

PENGUJIAN AKURASI BAKTERI *E. coli* DENGAN METODA MPN DAN *PETRIFILM*

Sri Unon Purwati⁽¹⁾, Efa Deswarni⁽¹⁾, Oktaria Diah Pitalokasari⁽¹⁾

ABSTRACT

The analytical of accuracy is important for quality control process in the laboratory. The analytical data accuracy for sampel *Echerichia coli* (*E. coli*) bacteria can be processed by confirmation of reference *E. coli* positive culture. Test for accuracy covered morphology and physiological test. The morphology tests of *E. coli* bacteria resulted rod-shape, negative (-) for gram and no spore. The physiology test of *E. coli* bacteria gave positive characteristic for glucose fermentation (lactose, KIA), oxidize reaction (BGLB, EC, H₂O₂), H₂S productivity reaction (SIM, KIA) and metabolite metallic form reaction from Lactose fermentation (EMB).

Keywords; *E. coli* bacteria, analytical of accuracy, MPN and Petrifilm method

PENDAHULUAN

Pengujian kualitas lingkungan mikrobiologis air yang utama ditujukan pada keberadaan bakteri koliform terutama *Echerichia coli*. Jenis bakteri tersebut telah ditetapkan sebagai representatif pencemaran biologis suatu lingkungan perairan⁽¹⁾,

Analisis jumlah bakteri *E. coli* dapat dilakukan dengan metoda Jumlah Perkiraan Terbesar (JPT) yang dikenal sebagai *Most Probable Number* (MPN) atau menggunakan *Petrifilm*. Sebagai jaminan mutu hasil analisis kedua metoda tersebut butuh data akurat atau konfirmasi (+) yang cukup tinggi terhadap material rujukan. Maksud uji akurasi adalah untuk mengkonfirmasi ketepatan identitas target analisis (konfirmasi positif) dari bakteri *E. coli* dalam proses analisis baik MPN maupun *Petrifilm*. Uji akurasi menggunakan kontrol kultur positif *E. coli* sebagai kultur rujukan⁽²⁾.

Uji akurasi sangat bermanfaat sebagai bukti proses jaminan mutu terhadap data laboratorium. Pelaksanaan uji akurasi secara berkala penting bagi laboratorium penguji.

⁽¹⁾Laboratorium Biologi, Pusat Sarana Pengendalian Dampak Lingkungan - Deputi VII - KLH, Kawasan PUSPIPTEK Gedung 210, Jln. Raya PUSPIPTEK, Serpong - Tangerang BANTEN, 15310 - INDONESIA Phone/Fax. : 021-7560983 E-mail : unon22@yahoo.com

METODOLOGI

Uji akurasi dimaksudkan untuk mengkonfirmasi ketepatan identitas target analisis (konfirmasi positif) bakteri *E. coli* dalam proses analisis, baik MPN maupun *Petrifilm*. Uji akurasi meliputi tahapan-tahapan seperti tercantum dalam diagram Gambar 1. Uji akurasi menggunakan kontrol kultur positif *E. coli* sebagai kultur rujukan⁽¹⁾. Karakteristik kontrol mutu positif yang digunakan, tertera pada Tabel 1.

