

JURNAL

KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER

Volume 7, 2020



JURNAL

KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER
VOLUME 7, 2020

ISSN:2502-0463

JURNAL

KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER
VOLUME 7, 2020

Penanggung Jawab : Drh. Hasan Abdullah Sanyata

Editor : Dr. drh. Puji Rahayu
Drh. Thufeil Yunindika
Drh. Hanif Anisatun

**Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan
2020**

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadapan Tuhan Yang Maha Esa karena atas berkat rahmat-Nya Jurnal Ilmiah Kesehatan Masyarakat Veteriner Volume 7 tahun 2020 dapat diselesaikan tepat pada waktunya.

Jurnal ilmiah ini disusun dari tulisan ilmiah staf Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan sesuai dengan keahlian dan bidang masing-masing. Dalam penyusunan jurnal ilmiah ini, masing-masing penulis mendapat banyak bantuan, masukan, bimbingan, dan dukungan dari berbagai pihak.

Tim jurnal ilmiah BPMSPH menyadari bahwa jurnal ilmiah ini masih jauh dari sempurna dan perlu adanya tulisan-tulisan lebih lanjut. Oleh karena itu, tim jurnal ilmiah mengharap kritik dan saran dari pembaca yang bersifat konstruktif demi kesempurnaan jurnal ilmiah ini. Tim jurnal ilmiah berharap semoga gagasan dan juga data pada jurnal ilmiah ini dapat bermanfaat bagi dunia keamanan pangan pada khususnya dan pembaca pada umumnya.

Tim Jurnal Ilmiah BPMSPH

DAFTAR ISI
JURNAL KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER BPMSPH
VOLUME 7 TAHUN 2020
ISSN:2502-0463

Metode qPCR SYBR Green dengan <i>Melting Curve Analysis</i> untuk Identifikasi dan Diferensiasi Daging Babi Ternak dan Daging Babi Hutan.	
Puji Rahayu, Diyan Cahyaningsari, Hanif Anisatun, Metriral.....	1-9
Pengendalian Mutu dan Kinerja Media Padat pada Kultur Mikrobiologi Laboratorium Cemaran Mikroba.	
Ika kartika Syarifah ,Ery Novarieta, Kanti Puji Rahayu , Ading Wahyudi.....	10-17
Sekuensing Metagenomik <i>Antimicrobial Resistance Genes</i> (ARG) pada Sampel Lingkungan di Rumah Potong Unggas Menggunakan MinION Nanopore.	
Puji Rahayu, Diyan Cahyaningsari, Hanif Anisatun, Metriral.....	18-28
Pengujian Residu Quinolon pada Daging Ayam Tahun 2020 dengan Metode <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) Menggunakan Kit I'screen Quino.	
Oli Susanti, Sani Susanty, Riska Desitania, Attya Asuh Insani.....	29-41
Determination of Trenbolone Acetate Residue on Imported Beef Meat and Beef Liver Using <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).	
Puji Rahayu, Iif Syarifah.....	42-50
Cemaran Logam Berat Pb, Cd, Dan Cu pada Ayam Kuning Sukabumi di Bogor Utara.	
Dofactora Megabuana Iskandar, Zakiah Wulandari, Puji Rahayu.....	51-61
Analisis Kadar Protein Kuning Telur Ayam Kampung (<i>Gallus Domesticus</i>) dengan Cara Pemasakan yang Berbeda.	
Hotmaroloan Silalahi, Sani Susanty , Hanif Anisatun.....	62-68
Analisis Kandungan Aflatoksin M1 pada Susu Kambing dengan Metode <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).	
Pawesti Wulan Sari, Sani Susanty.....	69-78
Validasi Metode Penetapan Residu Hormon Trenbolon Asetat Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi pada Daging Sapi.	
Dwi Herlambang, Woro Dyah Pinilih.....	79-95
Penentuan Logam Berat Arsen (As), Timbal (Pb) dan Cadmium (Cd) pada Susu Bubuk Menggunakan <i>Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry</i> (ICP-MS).	
Dini Tri Mardiani, Elok Kania, Atzhar Rezha Siregar, Fitri Amalia.....	96-103

METODE qPCR *SYBR GREEN* DENGAN *MELTING CURVE ANALYSIS* UNTUK IDENTIFIKASI DAN DIFERENSIASI DAGING BABI TERNAK DAN DAGING BABI HUTAN

Puji Rahayu^{1*}, Diyan Cahyaningsari¹, Hanif Anisatun¹, Metrizar¹

¹Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

*Email korespondensi : puji_latif@yahoo.co.id

ABSTRAK

Salah satu upaya penjaminan mutu dan keamanan pangan asal hewan dilakukan dengan cara pengembangan metode untuk mengidentifikasi spesies terkait pemalsuan dan kehalalan suatu produk hewan. Metode qPCR dengan *Melting Curve Analysis* (MCA) dikembangkan dalam upaya untuk identifikasi dan diferensiasi spesies babi dan babi hutan yang banyak terkait dengan pemalsuan dan kehalalan produk hewan. Dengan menggunakan sepasang primer dan profil PCR yang sama metode ini mampu mengidentifikasi dan juga mendiferensiasi babi ternak dan babi hutan berdasarkan kurva leleh amplikonnya. Pada hasil amplifikasi tidak bisa membedakan antara babi ternak dan babi hutan, oleh karena itu diperlukan analisis tambahan yang mampu digunakan untuk mendiferensiasi babi ternak dengan babi hutan. Hasil analisa terhadap kurva leleh amplikon dapat digunakan sebagai dasar untuk membedakan babi ternak dengan babi hutan karena *melting temperature* (T_m) yang dihasilkan berbeda berbeda yaitu 81.5°C untuk babi ternak dan 82.3°C untuk babi hutan. Uji t terhadap nilai T_m (Tabel 3) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata antara T_m dari DNA babi ternak dan DNA babi hutan ($p < 0.05$). Dengan adanya analisis tambahan dengan menggunakan *Melting Curve Analysis* bisa dilakukan diferensiasi antara babi dengan babi hutan. Teknik pengujian qPCR berbasis *SYBR Green-melting curve analysis* (*SYBR Green-MCA*) merupakan metode yang cepat dan akurat untuk identifikasi dan diferensiasi spesies. Metodologi yang ditetapkan dalam pengembangan ini dapat digunakan untuk melakukan identifikasi dan diferensiasi pada spesies terutama yang berkaitan dengan kehalalan suatu produk pangan asal hewan.

Kata kunci: qPCR, *SYBR Green*, *Melting Curve Analysis* (MCA), pangan asal hewan

PENDAHULUAN

Identifikasi spesies dalam produk daging telah meningkat dalam beberapa tahun terakhir sejak bahan makanan ini menjadi target yang rentan untuk pemalsuan dan serta semakin meningkatnya permintaan status halal dalam produk pangan asal hewan. Beberapa metode analitik yang mungkin digunakan untuk identifikasi spesies pada produk sudah banyak dikembangkan diantaranya dengan metode kromatografi, spektrometri massa, mikroskop, spektroskopi, resonansi putaran elektronik, pengujian enzimatis, ELISA dan juga PCR (Ballin, 2010). Selama ini belum banyak metode yang mampu membedakan antara babi ternak dan babi hutan karena baik susunan DNA maupun protein dari kedua spesies hanya sedikit memiliki perbedaan (Skobrák *et al.*, 2011)

Metode berbasis protein dilaporkan banyak bermasalah untuk identifikasi spesies dalam daging yang dipanaskan karena denaturasi protein oleh pemanasan intensif selama pemrosesan makanan menyebabkan modifikasi dalam aktivitas antigenik molekul, akibatnya mengubah kemampuan antibodi

untuk mengidentifikasi protein targetnya (Hsieh, 2004). Selain itu pada metode yang berdasarkan protein kemungkinan reaksi silang antara spesies sangat mungkin terjadi (Hsieh *et al.*, 1998). Karena alasan ini metode berbasis protein telah digantikan oleh metode berbasis DNA. Metode pengujian berdasarkan DNA memiliki kekuatan identifikasi yang spesifik karena identifikasi dilakukan terhadap segmen DNA dengan urutan tertentu dari jaringan atau hewan tertentu (Farag *et al.*, 2015). Dari teknik berbasis DNA, *polimerase chain reaction* (PCR) merupakan metode yang paling banyak digunakan, karena metode ini sederhana, hemat waktu, sensitif dan spesifik untuk mengidentifikasi spesies meskipun sampel sudah mengalami pemrosesan yang berbeda (Mafrá *et al.*, 2008; Bottero dan Dalmaso, 2011; Floren *et al.*, 2015). Selain itu, penggunaan PCR dalam analisis makanan telah menyediakan berbagai analitik metode untuk deteksi dan identifikasi cepat pada spesies dan tingkat intra-spesies.

Pendekatan qPCR dengan metode *SYBR green melting curve analysis* (*SYBR green-MCA*) merupakan salah satu metode deteksi dan juga mampu mendiferensiasi daging babi dan daging babi hutan baik pada produk segar maupun olahan. Metode ini memberikan hasil spesifisitas tinggi dengan analisis kurva leleh ampikon (*melting curve analysis*) sehingga mampu membedakan antara babi ternak dan babi hutan .

Tujuan dari pengembangan metode ini adalah mendapatkan metode untuk melakukan identifikasi dan diferensiasi babi ternak dan babi hutan serta menganalisis pola *melting curves* dari kedua spesies tersebut.

MATERI DAN METODE

Materi

Alat yang digunakan antara lain gunting, pinset, *single channel micropipet*, *mini spin down*, dan *real-time thermal cycler Rotor-Gene Q* (Qiagen) dan spektrofotometer nanodrop (Thermo Scientific). Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daging babi ternak (n=7) dan daging babi babi hutan (n=7) , komersial ekstraksi *DNeasy Mericon Food Kit* (Qiagen) untuk ekstraksi DNA, *kit master mix SYBR Select* (Applied Biosystem), *nuclease free water* (Qiagen) dan primer untuk amplifikasi spesifik dari DNA babi 5'-ATG AAA CAT TGG AGT CCT ACT AAT TAC-3' (forward) dan 5'-CTA CGA GGT CGT TTC CGA TAT AAG G-3' (reverse).

Metode

Sampel daging diekstraksi sesuai dengan protokol dari *DNeasy Mericon Food Kit*. DNA hasil ekstraksi dapat langsung digunakan untuk amplifikasi PCR atau disimpan pada suhu -20 °C sampai -80 °C untuk proses selanjutnya. Sebelum masuk pada proses amplifikasi DNA dianalisa dengan menggunakan nanodrop spektrofotometer untuk menghitung kuantitas dan kualitas DNA tersebut. Jumlah DNA yang digunakan

dalam pengujian ini disamakan yaitu dihitung sebesar 100 ng/μl baik DNA babi ternak maupun DNA babi hutan. Proses amplifikasi diawali dengan penghitungan template yang terdiri dari *SYBR select master mix* sebanyak 12.5 μl, primer *forward* 2 μl, primer *reverse* 2 μl dan *nuclease free water* 3,5 μl untuk satu sampel. Amplifikasi DNA dilakukan pada *thermal cycler Rotor-Gene Q*. Program amplifikasi pada metode uji real-time PCR yaitu denaturasi awal 95 °C selama 2 menit, denaturasi 95 °C selama 15 detik, *annealing/extension* 60 °C selama 60 detik, dengan siklus sebanyak 35 kali, *melting point* pada suhu 60 ° - 95 °C selama 90 detik pada tahap pertama dan 5 detik pada tahap selanjutnya dengan pencatatan dilakukan setiap kenaikan 1°C. Deteksi target menggunakan pewarna reporter *SYBR* dengan *channel Green* dan *melting* menggunakan *SYBR green*. Interpretasi hasil positif dinyatakan apabila sampel DNA menunjukkan adanya amplifikasi pada *detection system* dengan nilai *cycle threshold* (Ct) serta nilai *melting temperature* (Tm) yang dihasilkan. Untuk *melting curve analysis* software Qrex dari Rotor Gene (Qiagen) digunakan untuk mengidentifikasi nilai spesifik Tm dari masing-masing spesies.

HASIL DAN PEMBAHASAN

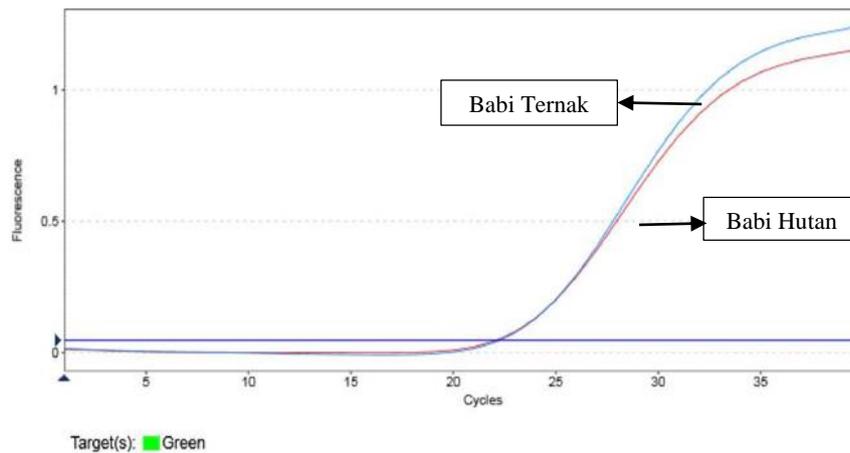
Sampel daging babi ternak (n=7) dan daging babi hutan (n=7) yang sudah diekstraksi DNANYa di analisis terlebih dahulu dengan menggunakan spektrofotometer. Hasil kuantifikasi dan kemurnian dari DNA yang dihasilkan dapat di lihat pada tabel 1.

Tabel 1. Konsentrasi DNA babi ternak dan babi hutan hasil spektrofotometer

Jenis Sampel	n	Rataan Konsentrasi	Konsentrasi	Rataan	Rataan
		DNA ± SD (ng/μl)	DNA Min-Max (ng/μl)	Ratio 260/280 nm	Ratio 260/230 nm
Babi Ternak	7	263,12 ± 25,30	231,87-301,23	1,86	1,49
Babi Hutan	7	264,70 ± 51,84	209,35-345,54	1,89	1,65

Dari hasil analisis dengan menggunakan spektrofotometer diperoleh jumlah DNA untuk babi ternak dengan rata-rata 263,12 ng/μl sedangkan pada babi hutan diperoleh 264,70 ng/μl. Berdasarkan hasil analisis dipastikan bahwa DNA hasil ekstraksi sudah sangat mencukupi untuk proses qPCR.

Konfirmasi hasil qPCR bisa dilihat dari *cycle threshold* (Ct) yang menunjukkan pada siklus keberapa DNA yang bersifat spesifik mengalami proses amplifikasi. Hasil pengujian dengan qPCR menunjukkan bahwa seluruh sampel teramplifikasi menghasilkan Ct yang berbeda berkisar antara 22,01 - 22,34 sedangkan pada babi hutan berkisar antara 22,19 – 22,54. *Amplification plot* Ct qPCR pada daging babi ternak dan babi hutan dapat dilihat pada Gambar 1. Dari Gambar 1 dapat dilihat bahwa hasil amplifikasi terhadap sampel daging babi ternak dan babi hutan mempunyai nilai yang berdekatan. Adapun rata-rata nilai Ct dari seluruh sampel dapat dilihat pada Tabel 2.



Gambar 2. Amplification plot cycle threshold (Ct) qPCR untuk babi ternak dan babi hutan dengan konsentrasi DNA 100 µg/ml

Uji t terhadap nilai Ct pada babi ternak dan babi hutan yang diperoleh menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan dalam mendeteksi spesies babi ternak dengan babi hutan menggunakan metode realtime PCR ($p \geq 0.05$).

Tabel 2. Nilai cycle threshold (Ct) babi ternak dan babi hutan dengan qPCR

Jenis Sampel	n	% positif teramplifikasi	Rataan Ct ± SD	Min-Max Ct	nilai p
Babi Ternak	7	100	22,25 ± 0,23	22,01 - 22,34	0,1587
Babi Hutan	7	100	22,38 ± 0,11	22,19 - 22,54	

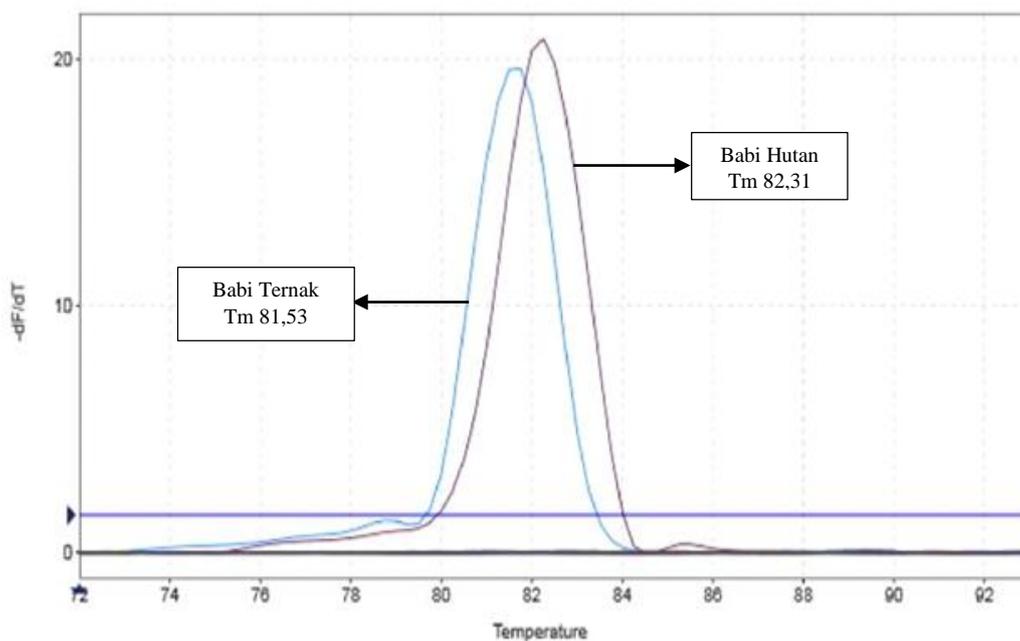
$p > 0.05$ tidak berbeda nyata

Dari hasil analisis melting curve diperoleh bahwa DNA babi ternak melting pada kisaran suhu 81,00-81,51 sedangkan DNA babi hutan berada pada kisaran suhu 82,24-82,3. Secara lengkap hasil dapat dilihat pada tabel 3. Uji t terhadap nilai Tm menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata antara Tm dari DNA babi ternak dan DNA babi hutan ($p < 0.05$).

Tabel 3. Nilai *melting temperature* (Tm) babi ternak dan babi hutan dengan *Melting Curve Analysis*

Jenis Sampel	n	% Genotype	Rataan	Min-Max	Nilai p
			Tm ± SD	Tm	
Babi Ternak	7	100% Babi Ternak	81,42 ± 0,17	81,00 - 81,51	0,00016
Babi Hutan	7	100% Babi Hutan	82,28 ± 0,02	82,24 - 82,31	

p<0.05 berbeda nyata



Gambar 2. *Melting curve* untuk babi ternak dan babi hutan dengan metode *SYBR green melting curve analysis*

Metode qPCR untuk identifikasi spesies telah digunakan dalam berbagai pengujian karena waktu yang digunakan dalam analisa relatif lebih singkat (Sue et al., 2014). Real time PCR memiliki berbagai keunggulan dibanding teknik PCR konvensional yaitu mampu menganalisis sampel dengan jumlah relatif sedikit, mampu menghasilkan data cepat dan akurat, dan mampu menganalisis lebih dari satu gen dalam satu waktu. Prinsip qPCR yaitu pendeteksian ampikon yang terbentuk dengan mengukur peningkatan sinyal fluoresens yang berpondar saat terikat dengan untai DNA ganda. Fluoresens yang dihasilkan akan sebanding dengan jumlah DNA baru yang terbentuk (Reece, 2004).

