^2\text{)}}$$

- f. Dari koloni yang tumbuh pada cawan-cawan tersebut, dipilih beberapa koloni bakteri, kapang dan khamir yang mewakili koloni yang dominan, dan diamati dibawah mikroskop dengan menggunakan preparat basah. Untuk bakteri dapat juga dilakukan perwarnaan Gram.

(2) Metode RODAC

- a. Disiapkan agar cawan mini penuh berisi media PCA, yang diletakkan pada cawan petri steril lalu cawan tersebut ditempelkan pada meja atau lantai yang akan diuji kebersihannya selama 4 detik. Selanjutnya cawan diletakkan kembali pada cawan petri yang lebih besar dan ditutup.
- b. Bila digunakan agar dalam alat suntik, maka alat suntik didorong hingga agar menonjol keluar setebal 5 mm, lalu agar tersebut ditempelkan pada meja atau lantai yang akan diuji. Selanjutnya dengan pisau steril agar dipotong dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril dan ditutup. Bagian agar yang kontak dengan meja/lantai harus menghadap keatas.
- c. Semua cawan petri diinkubasikan pada suhu 30-32°C selama 2 hari (posisi cawan tidak boleh terbalik)
- d. Diamati adanya pertumbuhan mikroba, dihitung dan dinyatakan jumlah koloni per 100 cm.

$$\frac{\text{Jumlah mikroba}}{\text{Per } 100 \text{ cm}^2} \times \frac{\text{jumlah rata-rata}}{\text{koloni per cawan}} \times \frac{100}{\text{luas agar yang kontak (cm}^2\text{)}}$$

- e. Untuk menguji daya kerja suatu desinfektanyang digunakan untuk mencuci meja/lantai, uji semacam ini dapat dilakukan secara bertahap terhadap
 - c.1. Meja atau lantai sebelum dibersihkan.
 - c.2. Meja atau lantai setelah dibersihkan tanpa desinfektan.
 - c.3. Meja atau lantai setelah dibersihkan dengan desinfektan.

(3) Metode Oles

Untuk jelasnya dapat dilihat prosedur metode oles pada uji sanitasi peralatan.

2. Uji Sanitasi Wadah Dan Peralatan Pengolahan

Permukaan peralatan pengolahan seringkali menjadi sumber kontaminasi pada bahan pangan yang diolah jika tidak dibersihkan dengan baik. Peralatan tersebut dapat berupa pipa-pipa tangki, alat potong, gelas atau wadah pengemas, dan sebagainya. Sedangkan bahan yang digunakan untuk membuat wadah atau peralatan tersebut dapat berupa stainless steel, plastik, kaca, keramik, kayu bahkan batu.

Sanitasi yang dilakukan terhadap wadah atau peralatan pengolahan pada umumnya meliputi pencucian dan perlakuan sanitasi menggunakan sanitiser. Pencucian terutama dilakukan untuk menghilangkan kotoran-kotoran dan sisa bahan yang diolah, sedangkan perlakuan sanitasi menggunakan sanitiser ditujukan untuk membunuh sebagian besar atau semua mikroorganisme yang terdapat pada permukaan wadah atau peralatan pengolahan tersebut.

Selain air, dalam pencucian biasanya digunakan deterjen untuk mengemulsifikasi lemak dan melarutkan mineral serta komponen-komponen larut lainnya sebanyak mungkin. Disamping itu deterjen juga dapat membantu melunakkan air. Deterjen yang digunakan harus memenuhi persyaratan tidak bersifat korosif dan mudah dibersihkan dari permukaan.

Dalam proses sanitasi, sanitiser yang sering digunakan adalah air panas, uap panas, halogen (klorin atau iodine), turunan halogen, dan komponen amonium kuartener. Jenis sanitiser, konsentrasi yang digunakan, suhu dan metode yang diterapkan bervariasi tergantung dari jenis wadah dan alat yang dibersihkan maupun jenis mikroorganisme yang akan dibasmi.

Untuk mengetahui kesempurnaan perlakuan sanitasi terhadap suatu wadah atau peralatan pengolahan maka permukaan dari peralatan tersebut diuji secara mikrobiologis. Tergantung dari bentuk wadah atau peralatan yang akan diuji, terdapat beberapa metode uji, misalnya untuk botol atau wadah yang permukaannya cekung

diterapkan *metode bilas* sedangkan untuk peralatan pengolahan dengan permukaan relatif datar digunakan *metode oles (swab)*.

1) Metode

(1) Metode Bilas

Pada metode ini diperlukan larutan pembilas yang berupa larutan bufer fosfat atau larutan garam fisiologis. Ke dalam wadah atau peralatan yang akan diuji dimasukkan sejumlah larutan pembilas tersebut kemudian larutan pembilas yang sudah berisi contoh dianalisa kandungan mikroorganismenya. Volume larutan pembilas yang digunakan tergantung dari besar kecilnya alat pengolahan yang diuji, misalnya untuk botol kecap atau mangkuk blender digunakan 100 ml, sedangkan untuk botol jam digunakan 20 ml larutan pembilas. Jenis mikroorganisme yang dianalisa juga bervariasi, misalnya total mikroba (angka lempeng total), total kapang khamir, total bakteri proteolitik, total bakteri pembentuk spora dan sebagainya.

