

***MOST PROBABLE NUMBER (MPN) COLIFORM DENGAN VARIASI VOLUME  
MEDIA LACTOSE BROTH SINGLE STRENGTH (LBSS) DAN  
LACTOSE BROTH DOUBLE STRENGTH (LBDS)***

**Yunan Jiwintarum, Agrijanti, Baiq Lilis Septiana**

**Abstrak:** *Most Probable Number (MPN)* merupakan uji yang mendeteksi sifat fermentatif *Coliform* dalam sampel. Uji MPN terdiri dari tiga tahap, yaitu uji pendugaan (*presumptive test*), uji konfirmasi (*confirmed test*), dan uji kelengkapan (*completed test*). Masing – masing uji tersebut menggunakan media LBSS, LBDS dan BGLB dengan volume antara 5 ml – 10 ml. Adanya variasi volume media ini apakah akan mempengaruhi nilai positivities dan nilai MPN dari *Coliform* merupakan permasalahan yang dijawab dalam penelitian ini. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya pengaruh variasi volume media terhadap hasil uji hitung bakteri *Coliform* metode MPN ragam 5 1 1. Volume media yang divariasikan adalah media LBSS dan LBDS dengan variasi volume 4 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen di laboratorium. sampel yang digunakan adalah dari suspensi bakteri *Escherichia coli* yang setara dengan standar 0,5 Mc. Farland dan diencerkan 1000 ml dengan aquadest steril, data hasil berupa nilai MPN yang diperoleh diuji dengan analisis secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari volume media LBDS dan LBSS 4 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, yang direplikasikan 5 kali didapatkan hasil positif pada semua tabung 5 1 1 dengan nilai MPN >265/100 ml. Kesimpulan dari penelitian ini adalah volume media LBSS dan LBDS tidak mempengaruhi nilai positifitas dan nilai MPN *Coliform*.

**Kata Kunci:** *Coliform, Most Probable Number, LBSS, LBDS.*

***COLIFORM MOST PROBABLE NUMBER (MPN) WITH VARIETIES OF MEDIA VOLUME  
LACTOSE BROTH SINGLE STRENGTH (LBSS) AND LACTOSE BROTH DOUBLE STRENGTH  
(LBDS)***

**Abstract :** Most Probable Number (MPN) is a test that detects the fermentative nature of Coliform in the sample. The MPN test consists of three stages: presumptive test, confirm test, and completeness test. Each of these tests used LBSS, LBDS and BGLB media with volume between 5 ml - 10 ml. There is the variation of this media volume, whether it will affect the positivity value and MPN value of Coliform, it is a problem that will be answered in this study. The research objective was to find out the influence of media volume variation to the result of Coliform bacterium counting test method of MPN variety 5 1 1. The media volume which was varied namely LBSS and LBDS with volume variation 4 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml. The research was an experimental in laboratory. The sample was the suspense of *Escherichia coli* bacteria which are equivalent to standard 0.5 Mc. Farland and diluted 1000 ml sterile aquadest, the result data indicated MPN value was obtained, then it is analyzed by descriptive analysis. The findings indicated that the volume of LBDS and LBSS media were 4ml, 6ml, 8ml, 10ml, 12ml, replicated 5 times obtained positive result on all tubes 5 1 1 with MPN value > 265/100 ml. The conclusion of the research is media volume of LBSS and LBDS does not affect the positive and MPN Coliform values.