Sebelum proses amplifikasi, DNA yang diperoleh sebaiknya dihitung dengan menggunakan spektrofotometer. Selain untuk mengetahui kuantitas DNA yang diperoleh proses ini juga mampu mengevaluasi kemurnian DNA untuk mendeteksi kontaminan lain yang mungkin ada. Perhitungan kemurnian yang paling umum adalah rasio absorbansi pada 260/280 nm serta 260/230 nm. DNA berkualitas

baik akan memiliki rasio 260/280 nm dengan kisaran 1,7-2,0. Rasio absorbansi 260/230 nm dapat digunakan sebagai ukuran sekunder dari kemurnian DNA atau RNA. Dalam hal ini, rasio antara 2,0 - 2,2 dianggap murni. DNA dengan rasio dibawah dari standar akan menyebabkan terganggunya proses amplifikasi karena menunjukkan banyak kontaminan pada sampel DNA tersebut. Kemurnian DNA yang ideal didapatkan dari proses isolasi DNA adalah 95-100% dengan nisbah absorbansi sebesar 2.00 ± 0.05 (Sambrook dan Russel, 2009). Dari tabel 1 dapat dilihat bahwa hasil pengukuran DNA memperoleh hasil yang cukup baik baik pada daging babi ternak maupun daging babi hutan.

Nilai Ct yaitu siklus dimana fluoresensi mencapai ambang batas atau threshold sehingga terjadi peningkatan signifikan saat pertama kali terdeteksi (Rodriguez, 2013). Salah satu penyebab mengapa nilai Ct berdekatan adalah adanya kesamaan jumlah DNA yang terkandung dalam sampel tersebut sehingga akan memberikan waktu amplifikasi bersamaan. Banyak metode PCR yang sudah dikembangkan untuk identifikasi spesies babi akan tetapi beberapa metode tidak mampu melakukan diferensiasi antara babi ternak dan babi hutan karena keduanya pada saat dilakukan pengujian secara bersamaan dengan konsentrasi DNA yang sama akan memberikan nilai Ct yang sangat mirip. Oleh karena itu diperlukan suatu analisis tambahan atau analisis post PCR apabila ingin melakukan diferensiasi terhadap beberapa spesies terutama yang mempunyai kemiripan baik secara fenotipe maupun secara genotipe.

Untuk melakukan diferensiasi antara babi ternak dan babi hutan, setelah sampel dianalisa dengan melihat hasil amplifikasi melalui nilai Ct nya, hasil dianalisis dengan menggunakan melting curve analysis dengan melihat nilai melting temperature (T_m) yang dihasilkan. Suhu saat DNA terdenaturasi separuhnya disebut dengan melting temperature (T_m). Saat kondisi ini, absorbansi pada 260 nm akan meningkat sebesar 18.5% yaitu menjadi separuh dari 37% absorbansi denaturasi sempurna. Efek hiperkromik merupakan fenomena yang menjadi penyebab terjadinya peristiwa ini (Chatterjea dan Rana, 2012). Seluruh sampel yang diuji menggunakan qPCR-MCA dianalisis secara deskriptif berdasarkan pola melting curves yang terlihat secara visual dan suhu melt peak yang diperoleh setelah peningkatan suhu pasca amplifikasi PCR sebesar $1^\circ\text{C}/\text{detik}$.

Secara keseluruhan, metode ini dapat mendeteksi dua pola melting curves yaitu dapat membedakan antara babi ternak dan babi hutan dalam satu kali uji PCR seperti yang terlihat pada Gambar 2. Perbedaan T_m juga dapat menunjukkan adanya perbedaan variasi sekuens DNA antar spesies, meskipun perbedaan hanya terletak pada satu atau dua basa saja. keseluruhan kelompok sampel babi ternak memberikan T_m yang berbeda dengan kelompok sampel babi hutan. Dari hasil tersebut dapat diperoleh bahwa dengan melihat nilai T_m maka bisa dilakukan diferensiasi terhadap babi ternak dan babi hutan.

Babi ternak dan babi hutan mempunyai karakteristik protein yang sangat dekat sehingga sulit untuk dibedakan (Hoseinpour et al., 2017). Berdasarkan metode qPCR SYBR Green MCA ini dapat dilakukan diferensiasi terhadap dua spesies ini berdasarkan pada Melting Time yang dihasilkan. Melting Curve Analysis pada SYBR-Green secara luas digunakan untuk menentukan produk non-spesifik yang terbentuk saat proses amplifikasi (Cao dan Shockey, 2012).

Teknik deteksi dan identifikasi spesies, terutama dalam produk pangan asal hewan menjadi sangat penting karena berkaitan dengan kesehatan, ekonomi, dan agama. Daging yang aman dan halal menjadi perhatian utama, terutama bagi komunitas Muslim mayoritas di Indonesia. Babi hutan (*Sus scrofa scrofa*), misalnya, berbeda secara genetik dari babi ternak (*Sus scrofa domestica*) akan tetapi perbedaan tersebut hanya sedikit, untuk melakukan diferensiasi biasanya dilakukan oleh (sub) identifikasi spesies (Ballin, 2010). Teknik qPCR memiliki keunggulan untuk membedakan antara spesies hewan hanya dengan menggunakan analisis DNA. Kelebihan DNA apabila dibandingkan dengan protein, DNA memiliki stabilitas termal yang lebih tinggi, terdapat di mayoritas sel, dan berpotensi memberikan informasi identik diperoleh dari hewan yang berbeda (Lockley dan Bardsley, 2000). Diferensiasi antara babi ternak dan babi hutan dalam makanan berhasil dilakukan dengan menargetkan dua lokus gen dengan metode qPCR (Kaltenbrunner *et al.*, 2019). Selain itu Sahilah *et al.* (2012), berhasil melakukan diferensiasi dengan metode PCR-*restriction fragment length polymorphism* (RFLP) untuk membedakan gen mitokondria daging babi ternak dan daging babi hutan.

Penggunaan qPCR dengan teknik *SYBR green melting curve analysis* terbukti berhasil dalam mendeteksi, mengidentifikasi dan membedakan DNA babi ternak dengan babi dengan cepat, tepat dan akurat. Teknik qPCR *SYBR green melting curve analysis* dapat menghemat waktu dan biaya analisis karena untuk mendeteksi sampel dari DNA babi ternak dan babi hutan dapat dilakukan dalam satu reaksi sehingga metode ini bisa lebih efisien.

KESIMPULAN

Penggunaan qPCR *multiplex* dengan *SYBR green melting curve analysis* terbukti berhasil dalam mendeteksi, mengidentifikasi dan membedakan DNA babi ternak dengan babi dengan cepat, tepat dan akurat. Teknik qPCR *SYBR green melting curve analysis* dapat menghemat waktu dan biaya analisis karena untuk mendeteksi sampel dari DNA babi ternak dan babi hutan dapat dilakukan dalam satu reaksi sehingga metode ini bisa lebih efisien.

Perlunya dilakukan pengembangan metode *SYBR green melting curve analysis* lebih lanjut untuk mengetahui apakah perbedaan *melting temperature* (T_m) antara babi ternak dan babi hutan pada produk asal hewan yang sudah mengalami pemrosesan (produk olahan) juga memberikan pola yang sama.

DAFTAR PUSTAKA

- Ballin, N.Z. 2010. Authentication of meat and meat products. *Meat Science* 86, 577-587.
- Beuret, C. 2004. Simultaneous detection of enteric viruses by multiplex realtime RT-PCR. *J. Virol. Methods* 115, 1–8.
- Bottero, Maria and Dalmaso, Alessandra. 2011. Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. *Veterinary journal* (London, England : 1997). 190. 34-38.
- Chatterjea MN and Rana S. 2012. *Textbook of Medical Biochemistry* 8th Ed. New Delhi(IN): Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd.
- Farag MR, Alagawany M, Abd El-Hack ME, Tiwari R, Dhama K. 2015. Identification of different animal species in meat and meat products: trends and advances. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 3(6): 334-346.
- Floren C, Kilic I, Brenig B, Schütz E, Beck J. 2015. Species identification and quantification in meat and meat products using droplet digital PCR (ddPCR). *Food chemistry.* 173. 1054-8.
- Hoseinpour F, Foroughi A, Nomanpour B, Nasab RS. 2017. Identification and differentiation of *Campylobacter* species by high-resolution melting curve analysis. *Microbiol Pathog.* 108: 109-113.
- Hsieh FY, Bloch D, Larsen M .1998.. A Simple Method of Sample Size Calculation for Linear and Logistic Regression. *Statistics in medicine.* 17. 1623-34.
- Hsieh, Yuch-Ping. 2004. Meat Species Identification. *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering.* 1. 1-19.
- Hui YH. 2011. *Handbook of Food Science Technology and Engineering* Third Edition. China (CN).
- Kaltenbrunner M, Mayer W, Kerkhoff K. 2019. Differentiation between wild boar and domestic pig in food by targeting two gene loci by real-time PCR. *Sci Rep* 9, 9221 (2019).
- Lockley AK and Bardsley R. 2000. DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology.* 11. 67-77.
- Mafra I, Silva S, Moreira E, Silva C, Beatriz M, Oliveira PP. 2008. Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. *Food Control.* 19.
- Mouillesseaux KP, Klimpel KR, Dhar AK. 2003. Improvement in the specificity and sensitivity of detection for the Taura syndrome virus and yellow head virus of penaeid shrimp by increasing the amplicon size in SYBR Green real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* 111, 121–127.
- Nicolas L, Milon G, Prina E. 2002. Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. *J. Microbiol. Methods* 51, 295–299.

- Papin JF, Vahrson W, Dittmer DP. 2004. SYBR Green-based real-time quantitative PCR assay for detection of West Nile virus circumvents false-negative results due to strain variability. *J. Clin. Microbiol.* 42,1511–1518.
- RJ. 2004. *Analysis of Genes and Genomes*. Inggris (EN): Jhon Wiley and Sons Lid.
- Sambrook J and Russell DW. 2006. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *CSH Protoc.* 2006;2006(1):pdb.prot4455. Published 2006 Jun 1.
- Sahilah, AM, Nazri W, Shahimi S, Yaakob N, Abdullah S, Norrakiah, Abdullah A, Babji, A, Ghani M. 2012. Comparison Between Pork and Wild Boar Meat (*Sus scrofa*) by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). *Sains Malaysiana.* 41. 199-204.
- Shiple GL. 2006. An introduction to realtime PCR, dalam Dorak MT (Ed) *Real-Time PCR*. New Castle (UK): Taylor & Francis Group.
- Skobrák EB, Bodnár K, Jónás E.M, Gundel J, Jávora A. 2011. The Comparison Analysis of the Main Chemical Composition Parameters of Wild Boar Meat and Pork.
- Sue MJ Yeap, Swee Keong, Omar, Abdul Tan, Sheau Wei. 2014. Application of PCR-ELISA in molecular diagnosis. *BioMed research international*

PENGENDALIAN MUTU DAN KINERJA MEDIA PADAT PADA KULTUR MIKROBIOLOGI LABORATORIUM CEMARAN MIKROBA

Ika Kartika Syarifah^{1*}, Ery Novarieta H¹, Kanti Puji Rahayu¹, Ading Wahyudi¹

¹Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan (BPMSPH), Bogor

*Email Korespondensi : ika.syarifah@gmail.com

ABSTRACT

The quality control and performance test of culture media are carried out to determine the quality of culture media to microorganisms. The purpose of this study was to determine the quality and performance of solid media which is routinely used in the laboratory of Cemarannya Mikroba BPMSPH Bogor. The parameters used are quantitative productivity test, qualitative productivity test, qualitative selectivity, and qualitative specificity. The selective media that was tested were baird parker agar (BPA), Brilliance E.coli/Coliform selective medium, violet red bile glucose (VRBG) agar, Listeria agar (Base) acc. Ottaviani and Agosti, and X.L.D medium. Whereas, the non-selective reference media used was tryptone soy broth (TSA). The results of this study were quantitative productivity tests on selective media BPA was 1,08; Brilliance E. coli/Coliform selective medium was 1,28; VRBG agar was 0,88 dan Listeria Agar acc. Ottaviani and Agosti was 0,6. The qualitative productivity test results of selective media with target microorganisms obtained good growth results with an appropriate colony. The qualitative specificity test results using non-target microorganisms showed colony growth with characteristics incompatible with the target microorganisms. The media performance test conducted in the laboratory of Cemarannya Mikroba BPMSPH on selective and non-selective media using target and non-target microorganisms obtained appropriate results. The performance test of the media was acceptable.

Keywords: Agar media, Microorganisms, Qualitative test, Quantitative test.

PENDAHULUAN

Media kultur adalah komponen utama untuk sebagian besar uji mikrobiologi. Menjaga kualitas media sangat penting untuk keberhasilan uji di laboratorium mikrobiologi. Persiapan dan penyimpanan media yang tepat, serta pengujian pengendalian kualitas media dapat memastikan pemakaian media berkualitas tinggi secara konsisten di laboratorium mikrobiologi. Kualitas media yang digunakan akan sangat mempengaruhi hasil dari pengujian (ISO, 2014; USP, 2014). Parameter yang digunakan untuk menilai kinerja media uji di laboratorium mikrobiologi diperlukan untuk memungkinkan adanya perbandingan besaran atau angka pertumbuhan dari mikroorganisme yang ditumbuhkan pada media uji. Parameter uji tersebut adalah uji produktifitas, selektifitas dan spesifisitas, baik pada metode uji kuantitatif maupun kualitatif. Penggunaan media referensi diwajibkan pada metode kuantitatif, sedangkan pada metode kualitatif penggunaan media referensi dapat membantu menginterpretasikan hasil (ASM, 2012; KAN, 2019).

Uji kinerja media biakan dilakukan untuk mengetahui respon media biakan terhadap mikroorganisme target dan non target pada kondisi yang ditentukan (KAN, 2019). Oleh karena itu media yang digunakan untuk pengujian di laboratorium Cemarannya Mikroba perlu diketahui kinerjanya terlebih

dahulu. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui mutu dan kinerja media padat yang rutin digunakan di laboratorium Cemarkan Mikroba BPMSPH Bogor. Uji kinerja media pada penelitian ini dilakukan pada setiap *batch* media yang rutin digunakan di laboratorium.

MATERI DAN METODE

Materi

Media Agar dan Kultur Mikroorganisme

Media padat atau media agar selektif yang diuji pada penelitian ini adalah baird parker agar (BPA), Brilliance *E.coli/Coliform* selective medium, violet red bile glucose (VRBG) Agar, Listeria agar (Base) acc. Ottaviani and Agosti, dan X.L.D medium.

Media non selektif referensi yang digunakan adalah tryptone soy broth (TSA). Kultur mikroorganisme target yang digunakan pada penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium dan *Listeria monocytogenes*. Sedangkan kultur mikroorganisme non target yang digunakan pada penelitian ini adalah *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria innocua* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

Metode Uji

Uji produktifitas kuantitatif

Tingkat Inokulum Uji Penghitungan Kuantitatif. Tingkat inokulum yang diperlukan untuk mengetahui kinerja media digunakan suspensi bakteri yang telah terukur jumlahnya dengan konsentrasi strain mikroorganisme target yang sesuai. Total koloni yang diperoleh pada masing-masing mikroorganisme berjumlah lebih dari 100 koloni, sesuai dengan yang dipersyaratkan dalam ASM (2012). Jumlah koloni mikroorganisme untuk uji produktifitas kuantitatif telah diuji serta dihitung sebelumnya, dan dijabarkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Jumlah koloni mikroorganisme target untuk uji produktifitas kuantitatif menggunakan metode *Total Plate Count*

Mikroorganisme	Mc Farland	Tingkat pengenceran	Jumlah inokulum (mL/cawan)	Jumlah koloni	Metode uji
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,5	10 ⁻⁵	0,1	186	<i>Spreader</i>
<i>Escherichia coli</i>	0,5	10 ⁻⁶	1	161	<i>Pour plate</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,5	10 ⁻⁵	0,1	122	<i>Spreader</i>
<i>Salmonella</i> Typhimurium	0,5	10 ⁻⁵	0,1	170	<i>Spreader</i>

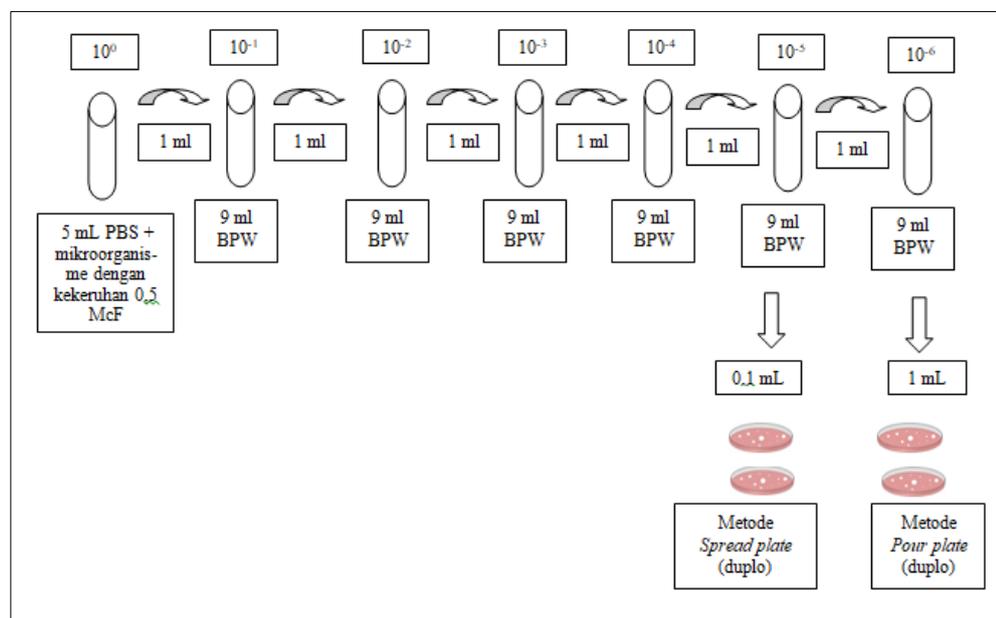
Rasio Produktifitas. Produktifitas yaitu tingkat perolehan kembali (*level of recovery*) mikroorganisme target dari media biakan dalam kondisi yang ditentukan. Rasio produktifitas (P_R) suatu media adalah metode untuk menentukan kinerja relatif terhadap media kontrol, yaitu media padat atau agar referensi yang mengandung nutrisi yang tinggi seperti tryptone soy broth (TSA) dengan media agar

selektif. Inokulum yang digunakan harus sama untuk kedua media dan P_R dihitung dengan menghitung koloni pada media selektif dan kontrol (Basu *et al.*, 2005, ASM, 2012). Rasio Produktifitas P_R ditetapkan sebagai berikut (ASM, 2012; KAN, 2019):

$$P_R = N_s / N_o$$

Keterangan : (a) N_s adalah jumlah total koloni yang diperoleh pada atau dalam media selektif biakan yang diuji. (b) N_o adalah jumlah total koloni yang diperoleh pada atau dalam media biakan acuan referensi yaitu TSA.

Interpretasi hasil P_R harus $\geq 0,50$ untuk rasio media selektif dengan media acuan non selektif referensi (TSA) agar hasilnya dapat diterima (ASM, 2012; ISO 2014; KAN, 2019).



Gambar 1. Alur pengujian kinerja media uji produktifitas kuantitatif

Metode Uji Produktifitas Kuantitatif. Kultur atau inokulum yang digunakan untuk uji kinerja media berasal dari strain mikroorganisme target dengan kekeruhan mikroorganisme target pada 0,5 McFarland yang diperkirakan berisi ratusan koloni bakteri per 1 mL pada tingkat pengenceran 10^{-6} dengan metode *pour plate* atau 0,1 mL tingkat pengenceran 10^{-5} dengan metode *spreader plate* seperti yang dijabarkan pada Tabel 1. Inokulasi dilakukan dengan menyebarkan inokulum pada media selektif dan media referensi TSA sesuai dengan metode yang diacu secara duplo. Media BPA, Listeria agar (Base) acc. Ottaviani and Agosti, dan X.L.D medium dengan metode *spread plate*. Media Brilliance *E.coli/Coliform* selective medium dan VRBG agar dengan metode *pour plate* seperti yang dijabarkan pada Gambar 1. Cawan petri tersebut diinkubasi pada suhu yang sesuai dengan metode pengujiannya, yaitu BPA 35 ± 1 °C selama 24-48 jam, Brilliance *E.coli/Coliform* selective medium 37 ± 1 °C selama 24 jam, VRBG agar 37 ± 1 °C selama 24 jam, Listeria agar (Base) acc. Ottaviani and Agosti 37 ± 1 °C selama

24-48 jam, X.L.D medium 35 ± 1 °C selama 24-48 jam, dan TSA 35 ± 1 °C selama 24 jam. Selanjutnya dihitung jumlah koloni pada media dan ditentukan nilai P_R .