Perlakuan berupa uji morfologi dan uji fisiologi

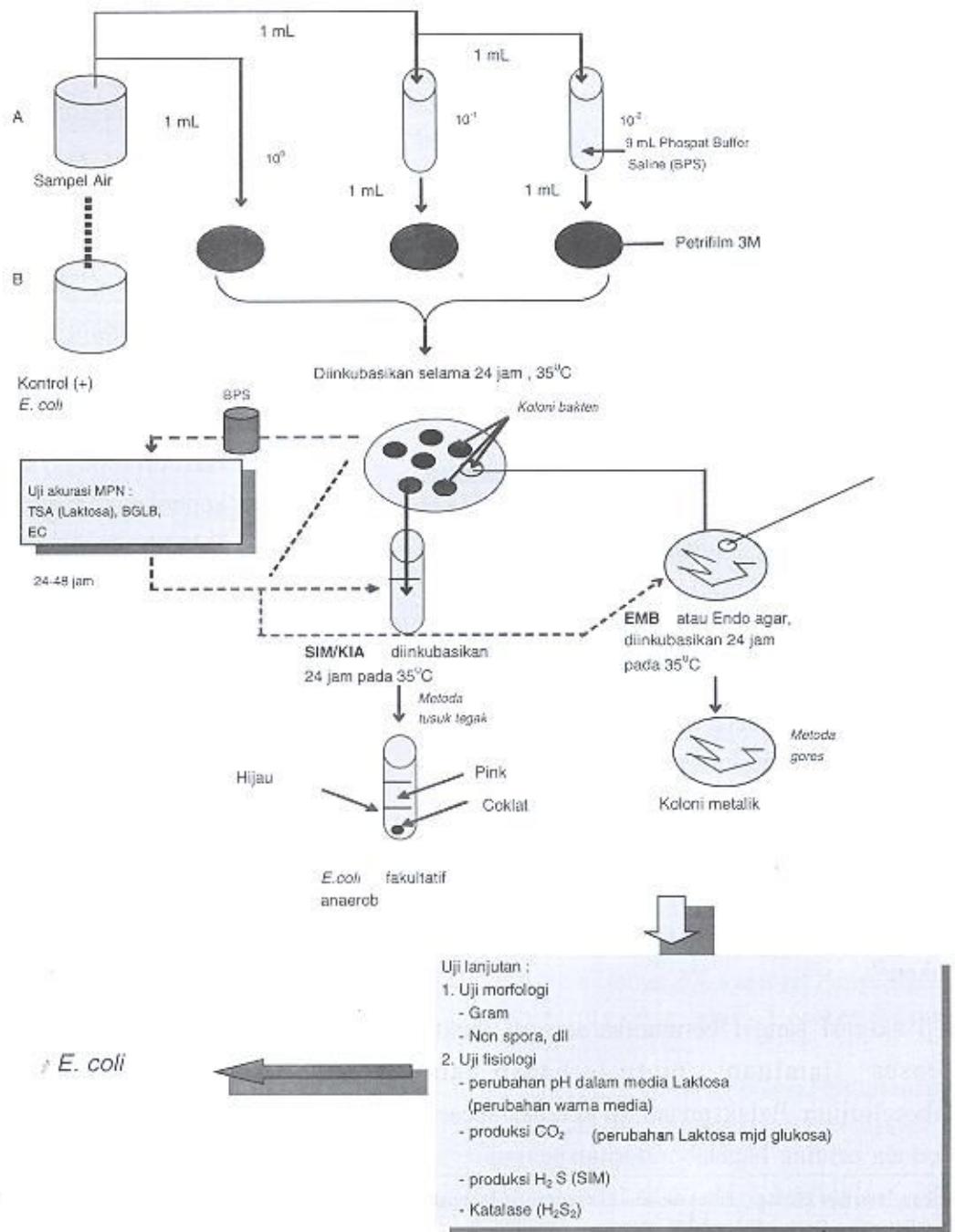
Tabel 1 : Karakteristik kontrol kultur positif *E. coli*

Kode	: <i>E. coli</i> JM109	
Asal	: Lab. Genetik Mikrobiologi -LIPI-Promega	
Umur	: 24 jam kultur dalam Luria Bertain Medium	
<u>Karakteristik Morfologi</u>		
Batang, Gram -, Tidak berspora		
<u>Karakteristik</u>	<u>Reaksi</u>	
<u>Fisiologi</u>		
Lac.	+	
Glu	+	
Manosa	+	
Amp	+	
Resisten	+	
MUG	+	
Col	+	
Pgem Cr	-	
Cat	++ - -	
H2S		
IMVIC		

adalah untuk konfirmasi dilakukan berdasarkan *Standar Method for The Examination of Water and Wastewater* edisi ke 21 tahun 2005, meliputi: Uji morfologi dilakukan dengan melihat bentuk sel, pembentukan spora, reaksi pengecatan gram; dan Uji fisiologi dilakukan dengan melihat reaksi oksidasi (BGLB, EC, H₂O₂), fermentasi gula (Laktosa, KIA), produksi

H₂S (SIM, KIA), reaksi pembentukan metabolit metalik dari fermentasi laktosa (EMB). Keterangan singkatan media lihat pada Tabel 4.

Data awal kontrol mutu dilakukan dengan cara melakukan pencatatan terhadap kontrol kultur dan contoh uji yang akan digunakan. Data meliputi jenis, volume dan label (Tabel 2).