(2) Metode Oles Swab

Pada metode ini diperlukan swab atau alat pengoles berupa lidi yang ujungnya diberi kapas steril dan larutan bufer fosfat atau garam fisiologis 5 ml. Pertama-tama swab dimasukkan ke dalam larutan pengencer kemudian diperas dengan cara menekan pada dinding tabung bagian atas sambil diputar-putar. Selanjutnya permukaan peralatan yang diuji diusap dengan swab tersebut dengan luasan tertentu, misalnya 10 cm x 5 cm pada bagian yang mengalami kontak langsung dengan bahan yang diolah. Swab dimasukkan kembali ke dalam tabung, diaduk dan diputar menggunakan kedua tangan selama 2 menit. Swab diperas kembali pada dinding tabung, kemudian dikeluarkan dari tabung. Penyekaan pada satu area dilakukan sebanyak tiga kali. Seperti halnya pada metode bilas, jenis mikroorganisme yang dianalisa juga bervariasi sesuai dengan yang diperlukan.

2) Tujuan

Pada pengujian ini dilakukan pemeriksaan efektifitas sanitasi yang umum dilakukan terhadap peralatan sehari-hari dan peralatan pengolahan makanan.

3) Bahan dan Alat

Peralatan makan (piring, gelas) : sebelum dicuci dan sesudah dicuci atau disanitasi.

Peralatan pengolahan (talenan kayu/plastik, mangkuk stainless/melamin, blender, mangkuk mixer : sebelum dicuci dan sesudah dicuci atau disanitasi.

Larutan bufer fosfat dan perlengkapan swab

Agar cawan steril (*Acidified Potato Dextrose Agar*, *Nutrient Agar*, *Skim Milk Agar*)

Cawan petri steril, pipet steril, dan lampu bunsen.

4) Prosedur Kerja

(1) Pengujian sanitasi botol atau peralatan dengan permukaan cekung

1. Pada peralatan yang akan diuji ditambahkan larutan pembilas sebanyak 20 ml atau 100 ml tergantung dari ukuran wadah, ditutup rapat, dikocok 10-12 kali , dan diputar-putar secara horizontal sebanyak 25 kali.
2. Sebanyak 1.0 ml dan 0.1 ml suspensi tersebut masing-masing diinokulasikan ke dalam empat cawan petri. Dua cawan petri untuk masing-masing jumlah suspensi dituangi dengan *Acidified Potato Dextrose Agar* (APDA) untuk menghitung total kapang khamir, sedangkan dua cawan yang lain dituangi dengan *Skim Milk Agar* (SMA) untuk menghitung total bakteri proteolitik.
3. Untuk menghitung jumlah spora bakteri yang mungkin mengkontaminasi peralatan yang diuji, sisa suspensi dipanaskan pada suhu 80°C selama 10 menit untuk membunuh sel-sel vegetatif, kemudian sebanyak 1.0 ml dan

0.1 ml dari suspensi yang telah dipanaskan tersebut masing-masing dipipetkan ke dalam dua cawan petri steril dan dituangi medium *Nutrient Agar* (NA). inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 2-3 hari.

(2) Pengujian sanitasi peralatan dengan permukaan datar

Untuk setiap alat pengolahan yang akan diuji disediakan medium seperti pada uji sanitasi wadah dengan permukaan cekung/botol, yaitu APDA, SMA dan NA, 12 cawan petri steril, serta perlengkapan swab.

1. Swab dimasukkan kedalam larutan buffer fosfat 5 ml, diperas dengan cara menekan pada dinding tabung bagian atas sambil diputar-putar, kemudian digunakan untuk mengusap permukaan peralatan seluas 10 cm x 5 cm.
2. Swab dimasukkan ke dalam tabung, diaduk dan diputar menggunakan kedua tangan selama 2 menit, diperas kembali pada dinding tabung, kemudian dikeluarkan dari tabung sehingga dilakuka penyekaan sebanyak tiga kali.
3. Pemupukan dilakukan sebanyak 1.0 ml dan 0.1 ml dari masing-masing suspensi menggunakan APDA untuk total kapang khamir, SMA untuk total preteolitik dan MA untuk total spora bakteri menggunakan suspensi yang telah dipanaskan pada suhu 80°C selama 10 menit.
4. Untuk setiap pengenceran digunakan cawan duplo, dan semua cawan diinkubasikan pada suhu 30°C selama 2-3 hari.