Uji Produktifitas Kualitatif

Tingkat Inokulum Uji Penghitungan Kualitatif. Volume suspensi yang digunakan untuk pengujian produktifitas berjumlah $10^3 - 10^4$ koloni untuk uji kualitatif media padat pada cawan petri (KAN 2019). Berdasarkan hasil pada Tabel 1 diperkirakan bahwa pada tingkat pengenceran 10^{-4} dengan kekeruhan mikroorganisme target pada 0,5 McFarland jumlah koloni yang diperoleh adalah sebanyak 10^4 koloni.

Metode Gores Kualitatif. Pengujian dengan metode ini digunakan kultur atau inokulum berjumlah 10^4 koloni seperti yang dijelaskan sebelumnya. Untuk produktivitas, digunakan cawan media berisi Listeria agar (Base) acc. Ottaviani and Agosti dan X.L.D medium. Setiap mikroorganisme target uji diinokulasi menggunakan *loop/ose* 10 µl untuk mendapatkan koloni yang terpisah. Cawan-cawan petri tersebut diinkubasi pada suhu yang sesuai dengan mikroorganisme target.

Interpretasi Hasil. Jumlah pertumbuhan pada cawan petri setelah diinkubasi dinilai sebagai berikut (KAN, 2019): 0 dengan tidak ada pertumbuhan; 1 dengan pertumbuhan yang lemah (baik pengurangan jumlah pertumbuhan atau ukuran koloni); dan 2 dengan pertumbuhan yang baik.

Uji Selektivitas Kualitatif

Metode Gores Kualitatif. Pengujian dengan metode ini digunakan kultur atau inokulum berjumlah 10^4 koloni seperti yang dijelaskan sebelumnya. Untuk uji selektivitas, digunakan cawan media X.L.D medium, Listeria Agar acc. Ottaviani and Agosti, BPA, Brilliance *E. coli/Coliform* selective medium, dan VRBG agar. Setiap mikroorganisme non target uji diinokulasi sebagai satu garis lurus menggunakan jarum *loop/ose* 10 µl pada permukaan media uji. Cawan-cawan petri tersebut diinkubasi pada suhu yang sesuai dengan mikroorganisme target.

Interpretasi Hasil. Jumlah pertumbuhan pada cawan petri setelah diinkubasi dinilai sebagai berikut (KAN, 2019): 0 dengan tidak ada pertumbuhan; 1 dengan pertumbuhan yang lemah (baik pengurangan jumlah pertumbuhan atau ukuran koloni); dan 2 dengan pertumbuhan yang baik.

Uji Spesifisitas Kualitatif

Metode Gores Kualitatif. Pengujian dengan metode ini digunakan kultur atau inokulum berjumlah 10^4 koloni seperti yang dijelaskan sebelumnya Untuk uji spesifisitas, digunakan cawan media Listeria Agar acc. Ottaviani and Agosti dan Brilliance *E. coli/Coliform* selective medium. Setiap mikroorganisme non target diinokulasi untuk mendapatkan koloni yang terpisah. Cawan-cawan petri tersebut diinkubasi pada suhu yang sesuai dengan mikroorganisme target.

Penentuan Spesifisitas. Mikroorganisme non target tidak menunjukkan karakteristik visual yang sama dengan mikroorganisme target pada cawan media uji (KAN, 2019).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Produktifitas Kuantitatif

Hasil uji kinerja media uji produktifitas kuantitatif pada media selektif BPA, Brilliance *E. coli/Coliform* selective medium, VRBG agar, Listeria Agar acc. Ottaviani and Agosti dan media non selektif referensi TSA menggunakan mikroorganisme target dijabarkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil pengujian kinerja media uji produktifitas kuantitatif media selektif

Mo.	Media	McF	C1	C2	Rata-rata	N_s	N_o	P_R (N_s/N_o)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Braid Parker Agar	0,5	180	238	209	209		1,08
	Base	0,5	200	184	192		192	
<i>Escherichia coli</i>	Tryptone Soy Agar							
	Brilliance <i>E. coli/Coliform</i> selective medium	0,5	216	184	200	200		1,28
<i>Escherichia coli</i>	Tryptone Soy Agar	0,5	151	160	155,5		155,5	
	Violet Red Bile	0,5	80	85	82,5	82,5		0,88
	Glucose Agar							
<i>Listeria monocytogenes</i>	Tryptone Soy Agar	0,5	97	90	93,5		93,5	
	Listeria Agar acc. Ottaviani and Agosti	0,5	101	75	88	88		0,6
	Tryptone Soy Agar	0,5	141	140	140,5		140,5	

Keterangan: Mo= Mikroorganisme, McF= *McFarland standart*, C= Cawan petri, P_R = Rasio produktifitas, N_s =jumlah koloni pada media target, N_o =jumlah koloni pada media non target referensi.

Hasil dari pengujian kinerja media uji produktifitas kuantitatif pada media selektif dan media non selektif referensi TSA yang dijabarkan pada Tabel 2 yaitu media selektif BPA sebesar 1,08; Brilliance *E. coli/Coliform* selective medium sebesar 1,28; VRBG agar sebesar 0,88 dan Listeria Agar acc. Ottaviani and Agosti sebesar 0,6. Semua hasil pengujian diperoleh nilai P_R lebih dari 0,50 sehingga kinerja media tersebut dapat diterima.

Uji Produktifitas Kualitatif

Hasil uji kinerja media uji produktifitas kualitatif pada media selektif Listeri agar acc. Ottaviani and Agosti dan X.L.D medium menggunakan mikroorganisme target dijabarkan pada Tabel 3. Berdasarkan hasil pengujian kinerja media uji produktifitas kualitatif media selektif dengan mikroorganisme target yang dijabarkan pada Tabel 3 diperoleh hasil pertumbuhan yang baik (skor 2) dengan karakteristik koloni yang sesuai yaitu koloni berwarna hitam dengan zona transparan pada kontrol mikroorganisme *Salmonella Typhimurium* serta koloni berwarna hijau kebiruan dengan *opaque*

halo pada kontrol mikroorganisme *Listeria monocytogenes*. Oleh karena itu kinerja media tersebut dapat diterima.

Tabel 3. Hasil pengujian kinerja media uji produktifitas kualitatif media selektif

Media	Media pengujian	Kontrol mikroorganisme	Pertumbuhan	Karakteristik koloni
X.L.D medium	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Baik (2)	Koloni berwarna hitam dengan zona transparan
Listeria Agar acc. Ottaviani and Agosti	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Baik (2)	Koloni berwarna hijau kebiruan dengan <i>opaque halo</i>

Uji Selektifitas Kualitatif

Hasil uji kinerja media uji selektifitas kualitatif pada media selektif X.L.D medium, Listeria Agar acc. Ottaviani and Agosti, BPA, Brilliance *E. coli/Coliform* selective medium, dan VRBG agar menggunakan mikroorganisme non target dijabarkan pada Tabel 4.

Uji selektifitas media adalah uji tingkat penghambatan mikroorganisme non target pada atau dalam media biakan selektif pada kondisi yang ditentukan (ISO 2014; KAN 2019). Hasil pengujian kinerja media uji selektifitas kualitatif pada media X.L.D medium menggunakan mikroorganisme non target menunjukkan pertumbuhan yang tidak baik (skor 1) dengan karakteristik koloni yang tidak sesuai yaitu koloni berwarna kuning. Sedangkan hasil pengujian kinerja media uji selektifitas kualitatif media Listeria Agar acc. Ottaviani and Agosti, BPA, Brilliance *E. coli/Coliform* selective medium dan VRBG agar menggunakan mikroorganisme non target menunjukkan tidak adanya pertumbuhan pada media (skor 0). Berdasarkan hasil tersebut maka kinerja media tersebut dapat diterima.

Tabel 4. Hasil pengujian kinerja media uji selektifitas kualitatif

Media	Media pengujian	Kontrol mikroorganisme	Pertumbuhan	Karakteristik koloni
X.L.D medium	<i>Salmonella</i> spp.	• <i>E. coli</i> • <i>Enterococcus faecalis</i>	Sedikit (1) Tidak ada (0)	Koloni kuning -
Listeria Agar acc. Ottaviani and Agosti	<i>Listeria monocytogenes</i>	• <i>E. coli</i> • <i>Enterococcus faecalis</i>	Tidak ada (0) Tidak ada (0)	- -
Braid Parker Agar Base	<i>Coagulase positive Staphylococci</i>	• <i>E. coli</i>	Tidak ada (0)	-
Brilliance <i>E. coli/Coliform</i> selective medium	<i>E. coli</i> dan <i>Coliform</i>	• <i>Enterococcus faecalis</i>	Tidak ada (0)	-

VRBG Agar	<i>Enterobacteriaceae</i> • <i>Enterococcus faecalis</i>	Tidak ada (0)	-
-----------	----------------------------------------------------------	---------------	---

Uji Spesifisitas Kualitatif

Hasil uji kinerja media uji spesifisitas kualitatif pada media selektif Listeria Agar acc. Ottaviani and Agosti dan Brilliance *E. coli/Coliform* selective medium menggunakan mikroorganisme non target dijabarkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil pengujian kinerja media uji spesifisitas kualitatif

Media	Media pengujian	Kontrol mikroorganisme	Karakteristik koloni
Brilliance <i>E. coli/Coliform</i> selective medium	<i>E. coli</i> dan <i>Coliform</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Koloni berwarna putih
Listeria Agar acc. Ottaviani and Agosti	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria innocua</i>	Koloni berwarna hijau tanpa <i>opaque halo</i>

Uji spesifisitas media adalah uji indikasi pada kondisi yang ditentukan, dimana mikroorganisme non target tidak menunjukkan karakteristik visual yang sama dengan mikroorganisme target (ISO, 2014; KAN, 2019). Hasil pengujian kinerja media uji spesifisitas kualitatif pada media Listeria Agar acc. Ottaviani and Agosti menggunakan mikroorganisme non target (*Listeria innocua*) menunjukkan pertumbuhan koloni dengan karakteristik yang tidak sesuai dengan mikroorganisme target yaitu koloni berwarna hijau tanpa *opaque halo* (koloni mikroorganisme target berwarna hijau kebiruan dengan *opaque halo*). Sedangkan pada media Brilliance *E. coli/Coliform* selective medium menggunakan mikroorganisme non target (*Pseudomonas aeruginosa*) menunjukkan pertumbuhan koloni dengan karakteristik yang tidak sesuai dengan mikroorganisme target yaitu koloni berwarna putih (koloni mikroorganisme target berwarna ungu). Berdasarkan hasil tersebut maka kinerja media tersebut dapat diterima.

KESIMPULAN

Hasil yang diperoleh pada uji kinerja media uji produktifitas kuantitatif, uji produktifitas kualitatif, uji selektifitas kualitatif dan uji spesifisitas kualitatif yang dilakukan di laboratorium Cemarkan Mikroba BPMSPH pada media selektif dan non selektif menggunakan mikroorganisme target dan non target diperoleh hasil yang sesuai sehingga uji kinerja media tersebut dapat diterima.

DAFTAR PUSTAKA

[ASM] Australian Society for Microbiology. Guidelines for assuring quality of medical microbiological culture media Australia. (2012).

- Basu S, Pal A, Desai PK. Quality control of culture media in a microbiology laboratory. *IJMM*. 23 (3):159-163. (2005).
- [ISO] International Organization for Standardization. ISO 11133: 2014. Microbiology of food, animal feed and water – preparation, production and storage performance testing of culture media. (2014).
- [KAN] Komite Akreditasi Nasional. Persyaratan tambahan akreditasi pengujian laboratorium biologi. (2019).
- [USP] The United States Pharmacopeial. Microbiological best laboratory practices. *Pharm Forum*. 30(5):1713-1721. (2004).

SEKUENSING METAGENOMIK *ANTIMICROBIAL RESISTANCE GENES* (ARG) PADA SAMPEL LINGKUNGAN DI RUMAH POTONG UNGGAS MENGUNAKAN MINION NANOPORE

Puji Rahayu^{1*}, Diyan Cahyaningsari¹, Hanif Anisatun¹, Metrival¹ Fuad Alfarizi¹

¹Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

*Email korespondensi : puji_latif@yahoo.co.id

ABSTRAK

Metode sekuensing metagenomik terutama untuk keperluan diagnostik mikrobiologi selama ini terkendala dengan sulitnya proses sekuensing, biaya yang cukup besar dan lamanya waktu yang diperlukan. Penemuan baru MinION Nanopore diharapkan mampu memperkecil kendala tersebut diatas. Dengan kemampuan untuk mendeteksi gen resistensi antimikroba/*Antimicrobial Resistance Genes* (ARG), MinION diharapkan mampu mempercepat diagnosa dan penyajian profil resistensi. Menggunakan total DNA sampel air limbah pemotongan Rumah/Tempat Pemotongan Unggas (RPU/TPU) di Kota Bogor, diperoleh profil bakteri termasuk di dalamnya bakteri patogen dan juga profil resistensi pada masing-masing bakteri. MinION Nanopore mampu mengidentifikasi lebih dari 100 mikroorganisme tanpa melakukan isolasi, diantaranya ditemukan lebih dari 16 bakteri yang bersifat patogen. Selain itu MinION juga mampu mengidentifikasi 25 ARG dalam bakteri tersebut. Dengan menggunakan software bioinformatika EPI2ME ditemukan 7 target *Antimicrobial Resistance* (AMR) yaitu *Aminoglycoside Resistance*, *Beta Lactam Resistance*, *Lincosamide Resistance*, *Macrolide Resistance*, *Phenicol Resistance*, *Quinolone Resistance*, *Sulfonamide Resistance*. Sekuensing metagenomik dengan menggunakan MinION Nanopore mampu menghasilkan data secara komprehensif dan juga kemampuan untuk mendeteksi gen resistensi antimikroba (ARG) dalam jangka waktu yang tidak terlalu lama.

Kata kunci: Sekuensing Metagenomik, MinION Nanopore, *Antimicrobial Resistance* (AMR), *Antimicrobial Resistance Genes* (ARG)

PENDAHULUAN

Untuk mencegah dan mengendalikan risiko antimicrobial resistance (AMR) di sektor ternak dan kesehatan hewan, Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian menetapkan lima pendekatan strategis. Pendekatan tersebut adalah meningkatkan kesadaran dan pemahaman tentang AMR, memperkuat pengawasan dan penelitian, meningkatkan pengendalian infeksi, mengoptimalkan penggunaan antimikroba yang bijaksana dan bertanggung jawab, serta memperluas ketersediaan sumber daya berkelanjutan untuk pengobatan.

Analisis AMR secara molekuler sangat penting karena penyebaran utama AMR dikaitkan dengan akuisisi gen horizontal. Nanopore MinION adalah perangkat sekuensing portabel seukuran saku yang harganya yang terjangkau dan mampu urutan DNA / RNA secara langsung tanpa melalui proses PCR. Persiapan sampel dapat dilakukan hanya dalam 30-60 menit dan hasilnya dianalisis secara real-time.

Dengan penggunaan minION, ratusan patogen serta *antimicrobial resistance gene* (ARG) dapat diidentifikasi. Penerapan MinION diharapkan mampu membantu dalam upaya pengendalian infeksi dan penatalaksanaan antimikroba bagi kesehatan manusia, hewan, dan lingkungan. Diharapkan dengan adanya sekuensing dengan minION membantu pemerintah Indonesia dalam mendeteksi, merespons, dan mengendalikan AMR.

Tujuan dari proyek percontohan Nanopore adalah untuk menguji dan mengoptimalkan integrasi sistem Oxford Nanopore Minion ke dalam pengujian resistensi antimikroba yang ada di laboratorium

MATERI DAN METODE

MATERI

Alat yang digunakan pada mikropipet, mikrotube, *Nanodrop Spectrophotometer* (Thermo Scientific), *PCR plate cooler*, *MinION sequencing device* (Oxford Nanopore Technologies), *vial colorless*, *vial DNA LoBind*, dan *vial Protein LoBind. Nuclease-free water*, *SQK-LRK001 Field Sequencing Kit* (Oxford Nanopore Technologies), *EXP FLP001 Flow Cell Priming Kit* (Oxford Nanopore Technologies), *EXP WSH002 Flow Cell Wash Kit* (Oxford Nanopore Technologies), dan *MinION Flow Cell* (Oxford Nanopore Technologies). *PowerWater DNA kit extraction* (Qiagen).

METODE

Pengumpulan sampel

Air limbah dari rumah pemotongan hewan (n=2) yaitu RPU Bubulak dan TPU Pondok Rumput, kota Bogor, sampel diambil sebanyak 2 liter dengan cara diambil 300 mL 7 kali dengan perbedaan 5 menit setiap kali pengambilan sampel. Sampel dikumpulkan dari 20 - 30 cm di bawah permukaan air. Pengukuran suhu, pH, dan kandungan klorin dilakukan dari setiap sampel yang dikumpulkan. Sampel sebanyak 600 mL digunakan untuk sekuensing metagenomik dengan Nanopore, Sampel yang belum digunakan disimpan pada suhu 4 - 8 °C

Ekstraksi DNA - Metagenomik

Sebanyak 600 mL sampel disaring dengan menggunakan membran filter 0,45 µm. Membran filter dimasukkan ke dalam *PowerWater DNA bead tube* dengan menggunakan penjepit steril. Setelah ditambahkan 1ml larutan PW1 ke *PowerWater DNA bead tube*, kemudian divortex dengan kecepatan maksimum selama 5 menit. Tabung di sentrifuse dengan kecepatan 4000 x g selama 1 menit pada suhu kamar. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke dalam ke tube 2ml yang bersih kemudian disentrifus pada 13.000 x g selama 1 menit pada suhu kamar. Sebanyak 200 µl Solusi IRS ditambahkan kemudian

divortex dan di inkubasi pada 2-8 ° C selama 5 menit. Tabung disentrifus pada 13.000 x g selama 1 menit. Sebanyak 650 µl PW3 ditambahkan . Sebanyak 650 µl supernatan dimasukkan ke dalam spin column kemudian disentrifus pada 13.000 x g selama 1 menit .Tempatkan Filter MB *Spin Column* ke dalam *tube collection* 2 ml yang bersih. Kemudian sebanyak 650 µl PW4 ditambahkan dan disentrifuge pada 13.000 x g selama 1 menit. Untuk elusi sebanyak 100 µl EB ditambahkan pada posisi tengah membran filter kemudian disentrifus pada 13.000 x g selama 1 menit. Jika DNA akan di gunakan dalam seminggu maka simpan pada suhu 4° C, jika DNA akan dipakai untuk waktu yang masih lama sebaiknya disimpan dalam freezer (-20° C hingga -80° C).

Pemeriksaan Kualitas DNA

Menggunakan *Nanodrop Spektrophotometer*, dilakukan uji terhadap konsentrasi dan kemurnian DNA.

Persiapan DNA untuk sekuensing metagenomik

Untuk memulai persiapan sekuensing Minion, dibutuhkan ~ 400ng DNA genom dalam 10 µl cairan. Untuk mengetahui kualitas *flowcell MinION* perlu dilakukan uji terhadap *active pores* pada *flowcell* tersebut. Jika pori-pori aktif kurang dari 800 disarankan untuk mengganti *flowcell*. Kit yang digunakan untuk sekuensing metagenomik adalah *rapid field sequencing*. Pada kit tersebut terdapat tiga buah tabung kecil yang didalamnya sudah terkandung beberapa reagen. Sebanyak 10 µl DNA dimasukkan ke dalam tube 1. Dengan pipet DNA dihomogenkan dengan reagen yang dalam dalam tube. Kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 1 menit dan kemudian pada 80° C selama 1 menit. Untuk pemasangan adaptor, menggunakan ujung pipet kosong yang bersih, kertas timah dilubang dari tabung 2 kemudian sebanyak 10 µl DNA dipindahkan cairan dari tube 1 ke tube 2. Kemudian inkubasi selama 5 menit pada suhu kamar. Dengan menggunakan ujung pipet kosong yang bersih foil tube 3 dibuka. Sebanyak 65 µl *Resuspension Buffer* (RTB) ditambahkan ke dalam tube 3.