Gambar 1 : Tahapan kerja uji akurasi metode MPN dan Petrifilm

Tabel 2 : Kode, jenis contoh, tanggal mulai uji, volume contoh, pengenceran dan kontrol mutu pada kegiatan tahap awal uji akurasi metode MPN dan *Petrifilm*

No	Kode	Jenis contoh	Tgl. Analisis	Vol. contoh	Pengenceran			QC			
					10^0	10^{-1}	10^{-2}	Duplo	BL	Steril	Laminar Flow/ aseptik
1.	A	kontrol <i>E. coli</i> (+)	3 Feb. 2008	100 μ L	10^0	10^{-1}	10^{-2}	Duplo	BL	Steril	Laminar Flow/ aseptik
2.	B	kontrol T-Koliform (+)	3 Feb. 2008	100 μ L	10^0	10^{-1}	10^{-2}	Duplo	BL	Steril	Laminar Flow/ aseptik
3.	C	Air sumur	3 Feb. 2008	1 mL	10^0	10^{-1}	10^{-2}	Duplo	BL	Steril	Laminar Flow/ aseptik

Catatan :

Jenis Blangko (BL) 1 = Kontrol sampel (air steril), 2 = Kontrol pelarut (lar. Fisiologis)

Kode contoh A,B,C = 1,2,3

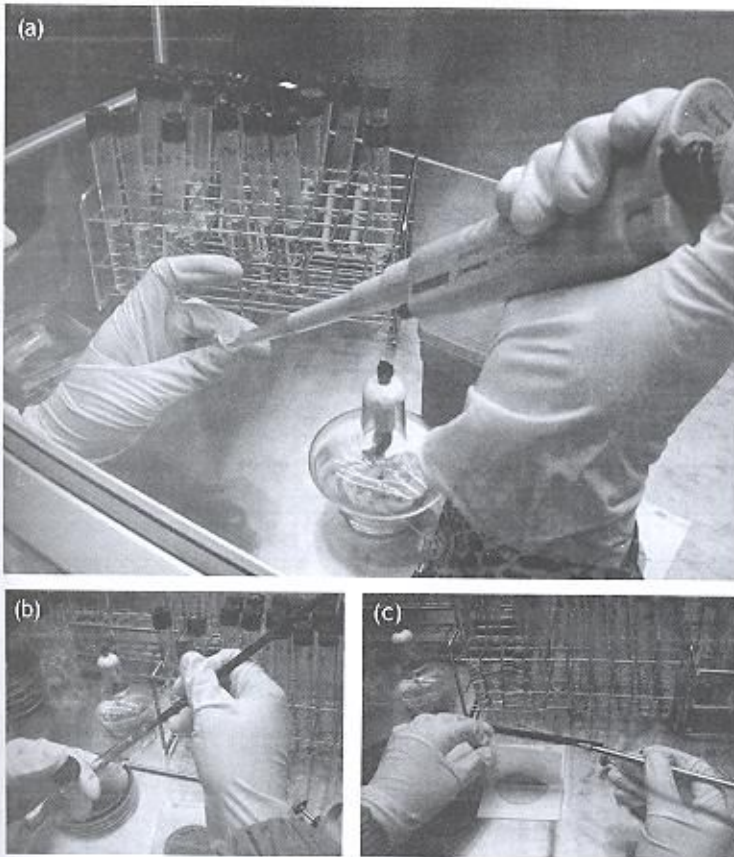
Umur kontrol (+) = 36 jam

Contoh uji diambil dari sumur gali di Perumahan Puri Husada Agung

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dua puluh empat jam setelah industri tahap selanjutnya dilakukan pengamatan jumlah *E.coli* maupun total koliform. Target uji adalah konfirmasi jenis koliform atau *E. coli* dari sejumlah koloni yang tumbuh pada media uji

(Tabel 2). Dari sejumlah koloni positif tersebut kemudian dipilih delapan (8) koloni sebagai bahan uji konfirmasi identitas. Tahapan praktek penggunaan *E. coli* di laboratorium disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2 : Tahapan proses pengujian *E.coli* di laboratorium

Keterangan Gambar 2 :

- Pengambilan kultur control positif *E. coli* secara aseptis dalam ruangan laminar flow.
- Inokulasi koloni bakteri *E.coli* dalam media SIM
- Pengambilan koloni bakteri secara aseptis dalam laminar flow