**Keywords:** *Coliform, Most Probable Number, LBSS, LBDS.*

## PENDAHULUAN

Makanan dan minuman merupakan sesuatu yang dibutuhkan oleh manusia untuk senantiasa hidup yang berasal dari hewan, tumbuhan, mineral, maupun dari zat-zat kimia sintetik. Pada umumnya makanan dan minuman tersebut, diproduksi oleh industri secara besar-besaran dan biasanya memakan waktu yang cukup lama dalam produksi, penyimpanan, distribusi dan akhirnya sampai ke tangan konsumen. Jadi kemungkinan dapat terjadi pertumbuhan mikroba di dalamnya (Fardiaz S, 1992). *Coliform* merupakan suatu grup bakteri yang digunakan sebagai indikator adanya polusi kotoran dan kondisi yang tidak baik terhadap air, makanan, susu dan produk-produk susu. *Coliform* sebagai suatu kelompok dicirikan sebagai kelompok bakteri berbentuk batang, gram negatif, tidak membentuk spora, aerobik fakultatif yang memfermentasi lactose dengan menghasilkan asam dan gas dalam waktu 48 jam suhu 37°C . adanya bakteri coliform dalam makanan dan minuman menunjukkan kemungkinan adanya mikroba enteropatogenik dan toksigenik yang berbahaya bagi kesehatan (Widianti dan Ristianti, 2004). Standar Air Minum dan makanan, menurut standar WHO semua sampel tidak boleh mengandung *Escherichia coli* dan sebaiknya juga bebas dari bakteri *Coliform*. Standar WHO dalam setiap tahun, 95% dari sampel-sampel tidak boleh mengandung *Coliform* dalam 100 ml, tidak ada sampel yang mengandung *Escherichia coli* dalam 100 ml, Tidak ada sampel yang mengandung coliform lebih dari 10 dalam 100 ml, tidak boleh ada coliform dalam 100 ml dan dua sampel yang berurutan (Broks *et al*, 2005). Perhitungan jumlah

mikroba dapat dilakukan dengan uji hitung jumlah bakteri dengan beberapa metode : *Metode Plate Count*, Penentuan volume total, *Metode turbidometri*, *Metode MPN (Most Probable Number)*, *Metode perhitungan cawan* ( Pratiwi, Sylvia T. 2008).

Salah satu metode yang digunakan adalah metode MPN (*Most Probable Number*), dalam metode MPN digunakan medium cair di dalam tabung reaksi , dalam hal ini perhitungan dilakukan berdasarkan jumlah tabung positif. Pengamatan tabung yang positif dapat dilihat dengan mengamati timbulnya kekeruhan, atau terbentuknya gas di dalam tabung Durham untuk bakteri pembentuk gas. Umumnya untuk setiap pengenceran digunakan 3 atau 5 seri tabung. Makin banyak tabung yang digunakan dalam perhitungan nilai MPN, akan menunjukkan tingkat ketelitian yang lebih tinggi. Metode MPN biasanya dilakukan untuk menghitung jumlah bakteri di dalam contoh berbentuk cair, meskipun dapat pula digunakan untuk contoh berbentuk padat dengan terlebih dahulu disuspensikan dengan perbandingan 1 : 10 dari contoh tersebut dalam buffer. Kelompok bakteri yang dapat dihitung dengan metode MPN juga bervariasi bergantung pada media yang digunakan untuk pertumbuhannya ( Supardi I & Sukanto, 1999). Metode *Most Probable Number* (MPN) mempunyai beberapa kelebihan, salah satunya pada volume media LBSS dan LBDS menggunakan 10 ml dan 5 ml. Pemeriksaan kehadiran bakteri coli dari air dilakukan berdasarkan penggunaan media kaldu laktosa yang ditempatkan di dalam tabung reaksi berisi tabung Durham (tabung kecil yang letaknya terbalik, digunakan untuk menangkap gas yang

terjadi akibat fermentasi laktosa menjadi asam dan gas). Tergantung kepada kepentingan, menggunakan ragam 5 1 1, 5 ml media LBDS pada 5 tabung dan 5 ml media LBSS pada 2 tabung (PDAM, 2015). Sampel ditumbuhkan pada seri tabung 5 atau ragam 5 1 1. Media pada tabung adalah *Lactose Broth* yang diberi indikator perubahan pH dan ditambah tabung Durham. Pemberian sampel pada tiap seri tabung berbeda-beda. Untuk sampel sebanyak 10 ml ditumbuhkan pada media LBDS (*Lactose Broth Double Strength*) dengan volume media 10 ml. Untuk sampel 1 ml dan 0,1 ml dimasukkan pada media LBSS (*Lactose Broth Single Strength*) dengan volume media 10 ml (Lay B W, 1992). Apakah variasi volume media LBSS dan LBDS akan mempengaruhi nilai positifitas dan nilai MPN Coliform? merupakan permasalahan yang akan dijawab dalam penelitian ini.