5) Pengamatan

(1) Pengujian sanitasi botol atau peralatan dengan permukaan cekung

Pada setiap cawan yang digunakan untuk menghitung total kapang-khamir dan spora bakteri diamati mikroorganisme yang tumbuh, sedangkan pada cawan yang dituangi dengan medium *Skim Milk Agar* untuk menghitung total bakteri proteolitik diamati koloni yang dikelilingi areal bening yang

menandakan dipecahnya kasein oleh bakteri. Jumlah koloni tumbuh pada ketiga medium tersebut dihitung dan dinyatakan dalam jumlah koloni per wadah dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\sum \text{koloni dalam 1.0 ml atau } \sum \text{koloni dalam 0.1 ml} \times 10 \times 20 \text{ atau } 100$$

(2) Pengujian sanitasi peralatan dengan permukaan datar

Jumlah koloni setiap cawan dihitung dan dinyatakan dalam jumlah koloni per cm^2 permukaan alat dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Jumlah koloni/cm}^2 = \text{Jumlah koloni dalam (1.0 ml) atau dalam (0.1 ml} \times 10) \times 5 \times 1/50$$

3. Uji Sanitasi Pekerja

Kontaminasi dalam pengolahan pangan selain ditentukan oleh udara, ruangan dan peralatan pengolahan pangan juga ditentukan oleh pekerja pengolahan pangan. Oleh karena itu kondisi sanitasi dalam pengolahan pangan juga ditentukan oleh kebersihan pekerja yang melakukan pengolahan karena tangan, kaki, rambut maupun pakaian yang kotor dapat merupakan salah satu sumber kontaminasi pada makanan yang diolahnya.

Mikroorganisme yang sering terdapat pada kulit antara lain *Staphylococcus* dan bakteri pembentu spora, sedangkan pada rambut sering dijumpai adanya kapang. Selain itu sering pula dijumpai adanya koliform fekal pada tangan pekerja.

1) Tujuan

Praktikum ini bertujuan untuk mengetahui tingkat kebersihan tangan dan rambut dari pekerja, sehingga dapat dicari alternatif pencegahan kontaminasi pekerja dari tangan maupun rambutnya.

2) Bahan dan Alat

Bahan untuk tiap kelompok

8 Agar cawan PCA (*Plate Count Agar*)

- 8 Agar cawan VJA (*Vogel Johnson Agar*)
- 8 Agar cawan EMBA (*Eosine Methylene Blue Agar*)
- 2 Agar cawan NA (*Nutrient Agar*)
- 2 Agar cawan PDA (*Potato Dextrose Agar*)
- Sabun antiseptik

Alat :

- Bunsen
- Pinset
- Serbek

3) Cara Kerja

(1) Uji Kebersihan tangan

- a. Keempat jari kiri ditempelkan pada medium PCA, VJA, dan EMBA selama empat detik, kemudian ditutup.
- b. Dilakukan hal yang sama pada ketiga jenis media lainnya untuk uji kebersihan tangan kanan.
- c. Semua cawan petri diinkubasikan pada suhu 30-32°C selama 2 hari.
- d. Dilakukan uji kebersihan tangan dengan perlakuan terhadap
 - Tangan sebelum dicuci
 - Tangan setelah dicuci dengan air
 - Tangan setelah dicuci dengan air sabun dan dibilas
 - Tangan setelah dicuci dengan sabun antiseptik dan dibilas
- e. Diamati adanya pertumbuhan mikroorganisme

Media PCA : Pertumbuhan mikroba

Media VJA : Pertumbuhan *Staphylococcus* yang membentuk koloni hitam

Media EMBA : Pertumbuhan grup koliform yaitu koliform fekal (koloni berwarna hijau metalik) dan koliform non fekal (koloni berwarna merah muda dengan titik hitam ditengahnya).

(2) Uji Kontaminasi rambut

- a. Dengan menggunakan pinset, diambil dua helai rambut dan dilekatkan masing-masing pada agar cawan NA, dan PDA.
- b. Semua cawan diinkubasikan pada suhu 30°C selama 2 hari
- c. Uji kontaminasi rambut dilakukan terhadap :
 - Rambut yang baru dicuci
 - Rambut yang dicuci sehari sebelumnya
- d. Diamati : adanya pertumbuhan mikroorganisme
Media NA : Pertumbuhan bakteri
Media PDA : Pertumbuhan kapang dan khamir
- e. Dari pertumbuhan mikroba tersebut dapat dievaluasi kemungkinan rambut tersebut sebagai salah satu sumber kontaminasi dalam pengolahan pangan.

4. Uji Sanitasi Bahan Pangan Segar

Kandungan mikroorganisme pada bahan mentah terutama dipengaruhi oleh jenis bahan pangan, sumber kontaminasi dan penanganan atau penyimpanan sebelum dilakukan proses pengolahan. Pada bahan pangan yang mengandung protein atau lemak seperti daging dan ikan, misalnya, seringkali ditemukan mikroorganisme pemecah protein (proteolitik) atau lemak (lipolitik) sebagai mikroflora alami, sedangkan pada sayuran atau buah sering ditemukan mikroorganisme pemecah pektin (pektinolitik) atau karbohidrat. Selain mikroflora alami tersebut, bahan segar seringkali juga mengandung mikroorganisme yang berasal dari kontaminasi dari lingkungan sekitarnya, termasuk orang yang menangani bahan mentah tersebut. Kontaminan tersebut dapat berupa mikroorganisme penyebab penyakit.

