

## LAMPIRAN

**Lampiran 1. Tabel APM**

Tabung positif			APM/g	Tk. Kepercayaan		Tabung positif			APM/g	Tk. Kepercayaan	
0.1	0.01	0.001		Bawah	Atas	0.1	0.01	0.001		Bawah	Atas
0	0	0	<3.0	-	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	

SUMBER Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual, Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions, October 2010

Sumber : (Badan Standarisasi Nasional, 2015)

**Lampiran 2. Tabel persyaratan mutu *E. coli* pada produk perikanan**

Jenis Produk Perikanan	n	c	Batas mikroba yang diperbolehkan	Batas maksimum mikroba
Ikan air tawar, ikan air laut scromboid, dan ikan air laut finfish	5	2	1 APM/gram	10 APM/gram
Krustasea, moluska laut, dan kerang	5	2	1 APM/gram	10 APM/gram
Semua jenis ikan dan krustase berlapis tepung yang dibekukan	5	2	1 APM/gram	10 APM/gram
Hancuran dan sari ikan yang dibekukan	5	2	1 APM/gram	10 APM/gram
Produk perikanan yang difermentasi	5	2	1 APM/gram	10 APM/gram
Produk perikanan yang diolah menjadi pickel dan atau direndam dalam larutan garam	5	2	1 APM/gram	10 APM/gram
Telur ikan kaviar yang dibekukan	5	2	1 APM/gram	10 APM/gram
Produk perikanan semi awet	5	1	3 APM/gram atau 0,3 APM/ gram	3,6 APM/gram

n : jumlah sampel yang dianalisis

c : jumlah sampel yang diperbolehkan melebihi batas mikroba yang diperbolehkan

Sumber : (BPOM, 2019a)

### Lampiran 3. SNI 2332.1-2015 tentang Cara Uji Mikrobiologi - Bagian 1 : Penentuan koliform dan *Escherichia coli* pada produk perikanan

SNI 2332.1:2015

**2.8 metode angka paling mungkin/APM**  
metode untuk menghitung jumlah mikroba dengan menggunakan media cair dalam tabung reaksi; pada umumnya setiap pengenceran 3 seri atau 5 seri tabung dan perhitungan yang dilakukan merupakan tabung pengenceran secara statistik

**2.9 produk perikanan**  
ikan termasuk boba perikanan lainnya yang dipanggang dan/atau diolah untuk dijadikan produk akhir, umumnya berupa ikan segar, ikan beku dan ikan lainnya yang digunakan untuk konsumsi manusia

**2.10 koloni terduga (suspected colonies)**  
koloni-akasi pada media agar selektif yang memberikan karakteristik *E.coli*, yang harus dikonfirmasi untuk meyakinkan benar-benarnya *E.coli*

**3 Prinsip**  
Menumbuhkan bakteri dalam tabung pengenceran seri dan perhitungan dilakukan sesuai tabel APM berdasarkan jumlah tabung yang positif setelah diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu.

**4 Peralatan**  
- wadiah berutup dengan inkubasi 45,5 °C ± 0,2 °C\*  
- Inkubator 35 °C ± 1 °C\*  
- Senter (baterai per yang dapat dioperasikan atau baterai)  
- botol pengencer  
- tabung Durham  
- cawan Petri ukuran 15 mm x 90 mm  
- lampu UV dengan panjang gelombang 365 nm  
- tabung reaksi ukuran 16 mm x 150 mm dan 13 mm x 100 mm  
- timbangan dengan kapasitas ≥ 2 kg dan sensitifitas 0,1 g  
- mikroskop  
- pipet atau pipetor 1 mL, 5 mL, dan 10 mL  
- jarum Ose

**CATATAN** \* Suhu wadiah untuk pengujian sheffia adalah 44,5 °C ± 0,2 °C. Tinggi air harus lebih tinggi dari tinggi cairan yang ada dalam tabung yang akan diinkubasi.  
\* Suhu inkubator untuk pengujian sheffia adalah 35 °C ± 0,5 °C.