Tabel 3 : Penghitungan jumlah *E.coli* dan total koliform pada uji akurasi

No.	Kode contoh	Pengenceran	Jumlah <i>E. coli</i> (24 jam)		Jumlah Total Koliform (48 jam kecuali C)	
			Jumlah /mL	Jumlah /100 mL	Jumlah /mL	Jumlah /100 mL
1	BL1 (Buffer)	-	0	0	0	0
	BL2 (Buffer)	-	0	0	0	0
2	BL1 (Media)	-	0	0	0	0
	BL2 (Media)	-	0	0	0	0
3	A (Kontrol Total Koliform)	10 ⁰	> 300	>30000	> 300	>30000
			> 300	>30000	> 300	>30000
	1-Oct	> 300	>30000	36	3600	
		> 300	>30000	90	9000	
	2-Oct	164	16400	0	0	
		164	16400	5	500	
4	B (Kontrol <i>E. coli</i>)	10 ⁰	> 300	>30000	> 300	>30000
			> 300	>30000	> 300	>30000
	1-Oct	> 300	>30000	0	0	
		> 300	>30000	0	0	
	2-Oct	59	5900	0	0	
		53	5300	4	400	
5	C (Air Sumur)	10 ⁰	114	11400	>300	>30000
			100	10000	>300	>30000
	1-Oct	3	300	115	11500	
		2	200	113	11300	
	2-Oct	1	100	7	700	
		1	100	13	1300	

Keterangan : BL : Blangko

Contoh perhitungan *E. coli* tersaji pada pada Tabel 3. Data hasil pengamatan uji konfirmasi metoda MPN dan *Petrifilm* disajikan pada Tabel 4 dan 5, menunjukkan bahwa isolat koloni yang diuji adalah koliform dan secara khusus teridentifikasi sebagai *E.coli*. Identifikasi

dilakukan berdasarkan *Standard Method for The Examination of Water and Wastewater* edisi 21 tahun 2005 bagian 9000 dan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* edisi 9 tahun 1994 tabel 5.2 hal 203-222.

Tabel 4 : Hasil uji konfirmasi metoda *Petrifilm* ^{(1) (2)}

Kode	UJI MORFOLOGI	REAKSI UJI FISILOGI						
	Bentuk sel	EMB	SIM	BGLB	EC	Katalase	KIA	GRAM
A1	Batang tidak berspora	+	-	+	+	+ (gl gas)		-
A2	Batang tidak berspora	+	-	+	+	+ (gl gas)		-
A3	Batang tidak berspora	+	-	+	+	+ (gl gas)		-
A4	Batang tidak berspora	+	-	+	+	+ (gl gas)		-
A5	Batang tidak berspora	+	-	+	+	+ (gl gas)		-
A6	Batang tidak berspora	+	-	+	+	+ (gl gas)		-
A7	Batang tidak berspora	+	-	+	+	+ (gl gas)		-
A8	Batang tidak berspora	+	-	+	+	+ (gl gas)		-
B1	Batang tidak berspora	+	-	+	+	+ (gl gas)		-
B2	Batang tidak berspora	+	-	+	+	+ (gl gas)		-
B3	Batang tidak berspora	+	-	+	+	+ (gl gas)		-
B4	Batang tidak berspora	+	-	+	+	+ (gl gas)		-
B5	Batang tidak berspora	Mati	-	+	+	+ (gl gas)		-
B6	Batang tidak berspora	+	-	+	+	+ (gl gas)		-
B7	Batang tidak berspora	+	-	+	+	+ (gl gas)		-
B8	Batang tidak berspora	+	-	+	+	+ (gl gas)		-
C1	Batang tidak berspora	+ metalik	+ hitam	+	+	+ (gl gas)		-
C2	Batang tidak berspora	+ metalik	-	+	+	+ (gl gas)		-
C3	Batang tidak berspora	+ metalik	-	+	+	+ (gl gas)		-
C4	Batang tidak berspora	+	-	+	+	+ (gl gas)		-
C5	Batang tidak berspora	+	-	+	+	+ (gl gas)		-
C6	Batang tidak berspora	Mati	-	+	+	+ (gl gas)		-
C7	Batang tidak berspora	+	-	+	+	+ (gl gas)		-
C8	Batang tidak berspora	+	-	+	+	+ (gl gas)		-
CM1	Batang tidak berspora	+		+	+	+ (gl gas)	+ (TDK MERAH)	-
CM2	Batang tidak berspora	+		+	+	+ (gl gas)	+ (TDK MERAH)	-
CM3	Batang tidak berspora	+		+	+	+ (gl gas)	+ (TDK MERAH)	-
CM4	Batang tidak berspora	+		+	+	+ (gl gas)	+ (TDK MERAH)	-
CM5	Batang tidak berspora	+		+	+	+ (gl gas)	+ (TDK MERAH)	-
CB	Batang tidak berspora	+ metalik		+	+		+ (TDK MERAH)	-