Mikroorganisme yang pada umumnya digunakan sebagai indikator sanitasi pada bahan pangan segar adalah mikroorganisme yang umum terdapat di dalam kotoran manusia maupun hewan. Adanya mikroorganisme indikator di dalam suatu bahan mentah atau makanan menunjukkan terjadinya polusi kotoran dan kondisi

sanitasi yang tidak baik selama persiapan bahan pangan tersebut. Mikroorganisme yang sering digunakan sebagai indikator sanitasi dalam makanan adalah bakteri koliform, terutama koliform fekal, *sterptokoki fekal* dan *Clostridium perfringens*. Meskipun tidak semua bakteri indikator tersebut bersifat patogen, tetapi adanya bakteri indikator di dalam bahan mentah menunjukkan kemungkinan adanya mikroorganisme lainnya yang bersifat enteropatogenik dan/atau toksigenik yang berbahaya bagi kesehatan manusia.

1) Metode Persiapan Bahan

Pengambilan contoh untuk menguji sanitasi bahan pangan dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain dengan *metode celup/bilas*, *metode oles* atau *metode penghancuran ekstraksi*.

(1) Metode celup/bilas

Untuk kontaminasi yang terjadi pada permukaan bahan, terutama yang berukuran kecil, maka metode celup/bilas merupakan cara pengambilan contoh yang mudah dengan tidak merusak struktur contoh yang dianalisa. Pada metode ini contoh yang akan dianalisa dengan ukuran tertentu dimasukkan ke dalam larutan pengencer steril (bufer fosfat atau garam fisiologis) dengan volume yang ditentukan untuk pengenceran, kemudian dikocok kuat-kuat. Untuk bahan mentah seperti ikan teri, udang, daging giling dan sebagainya, pada umumnya dilakukan penimbangan dengan berat tertentu, sedangkan untuk sayuran daun diambil contoh dengan memotong sayuran daun dengan ukuran tertentu, misalnya 2 cm x 2.5 cm (5 cm²).

(2) Metode oles/swab

Metode oles/swab hanya dapat dilakukan terhadap bahan mentah yang mempunyai permukaan cukup luas, seperti ikan berukuran besar atau potongan daging besar. Cara kerja dan perlengkapan yang diperlukan seperti

yang telah dibahas pada uji sanitasi peralatan dan wadah dengan permukaan relatif datar, tetapi luasan yang dioles tidak terlalu besar, pada umumnya seluas 2 cm x 2 cm (4 cm²).

(3) Metode penghancuran ekstraksi

Dalam metode ini contoh ditimbang dan dihancurkan dengan sejumlah larutan pengencer sehingga diperoleh pengenceran 1:10. Kemudian dibuat pengenceran selanjutnya. Pengambilan contoh semacam ini sering dilakukan terhadap bahan mentah seperti telur, daging ikan/ikan giling, sayuran bukan daun, dan sebagainya.

2) Analisa

Analisa mikrobiologi yang dilakukan dalam pengujian sanitasi bahan pangan pada umumnya adalah analisa kuantitatif atau kualitatif bakteri koliform, streptokoki fekal atau *Clostridium perfringens*. Selain itu, untuk bahan baku tertentu seringkali ditambahkan analisa khusus sesuai dengan yang diperlukan. Misalnya pada sari buah dilakukan pengujian keberadaan filamen kapang yang menunjukkan tingkat sanitasi buah yang digunakan. Berikut ini akan dibahas lebih lanjut *Uji Koliform* dan *Uji Filamen Kapang*.

(1) Uji Koliform

Untuk menguji keberadaan bakteri koliform pada umumnya dilakukan secara bertahap, yaitu uji penduga, uji penguat dan uji lengkap. Pada uji penduga biasanya dilakukan analisa APM (Angka Paling Mungkin) atau MPN (*the Most Probable Number*) yaitu menginokulasikan contoh pada tabung yang berisi media dan tabung Durham yang telah disediakan. Untuk contoh yang hanya mengandung bakteri gram negatif, misalnya air, digunakan media *Lactosa Broth*, sedangkan *Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLBB)* digunakan untuk contoh yang mungkin mengandung bakteri gram positif seperti susu. Uji APM ini dapat menggunakan 5, 7, 9, atau 15 seri tabung.