**5 Media dan reagen**  
- avialer green lactose bile (BGLB); 2% broth (B.1)  
- aury typtose broth (B.2)  
- EC broth (B.3)  
- Levine's eosin methylene blue (L-EMB) agar (B.4)  
- typtone (typtothase) broth (TB) (B.5)  
- MR-VP broth (B.6)  
- Simons Citrate Agar (B.7)  
- plate count agar (B.8)

© BSN 2015 2 dari 19

SNI 2332.1:2015

- lactose broth (B.9)
- LST-MUG Medium (B.10)
- EC-MUG Medium (B.11)
- larutan Buffer-fosfat phosphate buffer (C.1)
- larutan 0,5% pepton water (C.2)
- penamok Kovacs (C.3)
- penamok Voges-Proskauer (C.4)
- indikator methyl red (C.5)
- penamok pewarnaan Gram (C.6)

**CATATAN** Pembuatan media diuraikan dalam Lampiran B dan pembuatan penamok diuraikan dalam Lampiran C.

**6 Kondisi pengujian**  
Pengujian contoh sheffia menggunakan metode APM; seri tabung, sedangkan untuk produk perikanan lainnya menggunakan APM; atau 5 seri tabung.

**7 Penyajian contoh**  
Dengan mensterilkan bejana aseptik, contoh diambil secara acak dan dipotong kecil-kecil hingga berat masing-masing contoh yang akan diuji sesuai dengan ketentuan pada Tabel 1.

Contoh beku diinkubasi pada saat akan diuraikan dan pelatannya dibekukan selama 18 jam pada suhu sekitar 2 °C - 5 °C atau suhu 0 bawah 45 °C dan tidak lebih dari 10 mende.

**Tabel 1 - Berat contoh yang diambil yang akan diuji**

Berat contoh	Berat contoh yang akan diuji
< 1 kg atau 1 L	100 g atau 100 mL
1 kg atau 1 L - 4,5 kg atau 4,5 L	200 g atau 200 mL
> 4,5 kg atau 4,5 L	500 g atau 500 mL

**8 Prosedur**

**8.1 Persiapan pengujian**

- Untuk contoh dengan berat lebih kecil atau sama dengan 1 kg atau 1 L sampai dengan 4,5 kg atau 4,5 L timbang contoh padat sebanyak 25 g atau contoh cair sebanyak 25 mL dari contoh yang akan diuji, kemudian masukkan dalam wadah atau plastik steril dan tambahkan 225 mL larutan Buffer-fosfat phosphate buffer.
- Untuk contoh dengan berat lebih besar dari 4,5 kg atau 4,5 L timbang contoh padat sebanyak 50 g atau contoh cair sebanyak 50 mL, kemudian masukkan dalam wadah atau plastik steril dan tambahkan 450 mL larutan Buffer-fosfat phosphate buffer.
- Untuk sheffia, timbang 200 g cairan dan dinggus sheffia yang berat dari 10 - 12 sheffia. Masukkan dalam wadah atau plastik steril dan tambahkan 200 mL larutan buffered phosphate water dan 0,5% pepton water.
- Homogenkan selama 2 menit. Homogenasi ini merupakan lanjutan dengan pengenceran 10<sup>1</sup>.

© BSN 2015 3 dari 19

SNI 2332.1:2015

**8.2 Tahap pengujian**

**8.2.1 Uji APM untuk semua produk perikanan**

**8.2.1.1 Uji pengujian koliform (Presumptive coliform)**

**8.2.1.1.1 Uji pengujian koliform (Presumptive coliform) selain produk sheffia**

- Siapkan pengenceran 10<sup>1</sup> dengan cara melarutkan 1 mL larutan 10<sup>1</sup> ke dalam 9 mL larutan pengencer Buffer-fosfat phosphate buffer. Lakukan pengenceran selanjutnya sesuai dengan penjadwalan kepastian contoh. Pada setiap pengenceran dilakukan pengenceran minimal 23 kali.
- Pada setiap pengenceran pipet steril, sebanyak 1 mL, larutan dari setiap pengenceran ke dalam 3 atau 5 tabung aury typtose broth (B.2) yang berisi tabung Durham. Media lactose broth juga dapat digunakan.
- Inkubasi tabung-tabung tersebut pada suhu 35 °C ± 0,5 °C. Perhatikan gas yang terbentuk setelah inkubasi 24 jam ± 3 jam. Tabung positif ditandai dengan kekeruhan dan gas dalam tabung Durham. Inkubasikan kembali tabung-tabung negatif selama 24 jam dan catat hasilnya pada 48 jam ± 3 jam.
- Lakukan uji penegasan koliform untuk tabung-tabung positif.