Sekuensing metagenomik

Setelah *flowcell* selesai dilakukan pengecekan sehingga siap untuk digunakan, tutup *priming port* dari *flowcell* dibuka searah jarum jam sehingga *priming port* terlihat. *Priming mix* dibuat dengan menambahkan 30 µl FLT ke tabung FLB. Sebanyak 800 µl *priming mix* dimasukkan melalui *priming port* dan didiamkan dalam suhu kamar selama 5 menit. Sebanyak 65 µl larutan ditambahkan dari tube 3 ke dalam tube 2. Sebanyak 75 µl sampel (campuran dari tube 2 dan tube 3) dimasukkan ke dalam *flowcell* melalui *sampel port* (SpotON) dengan cara *dropwise*. Dengan perlahan pasang kembali penutup *sampel port*.

Analisis bioinformatik

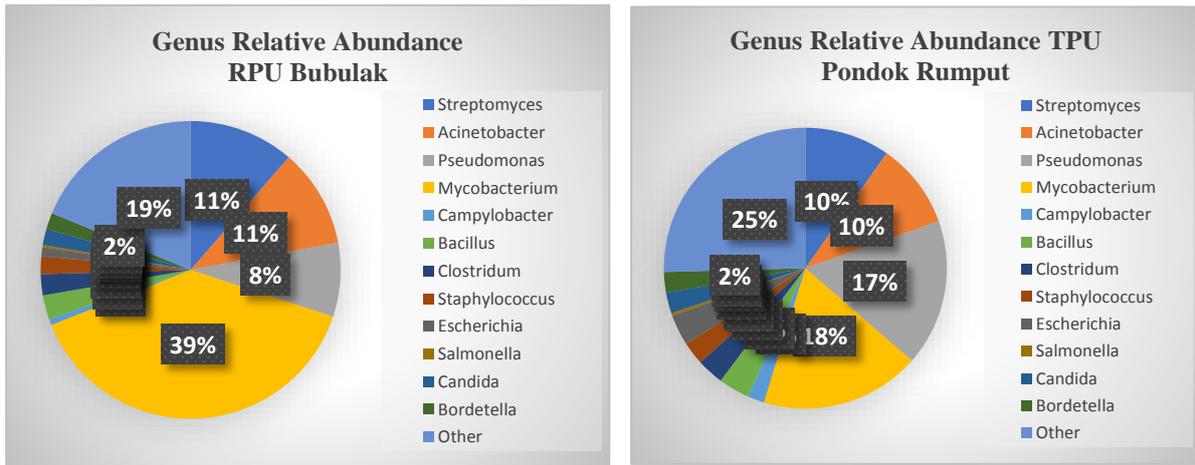
Untuk analisa bioinformatik dilakukan dengan cara menggunggah data hasil sekuensing dalam bentuk *FASTQ file* ke dalam software EPI2ME.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Munculnya resistensi antibiotik pada manusia menjadi ancaman kesehatan masyarakat global yang sangat signifikan dan terus berkembang. Munculnya dan penyebaran *antimicrobial resistance gene* (ARG) telah mengangkat masalah kesehatan masyarakat menjadi suatu hal yang serius. Rumah potong hewan sebagai salah satu penghubung antara dunia peternakan dan manusia memiliki keragaman mikroba sangat besar, hal tersebut memungkinkan terjadinya pertukaran ARG dengan cara *horizontal Gen Transfer* (HGT).

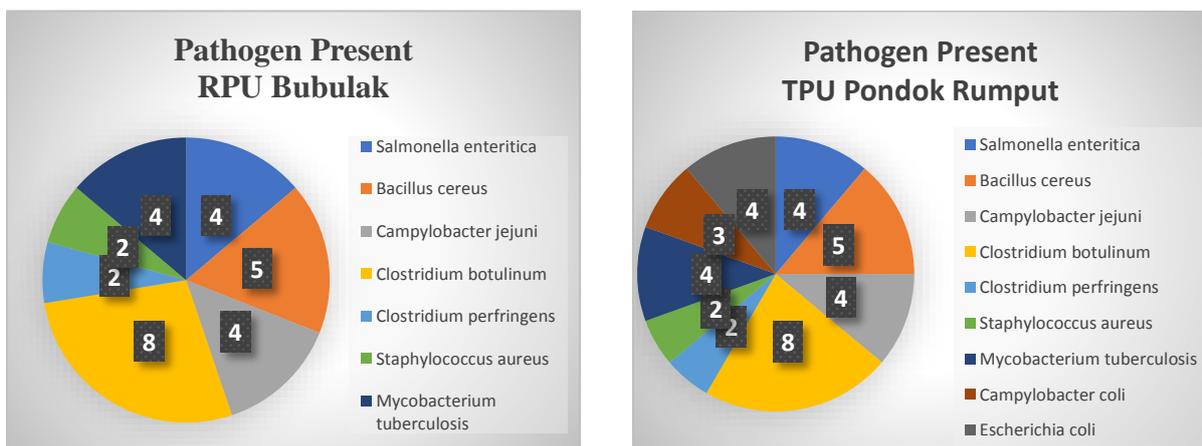
Teknologi sequencing generasi ketiga, termasuk Pacific Biosciences (PacBio) dan Oxford Nanopore, mampu menghasilkan pembacaan sekuen yang cukup panjang (Karlson *et al.*, 2015) dibandingkan dengan Platform PacBio, MinION memiliki kelebihan menghasilkan data mentah secara real time dan proses sekuensing menjadi lebih mudah karena proses pengerjaan sekuensing tanpa di dahului dengan proses PCR sehingga lebih cepat dan efisien termasuk untuk deteksi struktural yang sangat kompleks (Che *et al.*, 2019).

Seperti terlihat pada gambar 1 sekuensing metagenomik dengan alat MinION Nanopore mampu melakukan proses sekuensing dengan cepat, memberikan profil genetik serta melacak host ARG, khususnya untuk potensi patogen pembawa ARG dari sampel lingkungan di RPU. Dari diagram tersebut MinION mempunyai kemampuan untuk melakukan deteksi terhadap berbagai macam mikroorganisme yang ada dalam sampel air dari RPU. Berdasarkan persentase hampir mikroorganisme yang ditemukan adalah bakteri (76%), eukariot (21%), archaea (2%) dan virus (<1%). Pada RPU Bubulak komposisi mikroroganisme berdasarkan genus yang didapatkan adalah Mycobacterium (39%), Streptomyces (19%), Campylobacter (11%), Acinetobacter (11%), Pseudomonas (8%), Escherichia (2%), Salmonella (3%), Clostridium (2%), Bacillus (1%) mikroorganisme yang lain (3%). Sedangkan pada TPU Pondok Rumput mikroorganisme yang berhasil ditemukan adalah bakteri (98%), eukariot (2%), archaea (<1%) dan virus (<1%). Pengelompokan mikroorganisme berdasarkan genus didapatkan hasil Mycobacterium (18%), Streptomyces (10%), Campylobacter (25%), Acinetobacter (10%), Pseudomonas (17%), Escherichia (4%), Salmonella (3%), Clostridium (2%), Bacillus (2%) mikroorganisme yang lain (9%).



Gambar 1. Persentase keberadaan bakteri hasil sekuensing metagenomik

Dari total 34 genus bakteri yang teridentifikasi dengan MinION, ditemukan beberapa spesies pada RPU Bubulak yakni *Salmonella enteritica*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* dan *Mycobacterium tuberculosis*. Sedangkan pada TPU Pondok Rumput bakteri yang bersifat pathogen yang ditemukan diantaranya *Salmonella enteritica*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli O15*.

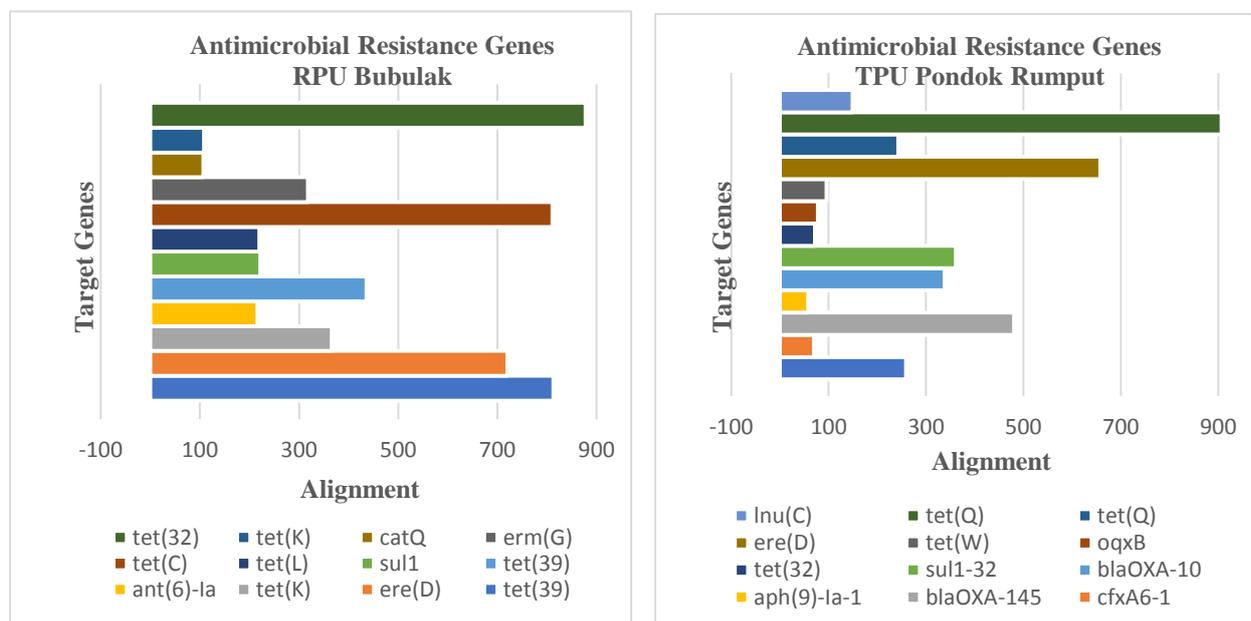


Gambar 2. Keberadaan bakteri pathogen hasil sekuensing metagenomik

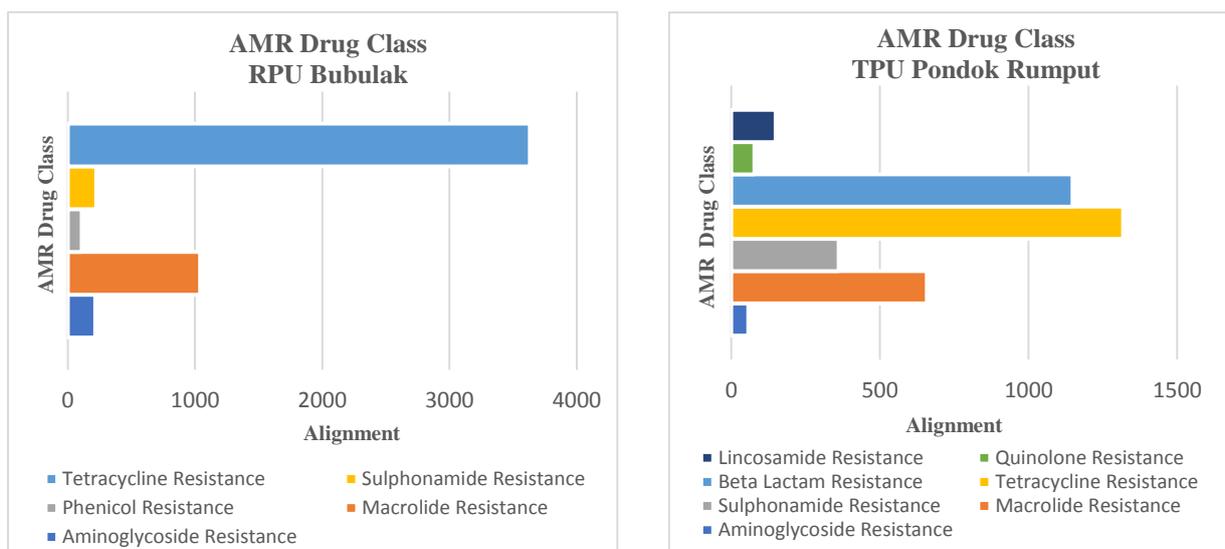
Berdasarkan gambar 3 terlihat bahwa *Antimicrobial resistance gene* (ARG) yang terdeteksi pada sampel tersebut adalah tet(39), ere(D), tet(K), ant(6)-Ia, tet(39), sul1, tet(L), tet(C), erm(G), catQ, tet(K) dan tet(32) Sedangkan pada sampel TPU Pondok Rumput beberapa kelompok bakteri sudah bersifat resisten terhadap setidaknya 7 golongan antibiotik diantaranya aminoglycoside, macrolide, sulphonamide,

tetracycline, beta lactam, quinolone dan lincosamide. Gen penyandi resistensi antibiotik yang terdeteksi oleh MinION antara lain blaOXA-118, cfxA6-1, blaOXA-145, aph(9)-Ia-1, blaOXA-10, sul1-32, tet(32), oqxB, tet(W), ere(D), tet(Q) dan tet(Q).

Berdasarkan hasil sequencing menggunakan MinION, sejumlah bakteri dari RPU Bubulak dan TPU Pondok Rumput telah resistan terhadap leebih dari 5 golongan antibiotik . Dari gambar 4 dapat dilihat bahwa pada RPU Bubulak bakteri yang ditemukan telah bersifat ressitent terhadap setidaknya 5 golongan antibiotik yaitu tetrasiklin, phenicol, aminglikosida, sulfonamide dan makrolida,. Sedangkan pada TPU Pondok Rumput bakterinya sudah ditemuak sudah resisten setidaknya terhadap 7 golongan antibiotika diantaranya lincosamid, beta laktam, sulfonamid, aminoglikosida, makrolida dan tetrasiklin.



Gambar 3. Antimicrobial Resistance Genes (ARG) pada RPU Bubulak dan TPU Pondok Rumput



Gambar 4. *Antimicrobial Resistance* berdasarkan golongan antibiotik pada RPU Bubulak dan TPU Pondok Rumpit.

Dengan kemampuan untuk mendeteksi gen resistensi antimikroba/Antimicrobial Resistance Genes (ARG), MinION diharapkan mampu mempercepat diagnosa dan penyajian profil resistensi. Dari hasil sekuensing dengan menggunakan alat ini diperoleh profil bakteri termasuk di dalamnya bakteri patogen dan beserta informasi mengenai profil resistensi pada masing-masing bakteri. Kemampuan untuk mengidentifikasi dan mengukur spesies menjadi aplikasi penting terutama dalam bidang kesehatan dan peternakan (Peel et al., 2019). Proses sekuensing metagenomik dan pengurutan seluruh genom semakin banyak digunakan untuk diagnostik dan laboratorium klinis untuk mendeteksi organisme patogen dan potensi ARG yang dibawanya (Deshpande et al., 2019).

Pada awal penggunaan antibiotik diasumsikan bahwa terminologi *antimicrobial resistance* (AMR) tidak mungkin terjadi (Van Hoek et al., 2011). Sayangnya, waktu telah membuktikan sebaliknya. Awalnya tidak ada yang mengantisipasi mikroba akan bereaksi terhadap serangan berbagai bahan kimia dalam antibiotik dengan menyesuaikan diri di lingkungan serta mengembangkan sifat resistensi terhadap antibiotik menggunakan berbagai macam mekanisme. Selain itu, kemampuan mereka untuk bertukar gen, yang sekarang dikenal sebagai *horizontal gen transfer* (HGT) menegaskan bahwa resistensi sebenarnya dimulai muncul bahkan sebelum antibiotik pertama penisilin ditemukan (Van Hoek et al., 2011).

Mikroba menjadi resisten terhadap antimikroba melalui sejumlah mekanisme diantaranya permeabilitas berubah pada dinding sel bakteri yang membatasi akses antimikroba ke situs target, pengeluaran aktif antibiotik dari sel mikroba, modifikasi enzimatik dari antibiotik, degradasi agen antimikroba, akuisisi jalur metabolisme alternatif untuk mereka yang dihambat oleh obat, modifikasi target antibiotik, overproduksi enzim target (Wright 2005).

Identifikasi bakteri yang bersifat pathogen juga sangat diperlukan karena adanya mekanisme antimicrobial resistance patogen (ARP) diperlukan selalu melakukan kontrol terhadap bakteri pathogen apa saja yang dalam sampel lingkungan RPU sebagai data dasar untuk mengetahui sejauh mana RPU mempunyai potensi untuk penyebaran ARG secara luas ke dalam lingkungan. Selain itu identifikasi ARP diperlukan untuk kontrol patogen yang efektif dalam pengolahan air limbah. Sifat real-time dan kecepatan dalam pembacaan sekuensing Nanopore memungkinkan untuk melakukan proses identifikasi sekaligus pelacakan terhadap ARP potensial dalam IPAL (Che et al., 2019). Seperti ditunjukkan pada Gambar 2.

Gen resistensi antimikroba dalam sebuah sampel dapat diidentifikasi dari data metagenomik (Wang et al., 2016). Dari hasil sekunsing dengan minION diperoleh hasil mikroba sudah mengalami resisten terhadap 8 golongan antibiotik diantaranya aminoglycoside, macrolide, phenicol, sulphonamide, tetracycline, beta lactam, quinolone dan lincosamide. Sifat resisten terhadap golongan aminoglycoside dibawa oleh ARG APH (9)-Ia yang banyak ditemukan pada bakteri *Enterococcus* dan *Escherichia* (Van Hoek et al., 2011). Sifat resistensi terhadap golongan macrolide setidaknya dibawa oleh 2 ARG yaitu *ere(D)* dan *erm(G)* dimana *ere(D)* banyak ditemukan pada *Bacillus* dan *Salmonella* sedangkan *erm(G)* banyak ditemukan pada *Bacillus*, *Bacteroides*, *Catenibacterium*, *Lactobacillus* (Van Hoek et al., 2011). ARG penyebab resistensi terhadap golongan quinolone dibawa oleh *oqxB* ditemukan pada *Escherichia coli* (Hansen 2004). Gen pembawa sifat resistensi pada golongan phenicol yang diperoleh adalah *catQ* yang banyak ditemukan pada *Clostridium* dan *Streptococcus*. Resistensi terhadap golongan tetracycline dibawa oleh keberadaan banyak ARG, setidaknya ada 6 gen pembawa resistensi yang ditemukan yaitu *tet(32)*, *tet(W)*, *tet(Q)*, *tet(39)*, *tet(L)*, *tet(C)* yang banyak ditemukan pada 23 genus bakteri diantaranya yang bersifat pathogen seperti *Enterococcus*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pasteurella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Vibrio* dan 13 genus bakteri lainnya (Van Hoek et al., 2011). Untuk golongan sulphonamide hanya ditemukan 1 ARG yaitu *sulI* yang terdapat pada kelompok bakteri *Salmonella* (Antunes 2005). Resistensi terhadap golongan antibiotik beta lactam dibawa oleh 4 ARG yaitu *blaOXA-11*, *blaOXA-145*, *blaOXA-10* dan *cfxA6-1* yang banyak terdapat pada *Acinetobacter*, *Klepsiella*, *Staphylococcus* dan *Streptococcus* (Hoang Quoc et al., 2019)

Dari hasil analisis baik terhadap keberadaan ARG maupun sifat resistensi mikroba terhadap golongan antibiotika sangat beragam dan masing-masing memiliki pola tersendiri yang tidak sama apabila dibandingkan antar RPU. Hal ini dapat dijadikan dasar bahwa perkembangan resistensi antimikroba sudah sangat luas terbukti dengan adanya mikroba-mikroba yang mempunyai resistensi bahkan terhadap dua atau lebih golongan antibiotika. Mengetahui hal ini perlu ditekankan bahwa idealnya, memonitor kondisi resistensi yang cepat untuk karakterisasi beragam ARG yang ditemukan di lingkungan yang berbeda sangat dibutuhkan (Arango-Argoty et al., 2019.)