Pada uji penguat dilakukan inokulasi goresan dari tabng APM yang menunjukkan hasil positif (menghasilkan gas) pada media agar cawan Eosine *Methylene Blue Agar (EMBA)*. Selanjutnya pada uji lengkap dilakukan inokulasi koloni spesifik dari EMBA, yaitu hijau metalik (koliform fekal) dan merah berbintik hitam (koliform non fekal), pada Agar miring *Nutrient Agar* dan *Lactose Broth* dengan tabung Durham. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya gas pada tabung Durham dan bakteri berbentuk batang berwarna merah muda (gram negatif) setelah dilakukan pewarnaan gram pada koloni yang tumbuh pada *Nutrient Agar*.

(2) Uji Filamen Kapang

Adanya filamen kapang pada produk buah-buahan diamati dengan bantuan gelas obyek Howard yang dibawah mikroskop terlihat mempunyai cincin Newton. Dari dua atau lebih gelas obyek yang mengandung contoh yang sama, diamati sebanyak minimal 25 bidang pandang dan bidang pandang dinyatakan positif jika terlihat filamen kapang dengan panjang lebih dari satu per enam diameter bidang pandang/dan atau tiga filamen kapang melebihi satu per enam diameter bidang pandang. Hasilnya dinyatakan sebagai persen jumlah bidang pandang yang positif.

3) Tujuan

Pengujian ini ditujukan untuk mengetahui kondisi sanitasi bahan pangan segar, dengan mengamati adanya bakteri koliform dan filamen kapang serta total mikroba.

4) Bahan dan Alat

Bahan

Air bersih

Limbah pencucian hasil laut

Pangan laut

Agar-agar

Media

LB (*Lactose Broth*) dalam tabung + tabung Durham

BGLBB (*Brilliant Green Lactose Bile Broth*) dalam tabung+ tabung Durham

PCA (*Plate Count Agar*)

APDA (*Acidified Potato Dextrose Agar*)

VRBA (*Violet Red Bile Agar*)

Larutan pengencer @ 5 ml

Larutan pengencer @ 9 ml

Larutan pengencer @ 90 ml

Larutan pengencer @ 90 ml (mengandung butiran gelas)

Alkohol

Alat

Cawan petri steril

Pipet 1 ml steril

Gelas obyek Howard (Howard Mold Counting Chamber)

Gelas penutup

Batang pengoles steril

Inkubator 30°C dan 35-37°C

Gelas piala steril

Jarum ose

Bahan	Persiapan bahan	Media	Analisa
Air	-	LB	MPN (7 tabung)
Limbah pencucian hasil laury	-	LB BGLBB	MPN (15 tabung)
Pangan laut	Pengolesan	PCA VRBA	Total mikroba Total mikroba psikrofilik Total koliform
Agar-agar	Pelarutan	APDA	Tatal kapang-khamir Filamen Kapang

5) Prosedur Kerja

(1) Air

- a. Disiapkan medium Lactose Broth dalam tabung yang berisi tabung Durham; 5 tabung konsentrasi ganda dan 2 tabung LB konsentrasi tunggal/biasa.
- b. Kedalam 5 tabung LB dimasukkan masing-masing 10 ml contoh, sedangkan 2 tabung LB dimasukkan masing-masing 1 ml dan 0.1 ml contoh.
- c. Semua tabung diinkubasi pada suhu 35°C selama 1-2 hari.
- d. Diamati dan dihitung jumlah tabung yang positif. Tabung dinyatakan positif bila terbentuk gas yang terperangkap dalam tabung Durham minimal 10% volume jumlah tabung positif dihitung pada masing-masing seri. MPN penduga dapat dihitung dengan melihat tabel MPN 7 tabung.

(2) Limbah pencucian hasil laut

- a. Disiapkan 5 tabung BGLBB (berisi tabung Durham) konsentrasi ganda dan 10 tabung BGLBB konsentrasi tunggal.
- b. Kedalam 5 tabung BGLBB yang pertama dimasukkan masing-masing 10 ml contoh, 5 tabung BGLBB yang kedua 1 ml contoh dan 5 tabung BGLBB yang terakhir 0.1 ml contoh.
- c. Semua tabung diinkubasikan pada suhu 35°C selama 1-2 hari.
- d. Diamati dan dihitung jumlah tabung positif pada masing-masing seri, MPN penduga dapat dihitung dengan melihat tabel MPN 15 tabung.

Jumlah contoh per tabung	Jumlah tabung (dengan tabung Durham)	Jumlah medium per tabung
Air : MPN 7 tabung		
10 ml	5	10 ml LB (konsentrasi ganda)
1 ml	1	10 ml LB (konsentrasi tunggal)
0.1 ml	1	10 ml LB (konsentrasi tunggal)
Agar-agar : MPN 15 tabung		
10 ml	5	10 ml BGLBB (konsentrasi tunggal)
1 ml	5	10 ml BGLBB (konsentrasi tunggal)
0.1 ml	5	10 ml BGLBB (konsentrasi tunggal)

(3) Agar-agar

- Ditimbang 10 gram agar-agar, dimasukkan ke dalam 90 ml larutan pengencer (40°C) dikocok beberapa kali hingga larut (dihindari terbentuknya busa akibat pengocokan yang terlalu kuat).
- Dari pengenceran diatas dibuat pengenceran selanjutnya hingga 10^{-3} .
- Pemupukan dilakukan pada pengenceran 10^{-1} hingga 10^{-4} secara duplo menggunakan media PCA.
- Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 2 hari
- Dihitung jumlah koloni yang tumbuh dan dilaporkan sebagai jumlah koloni mikroorganisme per gram agar-agar.