**8.2.1.1.2 Uji pengujian koliform (presumptive coliform) untuk daging sheffia**

- Ka dalam 5 tabung yang berisi 10 mL lactose broth atau aury typtose broth dan tabung Durham, masukkan masing-masing 2 mL homogenat (setara dengan 1 g sheffia), 1 mL pengenceran homogenat 1:100 (setara dengan 0,01 g sheffia), dan 1 mL pengenceran homogenat 1:1000 (setara dengan 0,001 g sheffia). Pengenceran larutan mungkin diperlukan untuk mencairkan hasil uji yang tidak dapat terata.
- Inkubasi tabung-tabung tersebut pada suhu 35 °C ± 0,5 °C. Perhatikan gas yang terbentuk setelah inkubasi 24 jam ± 3 jam dan catat hasilnya. Tabung positif ditandai dengan kekeruhan dan gas dalam tabung Durham. Inkubasikan kembali tabung-tabung negatif selama 24 jam dan catat kembali hasilnya pada 48 jam ± 3 jam.
- Lakukan uji penegasan koliform untuk tabung-tabung positif.

**8.2.1.2 Uji pengujian koliform (confirmed coliform)**

- Inkubasikan tabung-tabung LTB yang positif ke tabung-tabung BGLB broth yang berisi tabung Durham dengan menggunakan jarum Ose. Inkubasi BGLB broth yang telah diinkubasi pada suhu 35 °C ± 0,5 °C. Periksa tabung-tabung BGLB yang menghasilkan gas selama 48 jam ± 3 jam pada suhu 35 °C ± 0,5 °C. Tabung positif ditandai dengan kekeruhan dan gas dalam tabung Durham.
- Tentukan nilai angka paling memungkinkan (APM) untuk koliform berdasarkan jumlah tabung-tabung BGLB yang positif dengan menggunakan Angka Paling Memungkinkan (APM). Nyatakan angka koliform sebagai "APM/g" untuk produk perikanan selain sheffia, dan "APM/100 g" untuk produk sheffia. Apabila pengujian menggunakan 3 seri tabung pengenceran gunakan tabel B.1 pada lampiran A dan apabila pengujian menggunakan 5 seri tabung pengenceran gunakan tabel C.1 pada Lampiran A.

**8.2.1.3 Uji pengujian *E.coli* (fecal coliform, presumptive *E.coli*)**

- Untuk produk perikanan selain sheffia, inkubasikan dan setiap tabung LTB yang positif ke tabung-tabung EC broth yang berisi tabung Durham dengan menggunakan jarum

© BSN 2015 4 dari 19

SNI 2332.1:2015

Ose. Inkubasi EC broth dalam wadiah berutup inkubasi selama 48 jam ± 2 jam pada suhu 45 °C ± 0,2 °C. Wadiah harus dalam keadaan bersih, air di dalamnya harus lebih tinggi dari tinggi cairan yang ada dalam tabung yang akan diinkubasi.

- Periksa tabung-tabung EC broth yang menghasilkan gas selama 24 jam ± 2 jam, jika negatif inkubasikan kembali dan periksa pada 48 jam ± 2 jam. Tabung positif ditandai dengan kekeruhan dan gas dalam tabung Durham.
- Untuk produk sheffia, inkubasikan dan setiap tabung LTB atau lactose broth yang positif ke tabung-tabung EC broth yang berisi tabung Durham dengan menggunakan jarum Ose. Inkubasi EC broth dalam wadiah berutup inkubasi selama 24 jam ± 2 jam pada suhu 44,5 °C ± 0,2 °C. Wadiah harus dalam keadaan bersih, air di dalamnya harus lebih tinggi dari tinggi cairan yang ada dalam tabung yang akan diinkubasi. Tabung positif ditandai dengan kekeruhan dan gas dalam tabung Durham.
- Tentukan nilai angka paling memungkinkan (APM) berdasarkan jumlah tabung-tabung EC yang positif dengan menggunakan Angka Paling Memungkinkan (APM). Nyatakan angka fecal koliform sebagai "APM/g" untuk produk perikanan selain sheffia, dan "APM/100 g" untuk produk sheffia. Apabila pengujian menggunakan 3 seri tabung pengenceran gunakan tabel A.2 pada Lampiran A dan apabila pengujian menggunakan 5 seri tabung pengenceran gunakan tabel A.3 pada Lampiran A.