Skema pemeringkatan yang dikembangkan baru-baru ini telah mengusulkan bahwa ARG yang ditemukan dalam mikroba pathogen harus diklasifikasikan sebagai ARG berisiko tinggi, sementara resistensi pada spesies bakteri tertentu yang tidak bersifat pathogen akan dianggap hanya sebagai penanda

keberadaan bakteri tersebut. Semua hasil sekuen yang memberikan informasi mengenai ARG harus ditelusuri asal taksonomi atau genetik mereka untuk mengevaluasi risiko yang terkait dengan ARG di lingkungan serta potensi penularannya ke manusia. Dengan menggunakan pendekatan ini, dimungkinkan untuk mendeteksi inang bakteri ARG terutama yang berkaitan erat dengan penyakit pada manusia serta proses pengobatannya (Kamathewatta *et al.*, 2019).

Pemetaan mikroba yang sudah menunjukkan sifat resistensi terhadap beberapa antibiotik penting secara klinis. Penyebaran mikroba inidi lingkungan, terutama genangan air mengkhawatirkan karena karena bahan genetik dari mikroba ini dapat ditransmisikan dari bakteri yang hidup dalam limbah cair yang berasal dari rumah pemotongan hewan ke lingkungan dan akhirnya ke manusia melalui rantai makanan yang terkontaminasi. Ini bisa menjadi sumber infeksi yang tidak dapat diobati pada manusia dan hewan.

Pengurangan konsumsi antibiotik tidak akan cukup untuk mengendalikan resistensi antimikroba karena penularan melalui penyebaran gen resistansi (ARG) tampaknya menjadi faktor penyumbang dominan dalam peningkatan kasus resistensi. Meningkatkan sanitasi, meningkatkan akses ke air bersih, dan memastikan tata kelola RPU dan peternakan yang baik, meningkatkan pengembangan terhadap pengujian resistensi antimikrobia serta mengatur sektor kesehatan dan peternakan dengan lebih baik terutama dalam pengendalian pemakaian antibiotik semuanya diperlukan untuk mengurangi resistensi antimikroba global (Collignon 2018).

Teknik sekuensing dengan MinION dapat memberikan gambaran yang komprehensif untuk mengetahui profil patogen cepat dari sampel tanpa kultur serta mampu memberikan informasi yang cukup mengenai keberadaan ARG (Schmidt *et al.*, 2017). Untuk memvalidasi hasil sekuensing dengan MinION dengan menggunakan DNA yang sama dilakukan sekuensing dengan PacBio dengan akurasi > 99%) dari dua metode sekuensing (Van der Helm *et al.*, 2017). Hal ini memberikan bukti bahwa sekuensing dengan MinION memberikan hasil yang sama baiknya dengan metode sekuensing yang lain.

KESIMPULAN

Metode sekuensing metagenomik dengan menggunakan MinION mampu memberikan banyak informasi diantaranya keberadaan berbagai mikroba, mengidentifikasi mikroba patogen, *antimicrobial resistance gene* (ARG) yang terdapat pada mikroba serta sifat resistensi mikroba tersebut pada beberapa golongan antibiotik. Hasil analisis baik terhadap keberadaan ARG maupun sifat resistensi mikroba terhadap golongan antibiotika sangat beragam dan masing-masing memiliki pola tersendiri yang tidak sama apabila dibandingkan antar RPU. Hal ini dapat dijadikan dasar bahwa perkembangan resistensi antimikrobia sudah sangat luas terbukti dengan adanya mikroba-mikroba yang mempunyai sifat resistensi bahkan terhadap dua atau lebih golongan antibiotika. Diperlukan analisis bioinformatika lebih lanjut untuk mendalami mengenai mekanisme kerja dari ARG dalam penyebaran sifat resistensi.

DAFTAR PUSTAKA

- Antunes, P, Machado J, Sousa JC, Peixe L. 2005. Dissemination of sulfonamide resistance genes (sul1, sul2, and sul3) in Portuguese Salmonella enterica strains and relation with integrons. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(2), 836–839.
- Arango-Argoty GA., Dai D, Pruden A. 2019. NanoARG: a web service for detecting and contextualizing antimicrobial resistance genes from nanopore-derived metagenomes. *Microbiome* 7, 88.
- Castro-Wallace SL, Chiu CY, John KK, Stahl SE, Rubins KH, McIntyre ABR, Dworkin, JP, Lupisella ML, Smith DJ, Botkin DJ. 2017. Nanopore DNA sequencing and genome assembly on the International Space Station. *Sci. Rep.*
- Che, Y, Xia Y, Liu L. 2019. Mobile antibiotic resistome in wastewater treatment plants revealed by Nanopore metagenomic sequencing. *Microbiome* 7, 44.
- Collignon P, John Jb, Timothy RW, Sumanth G, Ramanan L. 2018. Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. *Lancet Planet Health* 2018; 2: 398-405.
- Deshpande, Reed, Sullivan, Raymond, Kerkhof, Beigel, Wade. (2019). Offline Next Generation Metagenomics Sequence Analysis Using MinION Detection Software (MINDS). *Genes*. 10. 578.
- Hansen, LH, Johannesen E, Burmølle M, Sørensen AH, Sørensen SJ. 2004. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in Escherichia coli. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(9), 3332–3337.
- Hoang Quoc C, Nguyen TP, Nguyen T, Duc H, Tran LT, Tran TT, Nguyen TS, Phan TL. 2019. Carbapenemase Genes and Multidrug Resistance of Acinetobacter Baumannii: A Cross Sectional Study of Patients with Pneumonia in Southern Vietnam. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 8(3), 148.
- Kamathewatta KI, Bushell RN, Young ND, Stevenson MA, Billman-Jacobe H. 2019 Exploration of antibiotic resistance risks in a veterinary teaching hospital with Oxford Nanopore long read sequencing. *PLOS ONE* 14(5).
- Karlsson E, Lärkeryd Adrian, Sjödin A, Forsman M, Stenberg P. 2015. Scaffolding of a bacterial genome using MinION nanopore sequencing. *Scientific reports*.
- Peel N, Dicks L, Heavens D, Percival-Alwyn L, Cooper C, Clark M, Davies R, Leggett R, Yu D. 2019. Semi-quantitative characterisation of mixed pollen samples using MinION sequencing and Reverse Metagenomics (RevMet).
- Reddington K, David E, Justin O, Devin MD, Lars HH, Tue KN, Anne-Lise D, Richard ML, Darren H, Ned P, Terrance PS, Anthony B, Spyridon O, Ioannis R, Thomas B, Eric VDH, Dino J, Hollian R, Hans J, John RT, Miten J, Bonnie LB. 2020. Metagenomic analysis of planktonic riverine microbial consortia using nanopore sequencing reveals insight into river microbe taxonomy and function, *GigaScience*, Volume 9, Issue 6.
- Russell JA, Campos B, Stone J, Blosser EM, Burkett-Cadena N, Jacobs JL. 2018. Unbiased strain-typing of Arbovirus directly from mosquitoes using Nanopore sequencing: A field-forward biosurveillance protocol. *Sci. Rep.*
- Schmidt K, Mwaigwisya L, Crossman M, Doumith D, Munroe C, Pires A, Khan N, Woodford NJ, Saunders J, Wain J, O'Grady D, Livermore M. 2017. Identification of bacterial pathogens and

- antimicrobial resistance directly from clinical urines by nanopore-based metagenomic sequencing, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 72, Issue 1, January 2017, Pages 104–114.
- van der Helm, E, Imamovic L, Hashim E, van Schaik W, Koza A, Sommer M. 2017. Rapid resistome mapping using nanopore sequencing. *Nucleic acids research*, 45(8), e61.
- Van Hoek, AH, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJ. 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in microbiology*, 2, 203.
- Wang K, Li P, Lin Y, Chen H, Yang L, Li J, Zhang T, Chen Q, Li Z, Du X, Zhou Y, Li P, Wang H, Song H. 2020. Metagenomic Diagnosis for a Culture-Negative Sample From a Patient With Severe Pneumonia by Nanopore and Next-Generation Sequencing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10. 182.
- Wright GD. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1451–1470.

**PENGUJIAN RESIDU QUINOLON PADA DAGING AYAM TAHUN 2020
DENGAN METODE *ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY* (ELISA)
MENGUNAKAN KIT I'SCREEN QUINO**

Oli Susanti^{1*}, Sani Susanty¹, Riska Desitania¹, Attya Asuh Insani¹

¹Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

*Email korespondensi : iban_atar@yahoo.co.id

ABSTRAK

Selama Tahun 2020, tepatnya dari bulan Januari hingga November 2020, Laboratorium Residu Obat dan AMR, Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan telah menguji residu quinolon pada 37 sampel daging ayam dengan metode ELISA menggunakan Kit I'Screen Quino dari Tecna. Dari pengujian tersebut didapatkan 10 sampel (27%) tidak terdeteksi residu quinolon, dan 27 (73%) sampel terdeteksi residu quinolon. Hasil ini menunjukkan bahwa metode pengujian saat ini cukup memadai digunakan untuk mengendalikan residu quinolon pada daging ayam. *Limit Of Detection* (LOD) yang cukup rendah, yaitu 0,6 ppb untuk sampel daging, kit ELISA yang digunakan cukup sensitif untuk deteksi residu quinolon. Untuk melindungi konsumen dari paparan antibiotik, khususnya golongan quinolon, disarankan untuk menerapkan metode yang lebih ekonomis dan efisien untuk skrining residu quinolon pada daging ayam sehingga bisa diterapkan untuk pengujian dengan jumlah sampel yang lebih banyak.

Kata kunci : ELISA Kit, residu quinolon, daging ayam.

PENDAHULUAN

Penemuan antibiotik membawa dampak besar bagi kesehatan manusia dan ternak. Seiring dengan berhasilnya pengobatan dengan menggunakan antibiotik, maka produksinya semakin meningkat (Phillips *et al.*, 2014). Pemberian antibiotik pada industri peternakan selain untuk pencegahan dan pengobatan penyakit, juga digunakan sebagai aditif pakan (feed additive) untuk memacu pertumbuhan (growth promoter), meningkatkan produksi, dan meningkatkan efisiensi penggunaan pakan (Bahri *et al.*, 2005). Penggunaan antibiotik yang tidak memperhatikan masa henti obat akan menimbulkan residu antibiotik pada produk pangan hewan (Dewi *et al.*, 2014). Salah satu antibiotik yang digunakan pada hewan adalah antibiotik golongan Quinolon. Quinolon (fluoroQuinolon) adalah antibiotik broad spectrum yang mempunyai mekanisme menghambat sintesis asam nukleat. FluoroQuinolon secara luas digunakan pada hewan untuk mengobati penyakit *Chronic Respiratory Disease* (CRD) complex, pneumonia, infeksi kulit, jaringan lunak dan saluran kemih (Brown, 1996). Oleh karena itu dibutuhkan suatu metode yang cepat, sederhana, dan akurat untuk analisis kontaminan pada produk pangan hewan.

Metode immunoassay bekerja berdasarkan spesifitas reaksi antara antigen dan antibodi. Karena memiliki kemampuan untuk menganalisis analit dalam konsentrasi rendah, metode ini sangat berguna untuk pemantauan lingkungan dan analisis keamanan pangan dimana kontaminan atau residu biasanya ada dalam jumlah yang sangat kecil dan tidak dapat dideteksi secara akurat dengan metode konvensional. Metode ini mempunyai keunggulan yaitu sangat sensitif, spesifik, dan memiliki akurasi yang tinggi. Keuntungan khusus lainnya yaitu sederhana, cepat, dapat menganalisis sampel dalam jumlah yang banyak secara simultan, serta tersedia kits untuk analisis senyawa tunggal maupun multi komponen dalam suatu sampel (Toldra dan Reig, 2006). Analisis untuk mengetahui komposisi suatu produk sangat beragam. Salah satu penentuan komposisi pangan hewani dapat menggunakan teknik *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

Teknik ELISA telah banyak digunakan untuk analisis fluoroQuinolon residu dalam daging, jaringan hewan yang dapat dimakan (*animal edible tissues*), susu, telur, udang, dan belut. ELISA melibatkan enzim, yaitu suatu protein yang mengkatalisis reaksi biokimia (Rohima dan Nurminabari 2018). ELISA membutuhkan tahapan penambahan dan reaksi reagensia ke dalam suatu senyawa terikat fase padat (*solid phase bound substance*), melalui inkubasi dan pemisahan molekul terikat dan bebas menggunakan tahapan pencucian. Reaksi enzimatik digunakan untuk menghasilkan warna dan analisis kuantifikasi.

Larangan penggunaan antibiotik sebagai pemacu pertumbuhan berlaku efektif mulai Januari 2018. Seiring dengan itu, Kementerian Pertanian memperketat pengawasan terhadap integrator dan peternak mandiri. Larangan penggunaan antibiotik sebagai imbuhan pakan tertuang dalam Pasal 16 Permentan No 14/2017 tentang Klasifikasi Obat Hewan. Dalam pasal 17 disebutkan bahwa dalam hal terapi, antibiotik dapat dicampur dalam pakan dengan dosis terapi dan lama pemakaian maksimal tujuh hari.

Waktu henti obat hewan sangat bervariasi, bergantung pada: 1) jenis obat, 2) spesies hewan, 3) faktor genetik ternak, 4) iklim setempat, 5) cara pemberian, 6) dosis obat, 7) status kesehatan hewan, 8) produk ternak yang dihasilkan, 9) batas toleransi residu obat, dan 10) formulasi obat. Oleh karena itu, sudah sewajarnya setiap perusahaan yang memproduksi obat hewan mencantumkan keterangan secara jelas tentang waktu henti pemberian obat. Waktu henti pemberian obat hewan yang tidak dipatuhi menyebabkan terjadinya residu obat hewan pada produk ternak.

Analisis untuk mengetahui komposisi suatu produk sangat beragam. Salah satu penentuan komposisi pangan hewani dapat menggunakan teknik *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Tujuan tulisan ini adalah untuk melakukan analisis residu antibiotik golongan Quinolon dalam daging ayam segar tahun 2020 dengan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

I'screen QUINO adalah kit yang disiapkan untuk uji imunoenzimatik untuk analisis kuantitatif quinolon pada daging, ikan, udang, dan madu.

Inhibitor Gyrase dibagi menjadi empat subkelompok. Mayoritas quinolon termasuk dalam subkelompok fluoroquinolon, yang memiliki gugus fluoro yang melekat pada sistem cincin pusat, biasanya di posisi ke-6. Fluoroquinolon disebut quinolon generasi kedua. Beberapa di antaranya diakui sebagai antibiotik dalam kedokteran hewan untuk hewan penghasil makanan. Fluoroquinolon adalah antibiotik spektrum luas terhadap banyak spesies bakteri. Mereka sering digunakan dalam kedokteran hewan terutama untuk sapi, babi dan ayam. Penggunaan fluoroquinolon telah meningkat dalam beberapa tahun terakhir karena sejumlah besar fluoroquinolon diterapkan untuk mencegah penyakit menular, terutama pada peternakan ayam, babi dan ikan / udang.

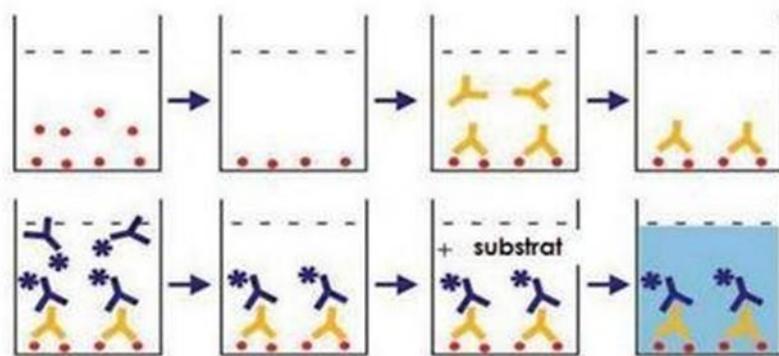
TINJAUAN PUSTAKA

Metode ELISA

Metode ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) didasarkan pada kerja imunologi yang dikombinasi dengan reaksi enzimatik, reaksi imunologi dalam sistem ELISA adalah adanya ikatan antigen-antibodi atau sebaliknya. Reaksi enzimatik antara enzim dan reaktan digunakan untuk menandakan adanya reaksi yang kemudian dapat diukur secara kualitatif berdasarkan pada perubahan warna dalam sistem (Rohima, 2018). Berdasarkan sistem kerja dalam reaksinya, ELISA terbagi menjadi empat kelompok yaitu direct ELISA, indirect ELISA, sandwich ELISA, dan Competitive ELISA.

Direct ELISA

Direct ELISA adalah salah satu jenis ELISA yang paling sederhana dalam reaksinya. Jenis ELISA ini hanya membutuhkan antigen, antibodi, enzim, dan substrat (Sirois, 2016).



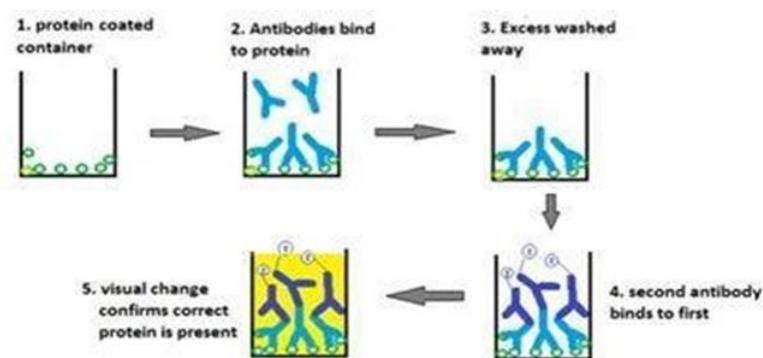
Gambar 1. Skema Direct ELISA

Antigen dilapiskan pada fase padat. Antibodi primer berikatan dengan antigen. Antibodi sekunder substrat yang tidak berwarna diubah oleh enzim menjadi senyawa berwarna (Sudjadi dan Rohman, 2018).

Indirect ELISA

Teknik ini merupakan teknik ELISA yang paling sederhana, hanya saja dalam teknik ini yang dideteksi dan diukur konsentrasinya merupakan antibodi.

Indirect ELISA merupakan jenis ELISA yang digunakan untuk mendeteksi dan mengukur konsentrasi antigen atau antibodi. Teknik tersebut memiliki karakteristik, yaitu antigen tidak menempel langsung pada antibodi detektor (indirect). Antibodi akan berikatan dengan antibodi lain terlebih dahulu. Antibodi tersebut kemudian akan berikatan dengan antibodi yang telah dilabeli. Indirect ELISA menggunakan suatu antigen spesifik (monoclonal) serta antibodi sekunder spesifik yang tertaut enzim sinyal untuk mendeteksi keberadaan antibodi yang diinginkan pada sampel yang diuji.



Gambar 2. Skema Indirect ELISA (Baid, 2016)

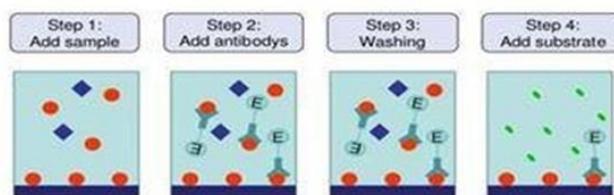
Sandwich ELISA

Sandwich ELISA digunakan untuk deteksi antigen sampel. Permukaan microwell terikat sejumlah tertentu antibodi pengikat antigen. Permukaan microwell kemudian ditemplei protein penghalang sehingga tidak akan terjadi ikatan nonspesifik. Pada microwell selanjutnya ditambahkan sampel yang mengandung antigen. Microwell dicuci untuk menghilangkan antigen yang tidak terikat pada antibodi. Antibodi spesifik selanjutnya ditambahkan sehingga mengikat antigen (sandwich: antigen terletak di antara dua antibodi). Antibodi sekunder yang membawa enzim sebagai antibodi penunjuk ditambahkan yang kemudian berikatan dengan bagian antibodi (nonspesifik). Absorbansi pada microwell diukur untuk menentukan keberadaan dan jumlah antigen.