1. Uji filamen kapang

- Gelas obyek Howard dibersihkan dengan alkohol, dikeringkan sehingga jika dilihat dibawah mikroskop menggunakan gelas penutup (cover glass) terlihat adanya cincin Newton.

- b. Gelas obyek dibuka, dengan jarum ose contoh diambil dan disebarakan diatas gelas obyek Howard. Ketebalan contoh dibawah gels penutup adalah 0.01 mm.
- c. Dilakukan pengamatan, dengan pembesaran seratus kali, dan diatur sedemikian rupa sehingga setiap bidang pandang mencakup luas 1.5 mm^2 . Jika pengaturannya tepat, jumlah yang dianalisa perbidang pandang adalah 0.15 mm^3 (tepatnya 0.15386 mm^3).
- d. Dari gelas obyek yang mengandung contoh yang sama, amati sebanyak minimal 25 bidang pandang.
- e. Bidang pandang yang dinyatakan positif, jika terlihat filamen kapang dengan ketentuan sebagai berikut :
 - Ada filamen kapang dan panjang lebih dari satu per enam diameter bidang pandang.
 - Gabungan dua-tiga filamen kapang melebihi satu per enam diameter bidang pandang.
- f. Dari jumlah bidang pandang yang positif, dapat dihitung persen bidang pandang positif dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{bidang pandang positif} = \frac{\text{jumlah bidang pandang positif}}{\text{Jumlah bidang pandang yang diamati}} \times 100\%$$

3. Total kapang-khamir

- a. Dilakukan pengenceran dari agar hingga 10^{-4}
- b. Pemupukan dilakukan dari pengenceran 10^{-2} hingga 10^{-4} (duplo) menggunakan media APDA
- c. Semua cawan petri diinkubasikan pada suhu 30°C selama 2 hari
- d. Dihitung jumlah koloni yang tumbuh dan dinyatakan dalam jumlah koloni per ml agar.

(4) Pangan laut

- a. Batang pengoles steril dioleskan pada permukaan daging/ikan seluas misalnya 3 cm x 4 cm, batang pengoles tersebut kemudian dimasukkan ke dalam 10 ml larutan pengencer, ditekan-tekan dan digoyangkan hingga semua mikroba yang menempel pada batang pengoles tersuspensi dalam larutan pengencer.
- b. Dibuat pengenceran misalnya hingga 10^{-5} dan dilakukan pemupukan dari 10^{-3} hingga 10^{-5} (duplo) menggunakan media PCA (untuk total mikroba dan total mikroba psikrofilik) dan media VRBA untuk total koliform.
- c. Semua cawan petri diinkubasikan pada suhu 30°C selama 2 hari atau 35°C selama 2 hari untuk total koliform sedangkan untuk mikroba psikrofilik inkubasi pada suhu $7-10^{\circ}\text{C}$ selama 5-7 hari.
- d. Dihitung koloni yang tumbuh dan dinyatakan dalam jumlah koloni per gram contoh (cara perhitungannya dapat dilihat pada metode oles untuk sanitasi peralatan).

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1995. Standar Nasional Indonesia Kumpulan Standar Metode Pengujian Mutu Hasil Perikanan. Direktorat Jenderal Perikanan, Jakarta.
- Bucle, K.A., R.A. Edward, G.H. Fleet and M. Wooton. 1985. Ilmu Pangan (Hari Purnomo dan Adiono, Penerjemah). UI Press, Jakarta
- Jenie, B. S. L.. 1988. Sanitasi Dalam Industri Pangan. PAU IPB. Bogor.
- Komariah Tampubolon 2006. Keselamatan Kerja Di Laboratorium Biologis. Departemen Teknologi Hasil Perairan. FPIK, Bogor.
- Kusumaningrum, Harsi. dan Nurwitri Anjaya. 1999. Praktikum Sanitasi. Di dalam Kumpulan Materi Pelatihan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Pangan Bagi Staf Pengajar. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. DEPDIBUD, Jakarta.
- Pelczar, J.M., E.C.S. Chan and M.F. Pelczar. 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi (Ratna, S.H., Teja Imas, Sutarmi, T. dan Sri Lestari, A., Peneerjemah). UI-Press, Jakarta.
- Srikandi, Fardiaz. 1983. Keamanan Pangan, Jilid I, Bakteriologi. Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan. IPB, Bogor.
- Srikandi, Fardiaz. 1989. Mikrobiologi Pangan. PAU Pangan dan Gizi, IPB, Bogor.