**8.2.1.4 Uji penegasan *E.coli* (confirmed *E.coli*)**

- Dari tabung-tabung EC broth yang positif dengan menggunakan jarum Ose, pipet ke L-EMB agar inkubasi selama 18 - 24 jam pada suhu 35 °C ± 0,5 °C.
- Koloni *E. coli* terduga memberikan ciri yang khas, pipetlah yaitu hitam pada bagian tengah, putih dan dengan atau tanpa gigi mata.
- Amil kembali dengan 5 koloni typtose *E. coli* dari masing-masing cawan L-EMB dan gunakan ke media PCA nitrit dengan menggunakan jarum Ose. Inkubasi selama 18 jam - 24 jam pada suhu 35 °C ± 0,5 °C dan gunakan untuk pengujian selanjutnya.

**CATATAN** 1 dari 6 koloni yang terbentuk sebagai *E. coli* tidak untuk meyakinkan bahwa tabung EC positif, sehingga semua koloni tersebut tidak perlu uji.

**8.2.1.5 Uji morfologi**  
Lakukan uji morfologi menggunakan mikroskop dengan melakukan pewarnaan gram dari setiap koloni *E. coli* terduga. Bilan diambil dari PCA yang telah diinkubasi selama 24 jam (8.2.1.4.c). Semua kultur yang tampak sebagai Gram-negatif, berbentuk batang pendek harus dilakukan uji biokimia dan diinkubasi kembali ke dalam media LTB untuk memastikan terbentuknya gas.

**8.2.1.6 Uji Biokimia**

**8.2.1.6.1 Uji Indol**  
Inkubasikan 1 Ose dari PCA nitrit (8.2.1.4.c) ke dalam typtone broth dan inkubasi selama 24 jam ± 2 jam pada suhu 35 °C ± 0,5 °C. Uji indol dilakukan dengan menambahkan 0,2 mL ± 0,2 mL penamok Kovacs. Reaksi positif jika terbentuk cincin merah pada lapisan bagian atas media dan negatif bila terbentuk cincin warna kuning.

**8.2.1.6.2 Uji Voges Proskauer**  
Inkubasikan 1 Ose dari PCA nitrit ke dalam MRVP broth. Inkubasikan selama 48 jam ± 2 jam pada suhu 35 °C ± 0,5 °C. Pipetkan sebanyak 1 mL dari setiap MRVP broth yang tumbuh ke tabung reaksi ukuran 13 mm x 100 mm steril dan tambahkan 0,6 mL larutan

© BSN 2015 5 dari 19

SNI 2332.1:2015

alpha negatif dan 0,2 ml, 40% KOH, kocok, tambahkan sedikit kristal kereuh untuk mempermudah reaksi. Kocok kembali dan diamkan selama 2 jam. Reaksi positif jika terbentuk warna merah muda sampai merah dalam probu.

**c) Uji Methyl red**

Inokulasikan kembali MRVP broth di atas (8.2.1.5.b) selama 48 jam ± 2 jam pada suhu 35 °C ± 0,5 °C. Tambahkan 5 tetes indikator methyl red pada setiap MRVP. Reaksi positif jika terbentuk warna merah dan negatif jika terbentuk warna kuning.

**d) Uji nitrat**

Goreskan 1 Ose dari PCA miring (8.2.1.4.c) ke permukaan Simmon Citrate agar. Inokulasi selama 96 jam pada suhu 35 °C ± 0,5 °C. Reaksi positif jika terjadi pertumbuhan dan media berubah warna menjadi biru, reaksi negatif jika tidak ada pertumbuhan dan media tetap bening.