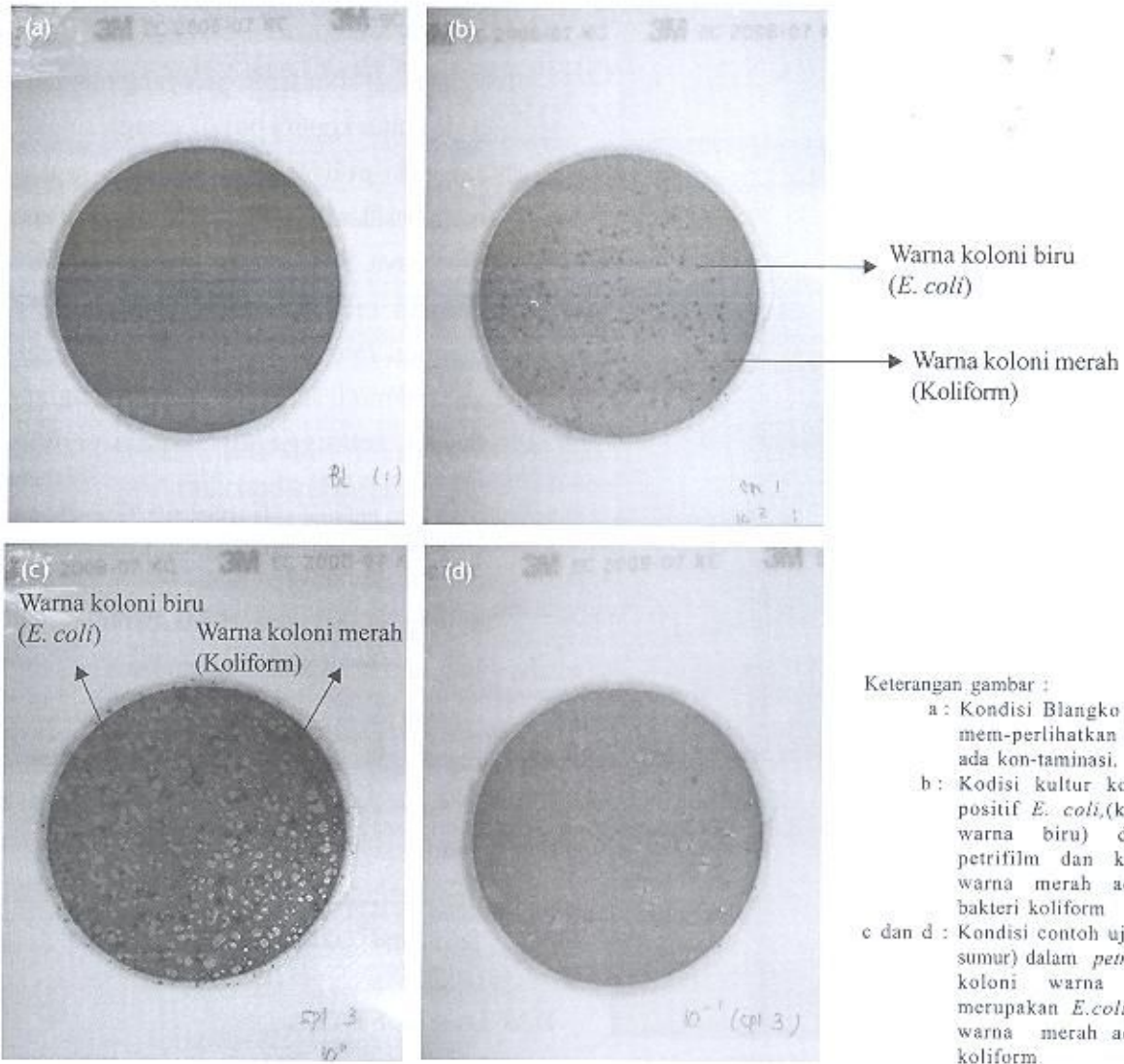
Keterangan :