## METODE

Rancangan penelitian ini merupakan penelitian eksperimen di laboratorium, dengan 5 perlakuan variasi volume media LBSS dan LBDS, variasi volume media LBDS dan LBSS dengan komposisi *beef extract*, *lactose*, pepton, aquadest yang sudah dilarutkan dan disterilisasi kemudian dimasukkan ke dalam tabung dengan volume 4 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml dan 12 ml. Setiap perlakuan dilakukan replikasi 5 kali, sehingga besar unit eksperimen adalah 25 unit. Populasi dan Sampel dari penelitian ini adalah suspensi bakteri *Escherichia coli* 0,5 Unit *Mc. Farland* dengan jumlah sel bakteri  $0,15 \times 10^9$ /ml. Metode pemeriksaan yang digunakan dalam uji hitung bakteri *coliform* adalah metode

*Most Probable Number* (MPN), dengan langkah-langkah sebagai berikut: Persiapan sampel, mencari nilai MPN sampel, menghitung hasil dan mengolah data. Variable bebas dari penelitian ini adalah variasi volume media LBSS dan LBDS, Variable terikat: hasil uji MPN ragam 5 1 1. Hasil uji MPN adalah pembacaan hasil uji dari suspensi bakteri *Escherichia coli* standar 0,5 Mc farland setelah dilanjutkan dari media LBDS, LBSS ke media BGLB dengan membaca adanya gelombang gas. Data yang dikumpulkan dari penelitian ini adalah hasil uji hitung bakteri *coliform* metode MPN dengan volume media LBDS, LBSS yang divariasikan dari 4 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml.

Alat penelitian: Tabung Durham, Tabung reaksi, Rak tabung, Ose, Autoclave, Beaker glass, Incubator, Lampu spiritus, Pipet ukur 10 ml, Batang pengaduk, Plate, Neraca analitik, Hot plate, Erlenmeyer, Kapas, Tissue. Bahan: Suspensi bakteri *Escherichia coli*, Aquadest, Alkohol 70%. Media dan Reagensia: *Lactose Broth Double Strength* (LBDS), *Lactose Broth Single Strength* (LBSS), *Brilliant Green Lactose Broth* (BGLB) dan Nutrient Broth (NB).

Cara Kerja penelitian meliputi:

1. Pembuatan sampel: Suspensi *Escherichia coli* dengan kepekatan sel bakteri 0,5 unit *Mc. Farland* dibuat dalam media BHI (seperti terlihat pada gambar 1). Jika kepekatan sudah sama dengan standar 0,5 *Mc farland*, lalu masukkan 1 ml dari media BHI tersebut ke dalam 1000 ml aquadest steril (sebagai sampel air uji).



**Gambar 1. Suspensi *Escherichia coli* dengan kepekatan sel bakteri 0,5 unit *Mc. Farland* dalam media BHI**

2. Uji pendugaan (*Presumptive test*) : Disiapkan media LBSS dan LBDS sesuai dengan dasar MPN yang digunakan ragam 5 1 1, selanjutnya disiapkan 5 deret tabung reaksi sesuai jumlah volume media yang divariasikan 12, 10, 8, 6, 4 ml, dengan jumlah tabung reaksi dalam 1 deret 7 tabung, dimasukkan tabung durham ke semua tabung dengan posisi terbalik, dimasukkan media LBDS pada 5 tabung pertama disemua deret tabung sesuai volume media yang divariasikan, dimasukkan media LBSS pada 2 tabung dari semua deret tabung variasi sesuai volume media yang di variasikan. Dimasukkan 10 ml sampel pada 5 tabung dari semua deret tabung variasi, kemudian 2 tabung yang berisi media LBSS dimasukkan 1 ml sampel pada satu tabung dan 0,1 ml pada tabung sisanya. Dan dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Hasil positif apabila terjadi terdapat gas dalam tabung durham.

3. Uji penegas (*Confirmed test*) : Disiapkan tabung reaksi sesuai jumlah tabung yang positif pada uji penduga. Setiap tabung diisi 10 ml media BGLB, dan masukkan 1 ose dari tabung positif uji penduga, masukkan tabung durham ke semua tabung. Inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Hasil positif apabila terdapat gas dalam tabung durham (seperti terlihat

pada gambar 2). Hasil dibaca dengan mencocokkan pada tabel MPN 5-1-1 Formula Thomas seperti terlihat pada tabel 1.