Competitive ELISA

Mekanisme reaksi utama pada competitive ELISA adalah proses persaingan ikatan oleh antigen sampel dan antigen yang ditambahkan (Sudjadi dan Rohman 2018). Immunoassay kompetitif ini merupakan pengujian untuk mengukur konsentrasi antigen. Antigen sampel bersaing dengan antigen referensi untuk mengikat sejumlah antibodi berlabel tertentu. Antigen referensi sebelumnya sudah dilapisi pada multiwell. Beberapa kit ELISA kompetitif menggunakan antigen berlabel bukan antibodi berlabel. Antigen berlabel dan antigen sampel (tidak berlabel) bersaing untuk mengikat

antibodi primer. Semakin rendah jumlah antigen dalam sampel, semakin kuat warna atau sinyal yang dihasilnya karena lebih banyak antigen berlabel di dalam microwell.



Gambar 3. Skema Competitive ELISA (Baid, 2016)

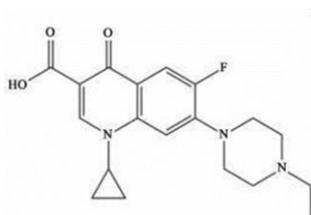
ELISA kompetitif secara luas digunakan untuk mendeteksi kontaminan dengan berat molekul kecil di dalam makanan seperti mikotoksin, pestisida, dan antibiotik. ELISA kompetitif terdiri dari direct competitive ELISA, dimana antibodi didekatkan di atas fase padat dan indirect competitive ELISA, dimana antigen yang didekatkan di atas fase padat. Direct competitive ELISA berkenaan dengan pengujian yang mana antibodi dilekatkan pada sebuah fase padat. Kemudian, analit dan enzyme-labeled competing agent ditambahkan secara bersamaan untuk bersaing dengan bagian perlekatan antibodi yang terbatas (limited antibody binding sites). Setelah inkubasi, setiap reagen yang tidak terikat dihilangkan dengan pencucian. Selanjutnya, larutan substrat ditambahkan untuk menghasilkan warna. Pada indirect competitive ELISA prinsip kerjanya adalah antigen yang dilekatkan pada sebuah solid phase. Setelah pencucian, analit dan antibodi ditambahkan secara bersamaan. Secondary labeled antibodi digunakan untuk mendeteksi antibodi primer yang telah berikatan dengan antigen pada solid phase. Setelah inkubasi dan pencucian, larutan substrat ditambahkan untuk menghasilkan warna.

Quinolon dan Turunannya

Quinolon merupakan seri dari antibakteri yang diturunkan dari asam nalidiksat. Struktur utamanya tersusun dari 1-substituted-1, 4-dihidro-4- oksopiridin-3-karboksilat dan kelompok aromatik (cincin tunggal atau ganda). Quinolon diklasifikasikan sebagai generasi pertama, kedua, dan ketiga berdasarkan dari spektrum antibakterianya. Berdasarkan struktur kimianya, antibakterial Quinolon dibagi menjadi dua kategori. Kategori pertama termasuk antibakteri yang mengandung piridon-asam karboksilat, seperti flumequine, asam oxolinic, asam nalidiksat, yang memiliki aktivitas antibakteri yang baik terhadap bakteri Gram negatif. Kategori kedua (dan ketiga) merupakan fluoroQuinolon yang mengandung atom fluor pada posisi rantai C-6 dan golongan piprazinil pada rantai C-7 seperti ciprofloxacin, enrofloxacin, levofloxacin, ofloxacin, yang memiliki antibakteri broad spectrum terhadap bakteri Gram negatif, bakteri Gram positif, dan mikoplasma, sehingga aktivitas antibakterinya lebih baik. Aktivitas yang multiguna tersebut telah menunjukkan peningkatan progresif dari generasi pertama hingga keempat. Akhir-akhir ini digunakan dalam

kedokteran hewan, dan menghasilkan pertumbuhan yang lebih cepat pada hewan pedaging (Naeem *et al.*, 2006).

Enrofloxacin secara kimia dikenal sebagai 3-kuinolin asam karboksilat, 1- sikopropil-7-(4- etil-1-piperazinil)-6-fluoro-1,4-dihidro-4-okso, dengan rumus empiris dari $C_{19}H_{22}FN_3O_3$ dan berat molekul dari 359,4 g/mol, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4. Serbuk Kristal berbentuk jarum berwarna putih atau agak kuning, tidak berbau dan berasa, dan tersedia dalam garam hidroklorida, laktat, dan sodium. Enrofloxacin sangat larut dalam asam atau basa media, larut dalam dimetil formamida, sedikit larut dalam kloroform, methanol dan tidak larut dalam air (Zahid dan Isnindar 2012). Menurut Naeem *et al.*, (2006), enrofloxacin banyak dan tersebar luas di produk hewan ternak. Namun, antibiotik enrofloxacin dapat menyebabkan gangguan syaraf, kardiotoxik, kebutaan, kematian embrionik, serta toksisitas pada lingkungan (ekotoksitas). Penggunaan antibiotik enrofloxacin pada hewan juga dapat menyebabkan residu dan resistensi mikroba, sehingga penggunaan antibiotik enrofloxacin harus diawasi dan dievaluasi demi keamanan pangan dan kesehatan manusia (Mansouri-Nadjan *et al.*, 2012).



Gambar 4. Struktur enrofloxacin (Trouchon dan Lefebvre, 2016)

MATERI DAN METODE

Prinsip Pengujian

Dasar pengujian adalah reaksi antigen antibody kompleks. Dimana lubang-lubang (wells) mikrotiter dilapisi dengan captured antibody yang secara langsung melawan anti-quinolone antibody. Standar, sampel, dan antibodi ditambahkan secara berurutan di well mikrotiter plate. Selama inkubasi pertama, molekul quinolon bebas di standar atau pada sampel yang dilapisi dengan antigen pada fase padat, bersaing dengan antibodi anti-quinolon yang mengikat. Setelah inkubasi pertama, setiap molekul yang tidak terikat, dihilangkan pada tahap pencucian. Enzim konjugat kemudian ditambahkan; selama inkubasi kedua enzim berikatan dengan antibodi anti-quinolon yang ada terikat pada fase padat. Setelah langkah pencucian, enzim konjugat-antibodi terikat pada fase padat terdeteksi oleh penambahan larutan kromogen yang tidak berwarna, yang selama inkubasi ketiga diubah oleh enzim menjadi produk reaksi berwarna biru. Setelah penambahan stop solution, absorbansi diukur pada 450 nm dengan mikrotiter plate fotometer. Absorbansi berbanding terbalik dengan konsentrasi quinolon dalam sampel.

Alat dan Bahan

Sediaan Reagent yang terdapat dalam Kit meliputi: Microtiter plate, 6 x Larutan Standar enrofloxacin (volume masing-masing 1,5 mL): 0 ppb, 0,04 ppb, 0,08 ppb, 0,16 ppb, 0,32 ppb, dan 0,80 ppb, Enrofloxacin spiking solution 100 ppb, Enzim Conjugate (tutup merah, 14 ml), Anti-quinolon antibody (larutan biru, 8 ml), Extraction Buffer 5x (50 ml), Washing Buffer 20x (50 ml), Developing solution (tutup hitam, 14 ml), Stop solution (tutup putih, 8 ml).

Alat yang dibutuhkan meliputi timbangan, microtiter plate spectrophotometer (450 nm), Centrifuge, Centrifuge tube, Shaker/vortex, Micropipettes (20 – 200 µL dan 200 -1000 µL), ELISA reader, dan bahan yang dibutuhkan: Methanol, DW.

Metode Pengujian

Preparasi sampel. Sampel di homogenisasi. Ambil 1 gram sampel homogen + 2 mL 55 % methanol/air (*muscle*). Vortex 30 menit, dan shake 10 menit. Selanjutnya sampel di sentrifus dengan kecepatan 10 menit/ 4000 rpm. Pada sampel *muscle* encerkan supernatant 1:5 dalam extraction buffer 1x (Misal : 100uL sampel+ 100 uL extraction buffer 5x + 300 uL Distillate Water). Sampel siap diuji, dilution factor 15. Gunakan 50 µL larutan untuk setiap well dalam pengujian

Alur pengujian. Siapkan jumlah well yang diperlukan dalam pengujian. Larutan standar/ sampel sebanyak 50 µL dimasukkan ke dalam masing-masing well, kemudian 50 µL antibody (larutan biru) ditambahkan di setiap well, shake pelan selama beberapa detik. Inkubasi 30 menit pada suhu ruang. Washing I, buang cairan pada well, tambahkan washing buffer dengan squeeze bottle, lakukan total 4x. Ketuk dengan keras mikroplate pada tisu absorben untuk mengeringkan. Washing buffer: Larutkan washing buffer 20x dengan distillate water (DW) 1/20 (1+19) , larutkan pelan hingga seluruh kristal larut. Masukkan masing-masing sebanyak 100 µL enzym conjugate (tutup merah), mix secara manual dengan hati-hati, inkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Washing II seperti poin 5. Masukkan masing-masing sebanyak 100 µL larutan developing solution (tutup hitam), mix secara manual dengan hati-hati, inkubasi dalam suhu ruang selama 15 menit , hindarkan dari cahaya. Tambahkan 50 µL stop solution (tutup putih) pada masing-masing well, mix dengan hati-hati, ukur absorbansinya pada 450 nm (baca hasil pengujian dalam 60 menit setelah penambahan stop solution)

Perhitungan hasil uji. Perhitungan hasil uji dapat dilakukan dengan menghitung :

$$\frac{\text{absorbance standard (or sampel)}}{\text{absorbance zero standard}} \times 100 = \% \text{ absorbance}$$

Standar nol yang dibuat setara dengan 100% dan nilai absorbansi dihitung dengan persentase. Nilai perhitungan untuk standar yang digunakan, dimasukkan ke dalam suatu sistem koordinat dari kertas grafik semilogaritma terhadap konsentrasi quinolone (µg/kg).

Untuk mendapatkan nilai aktual konsentrasi quinolon dalam $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) yang terkandung dalam sampel, nilai konsentrasi dibaca dari kurva kalibrasi yang kemudian dikalikan dengan faktor pengenceran. Berdasarkan regulasi yang berlaku, maka faktor koreksi pengenceran pada daging adalah $\times 15$. Dengan syarat keberterimaan yang dilihat dari IC50 atau 50% inhibition yaitu 0.1 - 0.25 ng/mL

HASIL DAN PEMBAHASAN

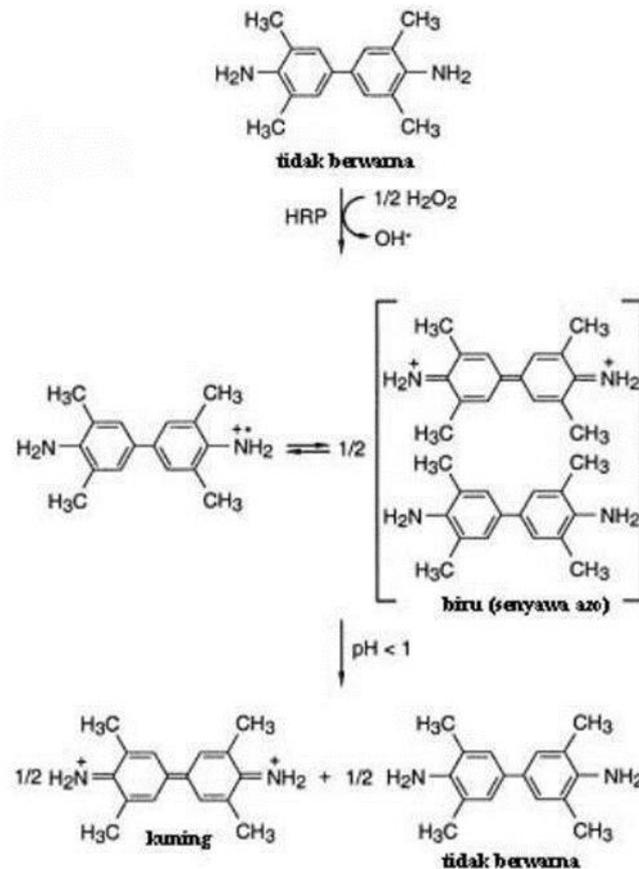
Adanya residu antibiotik dalam makanan asal hewan erat kaitannya dengan penggunaan antibiotik untuk pencegahan dan pengobatan penyakit ternak serta penggunaan sebagai aditif pakan (Etikaningrum dan Iwantoro, 2017). Residu dapat ditemukan akibat penggunaan obat-obatan, termasuk antibiotik, pemberian feed additive, ataupun hormon pemacu pertumbuhan hewan. Senyawa obat yang masuk ke dalam tubuh ternak tidak dapat seluruhnya dieksresi dari jaringan dan akan tertahan dalam jaringan tubuh sebagai residu (Marlina *et al.*, 2015). Konsumsi pangan asal hewan seperti daging ayam yang mengandung residu antibiotik akan menimbulkan gangguan kesehatan. Antibiotik yang dapat diberikan pada hewan salah satunya adalah antibiotik golongan fluoroQuinolon.

FluoroQuinolon dapat digunakan untuk penanganan penyakit pada unggas, sapi, kambing, domba, babi, kuda, dan ikan. FluoroQuinolon merupakan antibiotik yang penting untuk pengobatan penyakit, karena dapat digunakan untuk pengobatan penyakit yang cukup serius dengan infeksi yang spesifik. Oleh karena itu dibutuhkan suatu metode yang cepat, sederhana, dan akurat untuk analisis kontaminan pada produk pangan hewan. Enrofloxacin merupakan salah satu jenis antibiotik golongan fluoroQuinolon yang banyak digunakan untuk terapi pada hewan. Enrofloxacin mengandung ikatan fluor di tengah struktur kimianya. Gugus fluor telah diketahui bersifat neurotoksik kuat dengan kemampuannya untuk menembus blood-brain barrier, sehingga obat yang menempel pada gugus fluor dapat berpenetrasi ke dalam jaringan yang sensitif termasuk otak. Fluor dapat merusak sistem imunitas dengan menghabiskan persediaan energi dan menghambat pembentukan antibodi dalam darah, dan dapat mengganggu sintesa kolagen (Babaahmady dan Khosravi, 2011).

Pengukuran residu antibiotik golongan Quinolon dilakukan dengan menggunakan metode Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Jenis ELISA yang digunakan adalah ELISA Competitive. ELISA kompetitif atau ELISA pemblok dapat digunakan untuk mengukur antibodi maupun antigen. Antibodi adalah senyawa yang tersusun dari protein dan dibentuk untuk melawan sel-sel asing yang masuk ke dalam tubuh. Sedangkan antigen adalah senyawa asing yang dapat memicu pembentukan senyawa antibodi dan bereaksi secara spesifik dengan antibodi yang telah dipicu pembentukannya (Syarifuddin, 2019).

Prinsip dasar dari teknik ELISA kompetitif adalah dengan menambahkan suatu kompetitor ke dalam lubang microtiter/microwell. Pengujian dilakukan di atas polystyrene microtiter plate yang telah dilapisi antigen, sebagai solid phase atau fase padat. Standar, sampel, dan antibodi ditambahkan secara berurutan ke microwells. Selama inkubasi pertama, molekul Quinolon bebas di standar atau sampel bersaing dengan antigen yang dilapisi pada fase padat, untuk mengikat antibodi anti-Quinolon. Setelah inkubasi pertama, molekul yang tidak terikat akan dibuang dengan step proses pencucian, kemudian enzim konjugat ditambahkan. Selama inkubasi kedua, enzim ini akan mengikat antibodi-antibodi anti-Quinolon yang terikat pada fase padat. Setelah pencucian, enzim konjugat dengan antibodi yang terikat di fase padat akan terdeteksi dengan penambahan substrat tidak berwarna atau chromogen solution, yang pada saat inkubasi ketiga akan berubah warnanya menjadi biru. Setelah penambahan stop solution, absorbansinya kemudian diukur pada panjang gelombang 450 nm. Nilai absorbansi akan berbanding terbalik dengan konsentrasi Quinolon pada sampel.

Senyawa kimia yang digunakan sebagai media (substrate) untuk reaksi enzimatik berbeda-beda, bergantung pada enzim yang digunakan. Enzim yang paling umum digunakan adalah Alkaline Phosphatase (AP) dan Horse-radish Peroxidase (HRP). Enzim AP memerlukan p-nitrophenyl phosphate (PNPP) yang dilarutkan dalam diethanolamine 10%. Substrat ini dihidrolisis oleh enzim menjadi p-nitrophenyl (PNP) yang berwarna kuning. Enzim HRP menggunakan substrat tetramethyl benzidine (TMB) yang dilarutkan dalam dimethylsulfoxide (DMSO), substrat ini dihidrolisis oleh enzim menjadi produk berwarna biru (Suryadi *et al.*, 2009).



Gambar 6. Reaksi pembentukan warna pada ELISA (Sumaria, 2013)

Menurut Burgess (1995), enzim HRP terlihat lebih sensitif pada metode immunoassay bila dibandingkan dengan enzim AP. Hal ini terjadi karena daya katalitik enzim HRP lebih cepat, sehingga lebih banyak produk yang pada saat ini membutuhkan waktu inkubasi yang lebih singkat. Sebagai tambahan, hidrogen peroksida, ko-substrat pada suatu reaksi, dapat menghasilkan suatu inkubasi linier yang lebih cepat. Sensitivitas dapat ditingkatkan dengan membuat masa inkubasi lebih lama.

Reagen lain yang diperlukan dalam ELISA adalah buffer, blocking reagent, dan pelarut substrat. Buffer dasar yang paling sering digunakan dalam ELISA adalah buffer fosfat (Phosphate-Buffered Saline, PBS) dan buffer karbonat. Buffer lain, seperti buffer ekstraksi, buffer pencuci, buffer konjugat, dan buffer substrat dibuat dengan menambahkan senyawa kimia tertentu seperti Tween-20, polyvinylpirrolidone (PVP), dan 2-mercaptoethanol pada buffer dasar. Senyawa yang sering digunakan untuk blocking reagents adalah bovine serum albumin (BSA), ovalbumin (OA), gelatin, susu skim, NaOH, dan asam sulfat (Lazarovits, 1990).

Pengukuran absorbansi digunakan alat ELISA reader yang memiliki prinsip seperti spektrofotometer, yaitu mengubah cahaya polikromatis menjadi cahaya monokromatis dengan panjang gelombang tertentu pada monokromator, kemudian menyinari sampel yang akan diukur lalu diteruskan ke detektor untuk menghitung banyaknya cahaya yang diserap oleh sampel. Jumlah

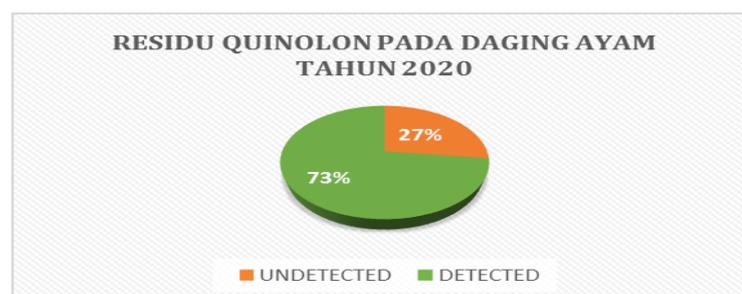
cahaya yang diserap oleh analit dinyatakan dalam nilai absorbansi atau optical density (OD) (Permana, 2014).

Jenis kurva standar yang digunakan pada pengukuran yaitu *cubic spline*. Metode berbasis spline populer pada tahun 1980-an ketika komputer pertama kali digunakan untuk menghitung hasil immunoassay karena relatif sederhana secara komputasi. Jenis kurva ini termasuk dalam jenis kurva yang memerlukan formula matematika yang lebih kompleks dibandingkan regresi linier, sehingga perhitungannya menggunakan software. Nilai yang digunakan sebagai acuan adalah IC50 atau 50% inhibition yang merupakan konsentrasi yang diperlukan untuk menghambat 50% aktivitas enzim. Contohnya IC50 didapatkan sebesar 0.162 ng/mL. Nilai ini masih masuk ke dalam rentang yang ditetapkan oleh Tecna i-Screen ELISA kit Quinolon yaitu 0.1 – 0.25 ng/mL.