- A = Kontrol kultur Koliform Blangko 1 = - (negatif) EC : *Echerichia coli*
- B = Kontrol kultur *E. coli* Blangko 2 = - (negatif)
- C = Air sumur EMB : *Eosin Metilen Blue*
- CM = Koloni merah SIM : *Salmonella Iron Media*
- CB = Koloni biru BGLB : *Briliant Green Bile Broth*

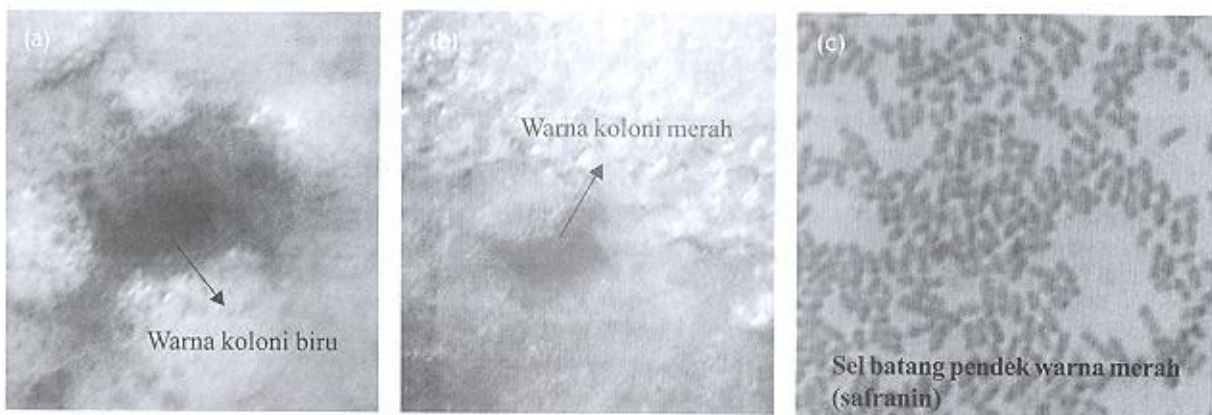
Tabel 5 : Hasil uji konfirmasi metoda MPN ⁽³⁾

Kode	UJI MORFOLOGI Bentuk sel	REAKSI UJI FISILOGI							
		Reaksi oksidasi		EMB	SIM	Katalase		KIA	GRAM
		BGLB	EC			BGLB	EC		
A1	Batang tdk berspora	+	+	+		+	+		-
A1	Batang tdk berspora	+	+	+		+	+		-
A2	Batang tdk berspora	+	+	+		+	+		-
A3	Batang tdk berspora	+	+	+		+	+		-
A4	Batang tdk berspora	+	+	+		+	+		-
A5	Batang tdk berspora	+	+	+		+	+		-
A6	Batang tdk berspora	+	+	+		+	+		-
A7	Batang tdk berspora	+	+	+		+	+		-
A8	Batang tdk berspora	+	+	+		+	+		-
B1	Batang tdk berspora	+	+	+		+	+		-
B2	Batang tdk berspora	+	+	+		+	+		-
B3	Batang tdk berspora	+	+	+		+	+		-
B4	Batang tdk berspora	+	+	+		+	+		-
B5	Batang tdk berspora	+	+	+		+	+		-
B6	Batang tdk berspora	+	+	+		+	+		-
B7	Batang tdk berspora	-	-	+		+	+		-
B8	Batang tdk berspora	+	+	+		+	+		-
C1	Batang tdk berspora	+	+	++; metalik	-	+	+	+	-
C2	Batang tdk berspora	+	+	++; metalik		+	+		-
C3	Batang tdk berspora	+	+	+		+	+		-
C4	Batang tdk berspora	+	+	+		+	+		-
C5	Batang tdk berspora	+	+	++; metalik		+	+		-
C6	Batang tdk berspora	+	+	++; metalik		+	+		-
C7	Batang tdk berspora	-	-	+		-	-		-
C8	Batang tdk berspora	+	+	+		+	+		-
CM1	Batang tdk berspora	+	+			+	+		-
CM2	Batang tdk berspora	+	+			+	+		-
CM3	Batang tdk berspora	+	+			+	+		-
CM4	Batang tdk berspora	+	+	+		+	+		-
CM5	Batang tdk berspora	+	+			+	+		-
CB	Batang tdk berspora	+	+	+		+	+		-