Lampiran 1.**KOMPOSISI MEDIUM**

APT Agar	Ekstrak khamir	7.5 g
	Trypton	12.5 g
	Glukosa	10 g
	Natrium sitrat	5 g
	NaCl	5 g
	K₂HPO₄	5 g
	Mangan klorida	0.14 g
	Magnesium sulfat	0.8 g
	Ferrous sulfat	0.04 g
	Kompleks sorbitan monooleat	0.2 g
	Air	1 liter
	pH sebelum sterilisasi	7.0-7.2
Azide Dextrose Agar	Ekstrak sapi	4.5 g
	Tryptosa	10 g
	Glukosa	7.5 g
	NaCl	7.5 g
	Na-azide	0.2 g
	Agar	15 g
	Air	1 liter
Blood Agar	Infusi jantung sapi	500 g
	Tryptosa	10 g
	NaCl	5 g
	Agar	15 g
	Air	1 liter
	pH	7.0-7.2
	Setelah sterilisasi dan didinginkan sampai 45-50°C	
	tambahkan 5% defibrinated blood steril.	
Brain Heart Infusion Broth	Infusi otak sapi	200 g
	Infusi jantung sapi	250 g
	Pepton	10 g
	Dekstroza	2 g
	NaCl	5 g
	Na₂HPO₄	2.5 g
	Air	1 liter

	pH	7.4
Brilliant Green Agar	Pepton	10 g
	Ekstrak khamir	3 g
	Laktosa	10 g
	Sukrosa	10 g
	NaCl	5 g
	Agar	20 g
	Hijau brilliant	0.0125 g
	Merah fenol	0.08 g
	Air	1 liter
Brilliant Green Lactose Bile Broth (2%)	Pepton	0 g
	Laktosa	10 g
	Oxgall	20 g
	Hijau brilliant	0.0133 g
Dextrose Tryptone Bromcresol Purple Agar (Broth)	Tripton	2.5 g
	Glukosa	5 g
	Agar	15 g
	Bromcresol purple (ungu bromcresol)	0.04 g
	Air	1 liter
	pH	6.7
	Untuk broth, hilangkan agar	
Eosin Methylene Blue (EMB) Agar	Pepton	10 g
	Laktosa	5 g
	Sukrosa	5 g
	K ₂ HP0 ₄	2 g
	Agar	13.5 g
	Eosin-Y	0.4 g
	Methylene Blue	0.065 g
	Air	1 liter
Glucose Yeast Water . Yeast Water (double strength)	Glukosa	5 g
	Single Strength Yeast Water	1 liter
	Starch free yeast	200 g
	Air	1 liter
	Dididihkan selama 3 jam dan diotoklaf	
	Untuk single strength, encerkan dua	

	kali.	
Koser Citrate Medium	KH ₂ PO ₄	1 g
	Magnesium sulfat	0.2 g
	Na-amonium fosfat	1.5 g
	Na-sitrat	3 g
	Air	1 liter
	pH	6.8 g
Lactose Broth	Ekstrak sapi	3 g
	Pepton	5 g
	Laktosa	5 g
	Air	1 liter
	pH	6.7
Litmus Milk	Skim milk	100 g
	Litmus	0.75 g
	Air	1 liter
MacConkey Agar	Pepton	17 g
	Proteose Pepton	3 g
	Laktosa	10 g
	Bile Salts No.3	1.5 g
	NaCl	5 g
	Agar	13.5 g
	Neutral Red	0.03 g
	Kristal violet	0.001 g
	Air	1 liter
Malt Agar	Ekstrak malt	30 g
	Glukosa	16 g
	Agar	15 g
	Air	1 liter
	Cairkan dan asam dengan larutan asam laktat sampai pH 3.5	
Nutrient Broth (Agar)	Ekstrak sapi	3 g
	Pepton	5 g
	Air	1 liter

NA + 1% fat Plate Count Agar	Agar	15 g
	Margarin	10 g (+neutral red)
	Trypton	5 g
	Ekstrak khamir	2.5 g
	Glukosa	1 g
	Agar	15 g
	Air	1 liter
Potato Dextrose Agar, Acidified	Potato infusion	200 ml
	Glukosa	5 g
	Agar	5 g
	Air	800 ml
	Diatur pHnya menjadi pH 3,5-4,0 dengan larutan 10% asam tartarat	
Proteose Broth (Medium MR-VP)	Poliipepton	7 g
	Glukosa	5 g
	K ₂ HP0 ₄	5 g
	Air	1 liter
	pH	6.9
Salmonella-Shigella (S-S) Agar	Ekstrak sapi	5 g
	Proteose Pepton	5 g
	Laktosa	10 g
	Bile Salts No.3	8.5 g
	Na-sitrat	8.5 g
	Na-thiosulfat	8.5 g
	Ferric sitrat	1 g
	Agar	13.5 g
	Brilliant Green	0.00033 g
	Neutral Red	0.025 g
	Air	1 liter
Selenite Cystine Broth	Trypton	5 g
	Laktosa	4 g
	Na ₂ HPO ₄	10 g
	Na -acid selenite	4 g
	L-cystine	0.01 g
	Air	1 liter
	pH	7.0