Kurva standar dibuat dengan memplot antara konsentrasi standar Quinolon sebagai sumbu x dan nilai absorbansi sebagai sumbu y kemudian digunakan untuk menghitung kadar Quinolon pada sampel (Tabel 1). Nilai OD atau absorbansi yang telah dimasukkan ke software Ridawin Reader dikomputasi sehingga dihasilkan kadar dari masing-masing sampel sebagai berikut.

Berdasarkan hasil pengukuran, dengan nilai keberterimaan yang dilihat dari IC50 atau 50% inhibition yaitu 0.162 ng/mL, didapatkan kadar enrofloxacin seperti pada Tabel 1. Sampel tidak terdeteksi (*undetected*) menunjukkan absorbansi pada kedua sampel tersebut diluar range absorbansi standar enrofloxacin, yang menunjukkan absorbansi yang sangat tinggi sehingga kadar residu dibawah LOD. Sedangkan batas maksimum residu (BMR) untuk total residu enrofloxacin dalam daging yang ditetapkan oleh Standar Nasional Indonesia (SNI) No: 01-6366-2000 yaitu 0.01 mg/kg atau setara dengan 10 ppb (BSN 2001). Sampel aman untuk dikonsumsi jika kadar enrofloxacinnya berada dibawah 10 ppb.

Selama tahun 2020 (Januari hingga November 2020), Laboratorium residu Obat dan AMR, Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan telah menguji residu quinolon pada 37 sampel daging ayam dengan metode ELISA menggunakan Kit I'screen Quino dari Tecna. Dari pengujian tersebut didapatkan 10 sampel (27%) tidak terdeteksi residu quinolon, dan 27 (73%) sampel terdeteksi residu quinolon. Dari sampel terdeteksi, tidak ditemukan sampel mengandung residu quinolon diatas 10 ppb atau di atas BMR.



Gambar 7. Perbandingan residu quinolon pada daging ayam tahun 2020

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil pengujian, didapatkan 73% sampel yang terdeteksi residu quinolon menunjukkan bahwa masih ada penggunaan antibiotik yang kurang bijak pada ternak ayam, terutama antibiotik golongan quinolon. Dari pengamatan di lapang, pemakaian antibiotik terutama pada peternakan ayam pedaging dan petelur cenderung berlebihan tanpa memperhatikan aturan pemakaian yang benar. Penggunaan obat hewan yang kurang tepat ini kemungkinan berkaitan dengan pola pemasaran obat hewan di lapangan, sehingga dikhawatirkan penggunaan obat-obatan tersebut tidak mengikuti aturan. Selain itu, peternak sering kurang memahami waktu henti (*withdrawal time*) suatu obat hewan sehingga mengakibatkan munculnya residu pada produk ternak.

Hasil ini menunjukkan bahwa metode pengujian saat ini cukup memadai digunakan untuk mengendalikan residu quinolon pada daging ayam. LOD yang cukup rendah, yaitu 0,6 ppb untuk sampel daging, kit ELISA yang digunakan cukup sensitif untuk deteksi residu quinolon.

DAFTAR PUSTAKA

- Babaahmady E, Khosravi A. 2011. Toxicology of baytril (enrofloxacin). *J Pharm Pharmacol*. 5:2042-2045.
- Bahri S, Masbulan E, Kusumaningsih A. 2005. Proses Praproduksi sebagai Faktor Penting dalam Menghasilkan Produk Ternak yang Aman untuk Manusia. *Jurnal Litbang Pertanian* 24 (1).
- Baid A. 2016. ELISA- A Mini Review. Research and Reviews: *Journal of Pharmaceutical Analysis*. ISSN: 2347-2340.
- Brown SA. 1996. Fluoroquinolones in Animal Health. *Journal of Veterinary Pharmacological Therapy*, 19.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2001. SNI No: 01-6366-2000 tentang batas maksimum cemaran mikroba dan batas maksimum residu dalam bahan makanan asal hewan. Jakarta (ID): BSN.
- Burgess GW. 1995. Prinsip Dasar ELISA dan Variasi Konfigurasinya. Di dalam: Artama WT, penerjemah; Burgess GW, editor. *Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan penelitian*, Yogyakarta (ID) : Gajah Mada University Press. Terjemahan dari *ELISA Technology in Diagnosis and Research*.
- Dewi AA, Widdhiasmoro NP, Nurlatifah I, Riti N, Purnawati D. 2014. Residu antibiotik pada pangan asal hewan, dampak dan upaya penanggulangannya. *Veteriner*. ISSN: 0854-901X.
- Etikaningrum, Iwantoro S. 2017. Kajian residu antibiotik pada produk ternak unggas di Indonesia. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan*. 5(1): 29-33.
- Farmakologi dan Terapi, edisi 5, Departemen Farmakologi Terapeutik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, 2007.
- Lazarovits G. 1990. The dot immunobinding assay (DIA)- Bacteria. In Hampton, R., E. Ball, and S. De Boer (Eds.). *Serological Methods for Detection and Identification of Viral and bacterial*

- Plant Patogens. *APS Press, St Paul, Minn.* p. 248-261.
- Marlina N, Zubaidah E, Sutrisno A. 2015. Pengaruh pemberian antibiotik saat budidaya terhadap keberadaan residu pada daging dan hati ayam pedaging dari peternakan rakyat. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan.* 25(2): 10-19.
- Metode Uji MU 7.2.2.10 ISO 17025: 2017 Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan.
- Naeem M, Khan K, Rafiq S. 2006. Determination of residues of quinolones in poultry products by high pressure liquid chromatography. *Journal of Applied Sciences.* 6(2): 373-379.
- Phillips I, Casewell M, Cox T, Groot B, Friis C, Jones R, Nightingale C, Preston R and Waddell J. 2014. Does the Use of Antibiotiks in Food Animals Pose A Risk to Human Health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 53;28-52
- Permana I. 2014. Uji antidiabetes senyawa turunan calcon dengan substitusi naftalen terhadap enzim α -glukosidase. [skripsi]. Pekanbaru (ID): Universitas Muhammadiyah Riau.
- Permentan 14/2017 tentang Klasifikasi Obat Hewan.
- Rohima IE, Nurminabari IS. 2018. Identifikasi protein hewani pada produk bumbu instan dengan metode ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*). *Pasundan Food Technology Journal.* 5(3).
- Sirois M. 2016. *Elsevier's Veterinary Assisteing Textbook, Elsevier.* Georgia (US) : Asworth College.
- Sudjadi, Rohman A. 2018. *Analisis Derivat Babi.* Yogyakarta (ID): UGM Press.
- Suryadi Y, Manzila I, Machmud M. 2009. Potensi pemanfaatan perangkat diagnostik elisa serta variannya untuk deteksi patogen tanaman . *Jurnal Agro Biogen* 5(1):39-48.
- Tecna kit ELISA *Quinolone procedure*
- Toldra F. & Reig M. 2006. Methods for Rapid Chemical and Veterinary Drug Residues in Animal Foods. *Trends in Food Science and Technology.* 17: 482-489.

Determination of Trenbolone Acetate Hormone Residue on Imported Beef Meat and Beef Liver Using Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Puji Rahayu¹, Iif Syarifah²

¹Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

²Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan

*Correspondence email: puji_latif@yahoo.co.id

ABSTRACT

The concentration of trenbolone acetate (TBA) hormone residues in samples were tested using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Beef meat and beef liver samples used in the study were collected from slaughterhouses and cold storages in Jakarta, West Java and Banten. A total of 247 samples consisting of approximately 50-150 g fat-free portions of beef or beef liver were collected and transported to the laboratory in the shortest time possible. From the test results obtained some samples of both beef and beef liver containing residues of trenbolone acetate above the maximum residue limit (MRL) that has been set by CODEX (10 ppb for meat and 2 ppb for liver). In Jakarta area found one beef sample (3.4%) and two beef liver (9.5%) containing TBA above MRL. In Banten area, two samples (8.5%) of beef liver from slaughterhouse were found containing TBA residues above the MRL. Meanwhile, in West Java, only one sample (7.1%) of beef from slaughterhouse was found with the residual content of TBA above the MRL. From the results above can be seen almost all the results that showed TBA concentration above MRL obtained from slaughterhouse. To obtain quantitative test results confirm, a number of samples which give concentrations above the highest standard in the ELISA standard curve will then be tested using High Pressure Liquid Chromatography (HPLC). The results of this study indicate that the residual concentration of trenbolone acetate still need further attention for the discovery of several samples containing residues of hormones trenbolone acetate with a number that exceeds the maximum residue limits.

Keywords: *Trenbolone Acetate, TBA, ELISA, Growth Promotor Hormone*

Introduction

Chemical residues in food are an important food safety issue both in terms of consumer concern and food trade. Among all the food related problems, food safety is a major issue to tackle out at present. Food safety is basically an approach to control the hazards to the consumers through several safety measures (Irfan and Saghir 2016)

Increased welfare and public awareness of the importance of consuming animal protein sources, also contributes to increasing the level of beef consumption in Indonesia. In 2019, the national demand for beef is estimated to be around 686,271 tons, assuming a consumption of 2.56 kg / capita / year. The availability of beef based on domestic production is 404,590 tons, which is produced from 2.25 million slaughtered cows. Based on these data, an additional 281,681 tons are still needed which are met through

imports of beef (92 thousand tons), buffalo meat (100 thousand tons), and feeder cattle (500 thousand heads, equivalent to 99,980 tons of meat) (Ministry of Agriculture Website 2019). The shortage of beef stock is due to the imbalance between domestic demand and supply of beef. The livestock population that produces meat for consumption may not be able to meet all the needs of beef in Indonesia. Low productivity and animal health are one of the reasons for the low population of livestock producing meat. Import policies of both feeder cattle and frozen beef from several countries that still allow the use of several growth-stimulating hormones need attention. The importation of frozen beef without supervision will have a detrimental impact on public health. This loss occurs when the amount exceeds the threshold so that the animal product becomes unsafe for consumption. In several countries that are the destination for importing including Australia, New Zealand, USA and Canada, the use of growth stimulating hormones is still allowed (Danial *et al.*, 2016).

Growth stimulating hormone residues can be found in animal products if the use of the drug is not in accordance with the instructions given, for example the stopping period of a drug that is not obeyed before slaughtering the animal. The use of growth-promoting hormones in Indonesia including Trenbolone Acetate, Melengestrol Acetate and Zeranol in livestock has been prohibited since 1983. Government Policy regarding Hormone Residues: based on the Decree of the Minister of Agriculture Number 806 of 1994; The Circular of the Director of Animal Health Number 328 / XII-C dated 4 October 1983 and the results of the meeting of the Indonesian veterinary drug commission on 12 August 1998 confirmed that growth stimulating hormones are not permitted for use in production animals for consumption (. This is also reinforced by the existence of Government Regulation No. 22 of 1983 which essentially protects public health from hazards that can interfere with health due to consuming animal-derived food ingredients containing drug residues. Another thing that supports the prohibition is the inadequate level of education and knowledge and awareness of breeders who use growth-promoting hormones to comply with the withdrawal time provisions before the livestock is slaughtered.

This study aims to determine the presence of TBA residue in imported beef and beef liver. The expected benefit is that it can be used as consideration in drafting regulatory policies for imported cattle from importing countries that still allowed use the growth promoting hormones.

MATERIALS AND METHODS

Material

Samples were imported beef and liver (n = 247) in a number of slaughterhouses and cold storage in the Jabodetabek, Banten and Sumatra areas. The total sample taken was divided into 4 sample groups, namely beef from slaughterhouses (n = 90), beef from cold storage (n = 62), beef liver from slaughterhouses (n = 90) and beef liver from cold storage. (n = 5).

The materials used include methanol pa, methanol 40%, methanol 80%, ter-butylmetileter pa, phosphate buffer saline (PBS), buffered Na-acetate, distilled water, and Ridascreen Trenbolon ELISA kit (negative and positive control of trenbolone acetate hormone. and its residues (17 β -trenbolon), washing solution, conjugate, substrate solution, stopping solution).

Methods

The concentration of trenbolone acetate hormone residues in the samples was tested using the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method. Reagents and samples are conditioned at room temperature before being used / tested. The test stages are adjusted according to the procedure included with the ELISA kit. Trenbolone acetate residual hormone concentrations were calculated using Ridawin software based on a standard curve that had been prepared.

Sample Preparation

Homogenize 10 g of ground sample with 10 ml of 67 mM PBS buffer and shake for 5 min. Mix 2 g of the homogenized sample with 5 ml of tert-Butyl methyl ether in a centrifugal screw cap vial and shake vigorously for 30 – 60 min and centrifuge 10 min 3000g 10 – 15 °C. Transfer the supernatant into another glass vial with screw cap. Repeat the extraction procedure with another 5 ml of tert-Butyl methyl ether. Evaporate the combined ether layers and then dissolve in 1 ml of methanol (80%). Dilute the methanolic solution with 2 ml of 20 mM PBS. Rinse the column with 3 ml MeOH (100%) and equilibrate the column with 2 ml 20 mM PBS. Ensure that all liquid is removed from the column by pressing air or N₂ through the column. Elute slowly with 1 ml MeOH (80%), flow rate: 15 drops per min. Dilute eluate 1:2 (1 + 1) with distilled wate. Use 50 μ l per well in the test.

Assay Protocol

All standards and samples should be simultaneously tested in duplicate. Pipette 100 μ l of zero standard in duplicate. Pipette 50 μ l of zero standard in duplicate. Pipette 50 μ l of standard solution in duplicate. Pipette 50 μ l of each sample solution in duplicate to the remaining wells of the microtiter plate. Pipette 25 μ l of conjugate (Trenbolone-HRP) to all wells, except wells H1 and H2. Pipette 25 μ l antibody solution to all wells, except wells H1 and H2. Seal the microtiter plate and shake the plate for a few seconds. Incubate for 1 hour in the dark at 20°C - 25°C. Discard the solution from the microtiter plate and wash 3 times with rinsing buffer. Pipette 100 μ l of substrate solution into each well. Incubate 30 minutes in the dark at 20°C - 25°C. Pipette 100 μ l of stop solution to each well. Read the absorbance values immediately at 450 nm.

Interpretation of Results

The O.D. values of the six standards and the samples (mean values of the duplicates) are divided by the mean O.D. value of the zero standard and multiplied by 100. The zero standard is thus made equal to 100% (maximal absorbance) and the other O.D. values are quoted in percentages of the maximal absorbance.

RESULTS AND DISCUSSION

The calculation of the gained results was made by RIDAWIN software. For construction of the calibration curve the mean of the absorbance values obtained for the standards was divided by the absorbance value of the first standard (zero standards) and multiplied by 100. The absorption is inversely proportional to the concentration of trenbolone. The amount of trenbolone in the samples is expressed as trenbolone equivalents. The Trenbolone equivalents in the sample (ng/ml) corresponding to the % maximal absorbance of each sample can be read from the calibration curve. As can be seen in Fig.I, the trenbolone calibration curve was found to be virtually linear in the 25 to 400 ppt.

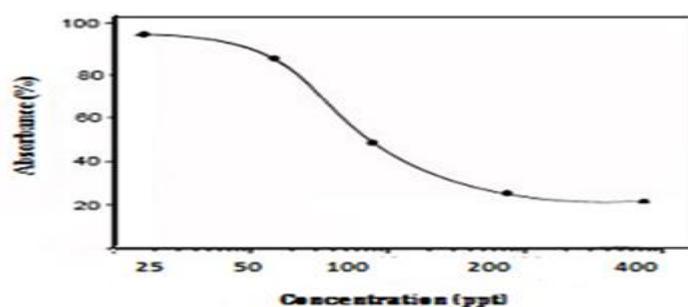


Figure 1. Calibration curve of trenbolone standards (25 - 100 ppt)

All of the cattle taken as samples in the slaughterhouses are imported cattle that were previously fattened in the feedlot. From the test results, several samples of both beef and beef liver contained TBA residues above the maximum residue limit (MRL) as shown in Table 1.

Table 1. Trenbolone Acetate Concentration

District	Sample Location	Sample Type	Number of Sample (n)	Trenbolone Acetate Concentration (ppb)		% Above MRL
				Mean ± SD	Min-Max	
Jakarta	Slaughterhouse	Beef	29	0.63 ± 0.23	0.12 - 2.01	1/29 (3.4%)
		Beef Liver	21	3.34 ± 2.97	0.18 - 15.14	2/21 (9.5%)
	Cold Storage	Beef	23	0.11 ± 0.09	0.07 - 0.31	0%
		Beef Liver	9	0.36 ± 0.21	0.16 - 0.62	0%
Banten	Slaughterhouse	Beef	25	0.43 ± 0.96	0.19 - 1.32	0%
		Beef Liver	27	3.28 ± 3.21	0.21 - 13.24	2/27 (8.5%)
	Cold Storage	Beef	29	0.32 ± 0.19	0.10 - 0.72	0%
		Beef Liver	11	4.05 ± 3.62	0.26 - 11.01	0%
West Java	Slaughterhouse	Beef	21	0.62 ± 0.12	0.09 - 1.12	0%
		Beef Liver	14	3.25 ± 2.81	0.27 - 11.24	1/14 (7.1%)
	Cold Storage	Beef	24	0.11 ± 0.09	0.06 - 0.19	0%
		Beef Liver	14	0.28 ± 0.12	0.19 - 0.23	0%
Total			247			

The Maximum Residual Limit (MRL) value for Trenbolone Acetate is 2 ppb for meat and 10 ppb for liver (CODEX). The detection limit is 0.2 ppb, if the concentration is ≤ 0.2 ppb, the sample is categorized not detected.

From the test results, it was found that several samples of both beef and beef liver contained TBA residue above the Maximum Residue Limit (MRL). Maximum Residue Limit (MRL) was determined by CODEX, namely 2 ppb for meat and 10 ppb for liver (CAC 2012). In Jakarta area found one beef sample (3,4%) and two beef liver (9,5%) containing TBA above MRL. In Banten area, two samples (8.5%) of beef liver from slaughterhouse were found containing TBA residues above the MRL. Meanwhile, in West Java, only one sample (7.1%) of beef from slaughterhouse was found with the residual content of TBA above the MRL. From the results above can be seen almost all the results that showed TBA concentration above MRL obtained from slaughterhouse. With this result, we must also be aware of imported feeder cows that will be slaughtered at the slaughterhouse. Feedlotters should be more vigilant about the withdrawal time of drug. To obtain confirmatory quantitative test results, a number of samples that provide concentrations above the highest standard on the ELISA standard curve will then be tested using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The content of drug residues that exceeds the maximum residue limit set can cause animal products to be unsafe for consumption because they can cause allergic reactions, poisoning and carcinogenic (Okocha *et al.*, 2018).

Hormones that are commonly used as growth promoters include zeranol, progesterone, estradiol benzoate, 3 estradiol, testosterone propionate, and trenbolone acetate. Trenbolone acetate (TBA) is a synthetic androgenic anabolic steroid hormone (Jeong *et al.*, 2010). TBA was implanted in the ear of cattle for \pm 60 days before slaughtering (Schneider *et al.*, 2007). Beef fattening in Australia generally implants about 90% growth-promoting hormone. Implantation the right one results in a 5-15% increase in acceleration growth, improve feed conversion, muscle building, and reduce fat (Fritsche *et al.*, 2000).