**e) Produksi gas dari laktosa**

Inokulasikan 1 Ose dari PCA miring (8.2.1.4.c) ke dalam LTB. Inokulasi selama 48 jam ± 2 jam pada suhu 35 °C ± 0,5 °C reaksi positif jika menghasilkan gas pada tabung Durham.

**CATATAN:** Sebagai alternatif dalam melakukan uji IMViC, gunakan APOR atau uji biokimia otomatis VITEK untuk mengidentifikasi organisme sebagai E. coli. Gunakan botol yang berasal dari PCA miring dan lakukan pengujian sesuai petunjuk manufaktur.

**f) Interpretasi hasil**

Berupa kultur yang (a) memfermentasi laktosa dan menghasilkan gas dalam 48 jam pada 35 °C, (b) memberikan Gram-negatif, berbentuk batang tanpa spora dan (c) uji IMViC memberikan pola ++ (biotype 1) or -- (biotype 2) diperkembangkan sebagai E. coli seperti yang tercantum pada tabel 2.

**Tabel 2 - Interpretasi hasil**

Kriteria	Biotype 1	Biotype 2
Gas pada tabung LTB	+	-
Indra	+	-
Methyl Red (MR)	+	-
Indra Prekursor (IP)	-	-
Sinar	-	+
Uji Morfologi	Gram negatif, bentuk batang pendek tidak berspora	Gram negatif, bentuk batang pendek tidak berspora

Tentukan nilai angka paling memungkinkan (APM) berdasarkan jumlah tabung tabung EC positif dari 3 pengenceran yang berturut-turut. Nyatakan E.coli sebagai "APMig" untuk produk perikanan segar, shellfish, dan "APM100 g" untuk produk shellfish.

**8.2.2 Metode Uji LST-MUG untuk pengujian E. coli pada produk perikanan dingin dan beku selain moluska bercangkang dua (bivalve)**

**8.2.2.1 Metode LST-MUG Assay didasarkan pada aktivitas enzim β-galactosidase (GUD) yang memecah substrat 4-methylumbelliferyl β-D-glucuronide (MUG) untuk melepaskan 4-methylumbelliferone (MU). Uji dipaparkan pada sinar UV dengan panjang gelombang 365**


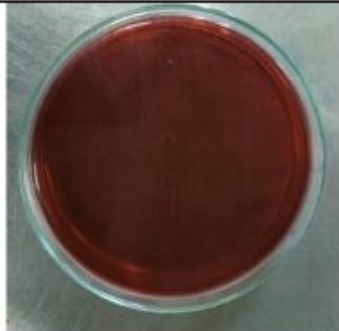
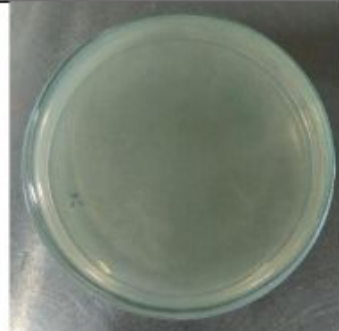


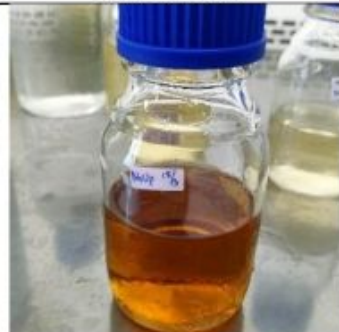





© BSN 2015 8 dari 19

## Lampiran 4. Dokumentasi penelitian





		
LAF	Neraca analitik	Tabung reaksi
		
Tabung Durham	Cawan petri	Mikrotip
		
Mikropipet	Ose	Bag filter
		
Sampel udang	Larutan BFP	Aquades

		
<i>Compact Dry</i>	Media L-EMB	Media TSA
		
Larutan media TB (uji indol)	Larutan media LB (uji produksi gas laktosa)	Larutan media MRVP (uji MRVP)
		
Media uji biokimia	Reagen Kovac (uji indol)	Reagen MR (uji MR)
		
Reagen VP (uji VP)		Larutan KOH 40% (uji VP)