Keterangan :
Sama seperti pada Tabel 4

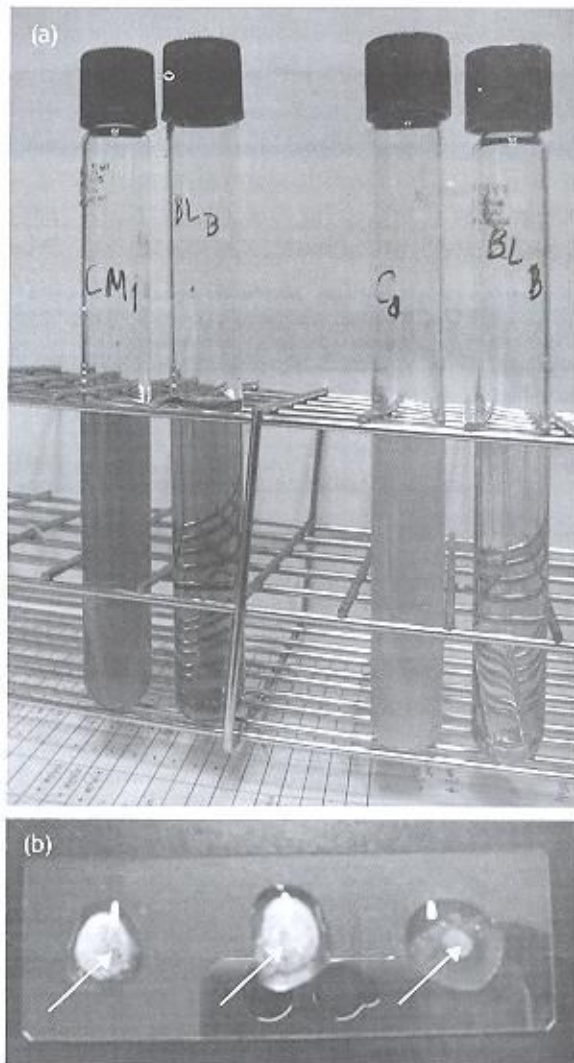


Gambar 3 : Hasil pengamatan koloni *E. coli* pada Petrifilm



Gambar 4 : Koloni *E. coli* (biru) dan koliform (merah) perbesaran 1000 kali dan hasil pengecatan gram (-) *E.coli*

Keterangan gambar :
 a : Koloni Bakteri *E. Coli* (Biru) yang diperbesar di bawah mikroskop sterio.
 b : Koloni Bakteri Koliform (merah) yang diperbesar di bawah mikroskop sterio.
 c : Bentuk sel *E. coli* yang diperbesar 1000 kali, bentuk batang, gram negatif, tidak berspora.



Gambar 5 : Hasil pengamatan uji BGLB, EC dan H₂O₂

Keterangan gambar :

- a : Uji fisiologi (reaksi oksidasi dan reduksi gula) dalam dia BGLB dan EC. Perubahan pada warna dan menghasilkan gas dalam tabung Durham.
- b : Uji katalase dengan penambahan H₂O₂ pada cuplikan koloni menghasilkan gelembung gas O₂. Tanda panah menunjukkan gelembung yang dimaksud.

KESIMPULAN

1. Pengujian akurasi *E. coli* yang mengacu pada kultur kontrol positif sebagai rujukan sangat penting dilakukan untuk menghasilkan data yang validitasnya dapat dipercaya. Pada pengujian bakteri *E. coli* dengan menggunakan metoda MPN maupun *Petrifilm* data presisi sebagai kontrol mutu suatu laboratorium kurang cukup, sehingga uji akurasi penting dilakukan secara berkala.
2. Uji akurasi menghasilkan bakteri *E. coli* dengan karakteristik morfologi bentuk batang, gram (-) dan tidak berspora. Uji fisiologi menghasilkan bakteri *E. coli* dengan karakteristik positif terhadap reaksi fermentasi gula (laktosa, KIA), reaksi oksidasi (BGLB, EC, H₂O₂), reaksi produksi H₂S (SIM, KIA) dan reaksi pembentukan metabolit metalik dari fermentasi laktosa (EMB).

DAFTAR PUSTAKA

- (1) J. Bartram, and Balance, R, 1996, *Water Quality Monitoring*, First Edition, Hal. 237
- (2) Bergey's, 1994. *Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth edition, Tabel 5.2 hal 203-222.
- (3) Standar Method for The Examination of Water and Wastewater. Edisi 21. APHAAWWA. 2005 page, 9000.