**Gambar 2. Interpretasi hasil pada uji penegas (*Confirmed test*) menggunakan tabel MPN 5-1-1 Formula Thomas**

**Tabel 1. Tabel MPN 511 Menurut Formula Thomas**

Jumlah Tabung (+) Gas Pada Penanaman			Index Mpn Per 100 ML
5x10 ml	1x1 ml	1x 0,1 ml	
0	0	0	0
0	0	1	2
0	1	0	2
0	1	1	4
1	0	0	2
1	0	1	4
1	1	0	4
1	1	1	7
2	0	0	5
2	0	1	8
2	1	0	8
2	1	1	10
3	0	0	9
3	0	1	13
3	1	0	12
3	1	1	16
4	0	0	17
4	0	1	21
4	1	0	22
4	1	1	27
5	0	0	67
5	0	1	84
5	1	0	265
5	1	1	≤ 979

**HASIL PENELITIAN**

Hasil uji hitung bakteri *Coliform* metode MPN dengan menggunakan variasi volume media LBSS dan LBDS di tunjukkan pada tabel 2.

**Tabel 2. Hasil Nilai MPN Coliform dengan variasi volume LBSS dan LBDS**

Perlakuan	Hasil uji MPN														
	Replikasi														
	1			2			3			4			5		
	5	1	1	5	1	1	5	1	1	5	1	1	5	1	1
T0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

**Keterangan :**

- T0 : Kontrol ( menggunakan volume media LBDS LBSS 10ml )
- T1 : variasi volume media LBDS LBSS 4 ml
- T2 : variasi volume media LBDS LBSS 6 ml
- T3 : variasi volume media LBDS LBSS 8 ml
- T4 : variasi volume media LBDS LBSS 10 ml
- T5 : variasi volume media LBDS LBSS 12 ml
- (+) : adanya gelembung gas pada tabung durham
- (-) : tidak adanya gelembung gas pada tabung durham

ditempatkan di dalam tabung reaksi berisi tabung durham (tabung kecil yang letaknya terbalik, digunakan untuk menangkap gas yang terjadi akibat fermentasi laktosa menjadi asam dan gas). Tergantung kepada kepentingan, menggunakan ragam 5 1 1 , 5 ml media LBTS pada 5 tabung dan 5 ml media LBSS pada 2 tabung ( PDAM , 2015).

Sampel ditumbuhkan pada media LBDS dan LBSS dengan ragam 5 1 1. Media pada tabung adalah *Lactose Broth* yang diberi indikator perubahan pH dan ditambah tabung durham. Pemberian sampel pada tiap seri tabung berbeda-beda. Untuk sampel sebanyak 10 ml ditumbuhkan pada media LBDS (*Lactose Broth Double Strength*) dengan volume media 10 ml. Untuk sampel 1 ml dan 0,1 ml dimasukkan pada media LBSS (*Lactose Broth Single Strength*) dengan volume media 10 ml (Lay B W , 1992). Dalam penelitian ini dengan volume media LBDS dan LBSS yang di variasikan dari 4 ml , 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml , sampel yang digunakan dari suspensi bakteri *Escherichia coli* yang setara dengan standar 0,5 *Mc. farland* kemudian diencerkan 1000 ml dengan aquadest steril. Prinsip utama metode ini adalah mengencerkan sampel sampai tingkat tertentu sehingga didapatkan konsentrasi mikroorganisme yang sesuai dan jika ditanam dalam

**PEMBAHASAN**

MPN (*Most Probable Number*) merupakan uji yang mendeteksi sifat fermentatif *Coliform* dalam sampel, MPN terdiri dari tiga tahap, yaitu uji pendugaan (*Presumptive test*), uji konfirmasi (*Confirmed test*), dan uji kelengkapan (*Completed test*). Dalam uji tahap pertama, keberadaan Coliform masih dalam tingkat probabilitas rendah, masih dalam dugaan (Suriawiria, 2005). Metode MPN (*Most Probable Number*) mempunyai beberapa kelebihan, salah satunya pada volume media LBSS dan LBTS menggunakan 10 ml dan 5 ml. Pemeriksaan adanya bakteri coli dari air dilakukan berdasarkan penggunaan media kaldu laktosa yang