Skim Milk Agar	Plate Count Agar + 2% skim milk (20 g skim milk dalam 1 liter PCA)	
Staphylococcus Medium 110	Ekstrak khamir	2.5 g
	Trypton	10 g
	Gelatin	30 g
	Laktosa	2 g
	Mannitol	10 g
	NaCl	75 g
	K ₂ HPO ₄	5 g
	Agar	15 g
	Air	1 liter
Starch Agar	Trypton	10 g
	Ekstrak khamir	10 g
	K ₂ HPO ₄	5 g
	Soluble starch	3 g
	Agar	15 g
	Air	1 liter
Sugar Broth	Nutrient broth	1 liter
	Gula : Glukosa/Sukrosa/Laktosa	5 g
	Brom cresol Purple	0.04 g
	K ₂ HPO ₄	5 g
Triple Sugar Iron (TSI) Agar	Poliipepton	20 g
	Laktosa	10 g
	Sukrosa	10 g
	Glukosa	10 g
	NaCl	5 g
	Ferrous amonium sulfat	0.2 g
	Na-thiosulfat	0.2 g
	Phenol Red	0.025 g
	Agar	12 g
	Air	1 liter
	pH	7.4
Trypticase Soy Agar/Broth	Tryticase (trytone)	17 g
	Phyton (soytone)	3 g
	Glukosa	2.5g
	Agar	12 g
	Air	1 liter
	Untuk Broth, hilangkan agar dan	

tambahkan 2.5 g K_2HPO_4 perliter

Thioglycolate Medium	Infusi daging sapi	500 g
	Pepton	10 g
	Dekstrosa	5 g
	K_2HPO_4	2 g
	NaCl	5 g
	Na-thioglycolate	0.5 g
	Agar	0.5 g
	Biru metilen	0.002 g
	Air	1 liter
Sulfite Agar	Trypton	10 g
	Na-sulfit (Na_2SO_3)	1 g
	Ferriesitrat	0.59 g
	Agar	20 g
	Air	1 liter
Violet Red Bile Agar	Ekstrak khamir	3 g
	Pepton	7 g
	Garam bile No.3	1.5 g
	Laktosa	10 g
	NaCl	5 g
	Agar	15 g
	Merah netral (neutral red)	0.03 g
	Violet kristal (crystal violet)	0.002 g
Vogel-Johnson Agar	Trypton	10 g
	Ekstrak khamir	5 g
	Mannitol	10 g
	K_2HPO_4	5 g
	LiCl	5 g
	Glisin	10 g
	Agar	15 g
	Merah fenol (phenol red)	0.025 g
	Air	1 liter

LAMPIRAN 2.

Komposisi Larutan Pengencer

Larutan Bufer Fosfat	:	
Larutan stok	:	KH_2PO_4 34 g Air 500 ml Atur pH nya sampai pH 7,2 Tambahkan air sampai 1 liter
Larutan Pengencer	:	Larutan stok 1,25 ml Tambahkan air sampai 12 liter
Larutan garam fisiologis	:	NaCl 8,5 gr Air 1 liter
Larutan Pengencer + pasir	:	Tambahkan 10 g pasir quartz ke dalam 90 ml atau 99 ml larutan pengencer sebelum sterilisasi
Larutan pengencer + butir gelas	:	Tambahkan satu sendok teh butir gelas ke dalam 90 ml atau 99 ml larutan pengencer sebelum sterilisasi

Lampiran 3.

Komposisi Larutan Pewarna

Alfa-naftol	5 % alfa-naftol di dalam 95 % etil alkohol	
Larutan pewarna Gram		
- Larutan amonium oksalat kristal violet	Kristal violet (90 %)	2 g
Larutan A	Etanol 95 %	20 ml
Larutan B	Amonium oksalat	0,8 g
Campurkan larutan A dan B	Air	80 ml
- Larutan Gram Iodine	Iodine (yodium)	
	KJ	1 g
	Air	2 g
		300 ml
- Larutan Safaranin (counterstain)	Safranin 0 (2,5 % di dalam etanol 95%)	10 ml
	Air	100 ml
Pereaksi Kovacs	p-Dimetilaminobenzaldehida	
	Amil Alkohol	5 g
	HCl pekat	75 ml
Malachite Green		25 g
	Larutan 5 % malachite green oksalat di dalam air	
Methylene Blue (untuk uji MBRT)	Air sebanyak 202 ml direbus hingga mendidih. Kemudian ditambahkan 1 tablet methylene blue thiocyanat. Perebusan dilakukan di dalam wadah tertutup	
Methylene Blue (berwarna)	Kristal Biru metilen	1 g
	Air	100 ml
Larutan Methyl Red	0,1% methyl red (bubuk) dan 300 ml etanol 95 % dilarutkan di dalam air sampai 500 ml	