tabung menghasilkan frekuensi pertumbuhan tabung positif. Semakin besar jumlah sampel yang dimasukkan (semakin rendah pengenceran yang dilakukan) maka semakin “sering” tabung positif yang muncul. Semakin kecil jumlah sampel yang ditambahkan (semakin tinggi pengenceran) maka semakin “jarang” tabung positif yang muncul. Semua tabung positif yang dihasilkan sangat tergantung dengan probabilitas sel yang terambil oleh pipet saat memasukkannya kedalam media. Media LB (*lactose broth*) yang digunakan ada dua tipe yaitu *double strength* dan *single strength*. Kedua tipe memiliki perbedaan pada jumlah komposisi penyusunnya. Media LBDS (*lactose broth double strength*) memiliki komposisi ekstrak daging sapi (3 gram), pepton (5 gram), laktosa (10 gram) , dan bromotimol biru (0,2%) per liternya, sedangkan media LBSS (*lactose broth single strength*) memiliki komposisi yang sama tapi hanya kadar laktosanya setengah dari LBDS yaitu 5 gram (Volk, 1988). Laktosa, sukrosa, fruktosa, glukosa yaitu jenis karbohidrat yang umumnya sering digunakan, karbohidrat ditambahkan untuk memperkaya pembentukan asam dan gas dari karbohidrat. Konsentrasi yang ditambahkan untuk analisis fermentasi adalah 0,5 - 1%. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan bahwa semua tabung menunjukkan hasil positif dari perlakuan volume media 4 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, dan 12 ml . ada beberapa faktor yang memungkinkan hasil positif pada tabung yaitu tingkat pengenceran sampel yang masih rendah, sehingga semakin sering tabung positif yang muncul, diperlukan tingkat pengenceran yang lebih tinggi dan komposisi media LBDS dan LBSS dari volume media tertinggi 12 ml

dan terendah 4 ml mengandung lactose yang dapat memfermentasikan asam dan gas dengan jumlah yang sama meskipun jumlah volume berbeda .Penelitian ini didukung dari beberapa sumber buku tentang prosedur kerja *Most Probable Number* (MPN) yang menggunakan volume media LBDS dan LBSS yang berbeda-beda misalnya volume 5 ml dan 10 ml . perbedaannya dari penelitian ini adalah menggunakan volume media yang di variasikan dari volume 4 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml.

Penelitian yang telah dilakukan ini memiliki kelemahan, yaitu peneliti menggunakan tingkat pengenceran sampel yang terlalu tinggi yaitu 15.000/100 ml sehingga hasil yang didapatkan pada tabung ragam 511 semua positif, seharusnya peneliti menggunakan tingkat pengenceran sampel di bawah 15.000/100 ml sampel sehingga memaksimalkan hasil penelitian.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Hasil MPN dengan kepadatan bakteri *Escherichia coli* 0,5 unit *Mc. Farland* dengan jumlah sel  $0,15 \times 10^9$ /ml dengan menggunakan variasi volume media LBSS dan LBDS 4 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, adalah  $>265/100$  ml. Adanya variasi volume media LBSS dan LBDS tidak berpengaruh terhadap nilai MPN *Coliform*.

### Saran

Untuk pemeriksaan nilai MPN Coliform dengan menggunakan ampel isolat murni *Escherichia coli* dapat menggunakan media LBSS dan LBDS dengan volume antara 4 ml sampai dengan 12 ml. Perlu dilakukan penelitian lanjutan

dengan menggunakan sampel air sungai untuk pembuktian aplikatif dari penggunaan variasi volume media LBSS dan LBDS.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Brooks, Geo F, Butel, Janet S, Morse, Stephen A, *et al.* 2005. *Mikrobiologi Kedokteran* (edisi 1). Jakarta : Salemba Medika.
- Fardiaz, Srikandi. 1992. *Mikrobiologi Pangan 1*. Jakarta : PT. Gramedia Pustaka Utam
- Lay , bibiana W , 1994 . Analisis mikroba di laboratorium , institute pertanian bogor , raja grafindo persada , Bogor .
- Pratiwi, Sylvia T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga. Hal 107-110.
- Protap,PDAM Giri Menang. 2015.
- Supardi ,M dan sukamto , 1999. *Mikrobiologi dalam pengolahan dan keamanan pangan* , penerbit alumni Bandung .
- Suriawiria, 2005. *Mikrobiologi air dan dasar-dasar pengolahan buangan secara biologis*. Alumni. Bandung.
- Widiyanti, N.L.P.M. dan N.P. Ristanti. 2004. *Analisis Kuantitatif Bakteri*.