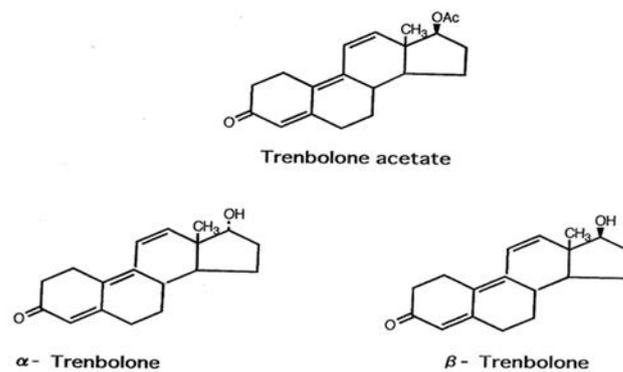


Figure 2. Chemical Structure of Trenbolone (Donner 2015)

Trenbolone acetate hormone (TBA) is a growth-promoting hormone that is implanted into cows to increase body weight and increase feed conversion efficiency. The impact of the excess TBA hormone in the body can cause delayed puberty due to inhibition of estrogen production, deviations and changes in behavior, sexual deviations, impaired liver and kidney function, loss of sexual appetite and the risk of developing degenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's, spermatogenesis, oligospermia, testicular atrophy (Passantino 2012) and carcinogenic (Jeong 2010). Trenbolone acetate is classified as a hard drug that is not permitted for registration and distribution, therefore the MRL for trenbolone acetate in animal foods is not established. The maximal residue limits according to the Codex Alimentarius Commission for TBA in muscles are 2 ppb and 10 ppb in the liver (CAC 2012). The European Economic Community (EEC) banned the use of anabolic compounds as growth accelerators in food animals (Nazli 2005) while the United States Food and Drug Administration (USFDA) permitted the limited use of some hormones with natural origins (such as estradiol and testosterone) and some synthetic hormones such as trenbolone in animal husbandry (Passantino 2012).

In recent years there is growing suspicions and evidence about a connection between the consumption of high amounts of red meat, especially processed meat products, with some important and common diseases such as diabetes, coronary heart disease, heart failure, stroke and cancer (Wolk, 2017). With these worries, the European Union Food Safety Agency (EFSA) has reported that all six types of hormones can cause endocrine, developmental, immunological, neurobiological, immunotoxic,

genotoxic, and carcinogenic effects for the susceptible risk groups, and has forbidden the import of meat obtained from countries which do not regulate their meat productions accordingly (Donovan, 2015).

ELISA is a method of testing hormone residue sensitive, accurate, relatively inexpensive, and easy to handle for routine testing (Mahgoub *et al.*, 2006). This method is an initial test (screening) to determine the residual content TBA for imported cattle ready for slaughter. ELISA can be used as a screening tool for hormone residue screening because of its high sensitivity and precision (Yongo 2016). In addition, the advantages of ELISA include having a simple test method, more affordable, portable equipment and a larger number of samples that can be tested so that the examination time is more efficient (Jiang *et al.* 2011). However, the use of ELISA is less specific and accurate because of the cross reaction with other related chemical substances (Oveisi *et al.*, 2013). Therefore, further testing is needed on the positive results obtained. Confirmatory testing can be done by chromatographic and mass spectrometric tests. This test is useful for knowing the existence of a false positive value on the test being carried out.

Almost all samples of beef and beef liver from cold storage gave trenbolone acetate residue below the predetermined limit. This indicates that the country of origin of livestock has paid attention to aspects of veterinary public health by importing both beef and beef liver from cows that have passed the drug stopping period. Our test results are of important as they give information about the use of trenbolone acetate in national animal husbandry and in the food industry.

CONCLUSIONS

The results of this study indicate that the residual concentration of the TBA hormone in both meat and liver samples, especially those from slaughterhouse, still needs more attention because there are still several samples containing TBA hormone residues in an amount that exceeds the predetermined maximum residue limit. Import policies in the form of live livestock and frozen meat from countries that still use growth-promoting hormones will increase the risk of products containing growth-stimulating hormone residues, which, if the amount exceeds the threshold, will make animal products unsafe for consumption.

Determination of trenbolone acetate hormone residues using the ELISA method is only screening, it is necessary to continue quantitative confirmation testing with the HPLC / LC-MS method to ensure the true residue concentration.

REFERENCES

- CAC. Codex Alimentarius Commission. 2012. Maximum residue limits for veterinary drugs in foods. http://ftp.fao.org/codex/weblinks/MRL2_e_2012.pdf.
- Danial R, Latif H, Indrawati A. Deteksi Residu Hormon Trenbolon Asetat pada Sapi Siap Potong Impor asal Australia. *Acta Vet Indones* 2016; 3: 70–76.
- Donner D. 2015. Therapeutic Effects of Selective Androgen Receptor Modulation in the Treatment of Cardiac, Metabolic and Bone Pathologies Associated with Androgen Decline and Obesity.
- Donovan BM. 2015. Reclaiming race as a topic of the US biology textbook curriculum . *Science Education* 99 (6), 1092-1117.
- Fritsche S, Solomon MB, Paroczay EW, Rumsey TS. 2000. Effects of growth promoting implants on morphology of longissimus and semitendinosus muscle in finishing steers. *Meat Science* 56: 229-237.
- FAO/WHO. Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) For Residues of veterinary drugs in Foods. *Codex Aliment Int Food Stand* 2018; 2: 2–26.
- Hewan DK. Pembinaan Terhadap Obat Hewan Ilegal, <http://keswan.ditjennak.pertanian.go.id/index.php/blog/read/berita/pembinaan-terhadap-obat-hewan-ilegal> [20 Agustus 2020] (2014).
- <https://ditjenpkh.pertanian.go.id/kementan-jamin-ketersediaan-stok-pangan-asal-hewan-jelang-hbkn>
- Irfan K and Ahmad S. 2016. Pesticides and Veterinary Drugs Residues in Conventional Meat: A Food Safety Issue. *Buffalo Science*. 5. 34-43.
- Jeong SH, Kang D, Lim MW, Kang CS, Sung HJ. 2010. Risk assessment of growth hormones and antimicrobial residues in meat. *Toxicol Res*. 2010 Dec;26(4):301-13.
- Jiang J, Zhang H, Fan G. 2011. Preparation of monoclonal antibody based indirect competitive ELISA for detecting 19-nortestosterone residue. *Chin. Sci. Bull*. 56, 2698 .
- Mahgoub O, Kadim IT, Mothershaw A, Al Zadjali SA, Annamalai K. 2006. Use of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibiotic and anabolic residues in goat and sheep meat. *World Journal of Agricultural Sciences* 2: 298-302.
- Nazli B, Colak H, Aydin A, Hampikyan H. 2005. The presence of some anabolic residues in meat and meat products sold in İstanbul. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 29. 691-699.
- Okocha RC, Olatoye IO, Adedeji OB. 2018. Food safety impacts of antimicrobial use and their residues in aquaculture. *Public Health Rev*. 2018 Aug 8;39:21.
- Oveisi MR, Jannat B, Sadeghi N, Hajimahmoodi M, Bagheri M. 2007. Preliminary screening for the levels of testosterone hormone in the market meat in Tehran. *Acta Medica Iranica*. 45. 126-130.
- Passantino A. *Steroid Hormones in Food-Producing Animals: Regulatory Situation in Europe* frtcv. Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Messina, 2012.

- Sang-Hee jeong, Myung-Woon Lim C-SK and HJS. Risk Assesment of Growth Hormones and Antimicrobial Residues in Meat. *ToxicoRes* 2010; 26: 301–313.
- Schneider B, Tatum J, Engle T, Bryant T. 2007. Effects of heifer finishing implants on beef carcass traits and longissimus tenderness. *Journal of animal science*. 85. 2019-30.
- Wolk A. 2017. Potential health hazards of eating red meat. *J Intern Med*. Feb;281(2):106-122.
- Yongo E, Manyala J, Kito K. 2016. Diet of Silver Cyprinid, *Rastrineobola argentea* in Lake Victoria, Kenya. *Int J Adv Res*; 4: 144–149.

CEMARAN LOGAM BERAT Pb, Cd, DAN Cu PADA AYAM KUNING SUKABUMI DI BOGOR UTARA

Dofactora Mega Buana¹, Zakiah Wulandari¹, Puji Rahayu²

¹Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor

²Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

*Email korespondensi : puji_latif@yahoo.co.id

ABSTRAK

Ayam kuning sukabumi merupakan salah satu produk olahan daging ayam yang umumnya dijual di pinggir jalan, khususnya di Bogor Utara yang banyak dilalui kendaraan bermotor sehingga dapat menyebabkan pencemaran pada produk. Tujuan penelitian ini menganalisis kandungan logam berat Pb, Cd, dan Cu pada ayam kuning sukabumi di Bogor Utara serta membandingkan kandungan logam berat akibat pengaruh lama pemajaan. Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak kelompok dengan 2 perlakuan dan 5 kelompok sebagai ulangan. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan sidik ragam. Hasil menunjukkan bahwa kandungan Pb dan Cd pada ayam kuning sukabumi melebihi batas maksimum cemaran yang ditetapkan SNI, sedangkan Cu tidak melebihi batas yang ditentukan Dirjen Pengawasan Obat dan Makanan. Logam Pb dan Cd pada ayam kuning sukabumi dipengaruhi oleh pemajaan, sedangkan Cu tidak dipengaruhi oleh pemajaan.

Kata kunci: ayam kuning sukabumi, cemaran logam berat, Bogor Utara

PENDAHULUAN

Keamanan pangan merupakan faktor penting dalam proses perdagangan pangan itu sendiri. Menurut undang-undang RI No.7 tahun 1996, keamanan pangan didefinisikan sebagai kondisi dan upaya yang diperlukan untuk mencegah pangan dari kemungkinan cemaran biologis, kimia dan benda lain yang dapat mengganggu, merugikan dan membahayakan kesehatan manusia. Salah satu cemaran kimia yang perlu mendapatkan perhatian adalah cemaran logam berat. Sumber utama kontaminan logam berat sesungguhnya berasal dari udara dan air yang mencemari tanah.

Darmono (1995) menyatakan toksisitas logam pada manusia dapat menyebabkan timbulnya kerusakan jaringan terutama jaringan detoksikasi dan ekskresi (hati dan ginjal). Beberapa logam mempunyai sifat karsinogenik dan teratogenik. Berdasarkan SNI no. 7387 tahun 2009 tentang batas maksimum cemaran logam berat dalam pangan, batas maksimum Pb adalah 1 ppm, Cd sebesar 0,3 ppm dan Cu sebesar 5 ppm dalam bahan pangan.

Salah satu bentuk produk olahan daging ayam adalah ayam kuning sukabumi. Produk ini ditemui banyak dijual di pinggir jalan raya berupa karkas ayam yang sudah dibumbui kuning sehingga lebih

praktis dan mempunyai citarasa yang khas. Ayam kuning sukabumi dijual di pinggir jalan sehingga mempunyai resiko terkontaminasi oleh logam berat yang berasal dari lingkungan. Cemaran logam berat dari lingkungan bersumber dari asap knalpot, limbah pabrik, air maupun peralatan.

Ayam kuning sukabumi banyak ditemukan dijual di Kotamadya Bogor, khususnya di Kecamatan Bogor Utara. Kecamatan Bogor Utara merupakan kecamatan yang kaya akan pusat keramaian dan jajanan pasar termasuk penjual ayam kuning sukabumi. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian terhadap keamanan pangan dalam identifikasi cemaran logam berat pada produk ayam kuning sukabumi di Kecamatan Bogor Utara.

Penelitian ini bertujuan menganalisis kandungan logam berat Pb, Cd dan Cu pada ayam kuning sukabumi di Kecamatan Bogor Utara. Penelitian juga bertujuan jumlah logam berat yang terkandung akibat pengaruh lama pemajaan.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah 10 sampel ayam kuning sukabumi yang didapat dari 5 penjual yang berbeda dan satu sampel karkas ayam (kontrol). Ayam kuning sukabumi diambil dua kali dalam sehari, yakni 0 jam setelah pemajaan dan 3 jam setelah pemajaan. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah larutan asam nitrat pekat (HNO_3 65%), larutan asam hidrogen peroksida (H_2O_2 30%), larutan asam nitrat (HNO_3 0.1 N), air tanpa ion (*deionized water*), larutan standar 500 $\mu\text{g/mL}$ Pb, larutan standar 500 $\mu\text{g/mL}$ Cd, larutan standar 500 $\mu\text{g/mL}$ Cu.

Preparasi Contoh (Milestone, 2010)

Tabung *vessel* diletakkan diatas neraca, lalu masing-masing sampel daging ayam kuning sukabumi dan karkas ayam sebagai kontrol negatif diambil dan ditimbang sebanyak 0.5 gram. Setelah masing-masing sampel ditimbang, tabung *vessel* diletakkan ke dalam tabung pelindung. Setelah itu, dimasukkan larutan asam nitrat (HNO_3) 65% sebanyak 8 mL dan larutan asam hidrogen peroksida (H_2O_2) 30% sebanyak 2 mL. Setelah itu, tabung ditutup rapat dan diletakkan di rak tabung-tabung *vessel*. Tabung-tabung *vessel* tersebut dimasukkan ke dalam *Microwave Acid Digestion Apparatus* untuk dilakukan proses destruksi basah.

Setelah dimasukkan, tabung 1 dihubungkan dengan sensor temperatur. *Microwave Acid Digestion Apparatus* dinyalakan setelah sebelumnya diatur suhu, tekanan serta waktu yang digunakan untuk proses destruksi. Setelah destruksi selesai, tabung *vessel* harus mencapai suhu 40 °C agar dapat dibuka secara aman. Selanjutnya tabung dikeluarkan dari *Microwave Acid Digestion Apparatus* dan larutan preparasi contoh yang telah terdestruksi dipindahkan ke labu ukur 50 mL dengan bantuan corong kaca. Setelah itu, ditambahkan *deionized water* hingga batas tera.

Pengukuran Deret Standar dan Contoh Uji

Pengukuran deret standar dan contoh uji dilakukan dengan menggunakan AAS *Agilent Technologies 200 series AA flame type* dan dioptimalisasikan dengan mengatur lampu dan sinyal. Setelah dioptimalisasikan, satu per satu larutan standar diaspirasikan ke dalam AAS *Agilent Technologies 200 series AA flame type*. Alat tersebut akan mengencerkan larutan standar sesuai dengan yang diinginkan. Setelah larutan standar, larutan contoh uji diaspirasikan ke dalam AAS *Agilent Technologies 200 series AA flame type* dan diukur sebanyak tiga kali ulangan agar pembacaan dapat diketahui keakuratannya.

Analisis Data

Penghitungan kadar Pb, Cd, dan Cu dihitung menggunakan rumus:

$$K \text{ (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan :

K = Kandungan logam

C = konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per milliliter ($\mu\text{g/ml}$) atau ppb (part per billion)

V = volume larutan akhir, dinyatakan dalam milliliter (ml)

m = bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g)

Data besarnya kandungan logam berat yang telah didapatkan selanjutnya diuji. Pengujian dilakukan dengan analisis sidik ragam pada $\alpha = 0.05$.

Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak kelompok (RAK) dengan perlakuan waktu pengambilan sampel dengan dua taraf yakni 0 jam dan 3 jam dan lima kelompok penjual ayam kuning sukabumi yang berada di Kecamatan Bogor Utara. Peubah yang diamati adalah kandungan logam berat Pb, Cd, dan Cu. Model matematika rancangan tersebut menurut Steel dan Torrie (1995) adalah:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan:

Y_{ij} = nilai pengamatan dari waktu pengambilan sampel ke-i dalam kelompok ke-j

μ = nilai tengah umum

α_i = pengaruh perlakuan waktu pengambilan sampel ke-i

β_j = pengaruh kelompok penjual ayam kuning sukabumi ke-j

ε_{ij} = pengaruh galat perlakuan waktu pengambilan sampel ke-i dan kelompok penjual ayam kuning sukabumi ke-j

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kondisi Umum Wilayah Penelitian

Kecamatan Bogor Utara merupakan sebuah kecamatan yang termasuk ke dalam Kotamadya Bogor. Kecamatan Bogor Utara mempunyai jalan arteri yang cukup panjang, yakni mencapai kurang lebih 15 km. Jalan tersebut sering dilalui banyak kendaraan bermotor karena jalan arteri tersebut adalah jalan penghubung Bogor dan Jakarta. Jalan arteri yang dimaksud meliputi Jalan K. S. Tubun hingga sebagian Jalan Pajajaran. Kecamatan Sukaraja, tepatnya Rumah Sakit Family Medical Center (FMC) menjadi batas bagian utara Jalan K. S. Tubun, sedangkan Kelurahan Katulampa, Kecamatan Bogor Timur, tepatnya Balai Penelitian dan Pengembangan Peternakan menjadi batas bagian dari Jalan Pajajaran. (<http://maps.google.com/>)

Terdapat 3 dari 5 penjual ayam kuning sukabumi yang dijadikan sumber sampel penelitian di jalan arteri tersebut. Dua lainnya berada di pinggir jalan kolektor yang tersebar di wilayah Kecamatan Bogor Utara. Lokasi penjual berada sangat dekat dari jalan raya, yakni sekitar 1–3 meter dari jalan raya.

Lokasi yang sangat dekat dengan jalan raya sangat berpeluang terjadinya pencemaran produk dari lingkungan sekitar, khususnya cemaran logam berat. Data Badan Pengelolaan Lingkungan Hidup Kota Bogor tahun 2012 menunjukkan bahwa kandungan Pb di Bogor Utara berkisar dari 0.2–0.3 ppm. Pencemaran udara terbesar di daerah urban disebabkan oleh asap kendaraan dan paling kecil oleh sisa pembakaran sampah kota. Hasibuan *et al.* (2012) menyatakan bahwa sumber pencemaran terbesar berasal dari asap kendaraan bermotor, yakni sekitar 60%–70%.

Deskripsi Produk dan Penerapan GMP

Ayam sukabumi merupakan produk hasil olahan ayam yang mempunyai citarasa yang khas. Hal tersebut dikarenakan telah ditambahkan beberapa bumbu dan perlakuan sebelum dipajan. Bumbu-bumbu yang ditambahkan adalah kunyit, serai, daun salam, dan garam. Perlakuan yang dilakukan adalah proses penguningan ayam tersebut sehingga ayam berwarna kuning dan bercita rasa khas.

Soeprapto dan Retno (2009) menyatakan bahwa penerapan GMP dan SSOP dilakukan untuk menjaga kualitas produk pangan. Prinsip penerapan GMP yaitu cara dalam menjalankan, mengendalikan dan mengawasi pelaksanaan proses produksi mulai dari penerimaan bahan baku sampai dengan konsumen akhir. Rachmawati (2012) menyatakan bahwa lingkungan pasar merupakan salah satu faktor utama kontaminasi daging ayam. Proses selanjutnya adalah pengolahan karkas ayam menjadi ayam kuning sukabumi yakni proses penguningan. Tanaman rempah yang merupakan bahan tambahan dalam proses penguningan dapat menjadi sumber kontaminasi terhadap produk yang

dihasilkan. Tanaman sangat mudah terkontaminasi oleh logam berat yang berasal dari absorpsi dari tanah maupun air (Pence *et al.* 2000).

Ayam sukabumi yang telah melewati proses penguningan siap dipajan untuk dijual ke konsumen. Produk tersebut dipajan menggunakan baskom yang umumnya terbuat dari bahan besi. Semua ayam kuning sukabumi yang akan dijual dipajan langsung di gerobak sehingga konsumen dapat melihat dan memilih ayam yang akan dibeli. Beberapa penjual menggunakan penutup kain kasa pada ayam kuning sukabumi yang dipajan dengan tujuan melindungi produk dari debu dan kotoran fisik. Agustina *et al.* (2009) menyatakan bahwa penutup kain tidak cukup untuk melindungi produk pangan terhadap cemaran dari udara, baik debu maupun asap knalpot. Para penjual ayam kuning sukabumi memakai gerobak yang dilengkapi kaca pelindung sebagai fasilitas berjualannya untuk melindungi produknya tercemar dari lingkungan.

Kontrol Cemaran Logam Berat pada Karkas Ayam

Identifikasi cemaran logam berat dilakukan pada karkas ayam kontrol yang diperoleh dari salah satu peternakan besar di Indonesia. Hasil dari pengujiannya disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kandungan logam berat pada karkas ayam kontrol

Jenis Logam Berat	Konsentrasi	Rentang	Batas Maksimum Cemaran	Keterangan
		ppm		
Pb	0.76 ± 0.14	0.60 - 0.87	1	MS
Cd	0.46 ± 0.05	0.41 - 0.49	0.3	TMS
Cu	0.85 ± 0.01	0.84 - 0.86	5	MS

^appm= part per million; TMS= Tidak Memenuhi Syarat; MS= Memenuhi Syarat; Pb= Timbal; Cd= Kadmium; Cu= Tembaga

Rataan kandungan Timbal (Pb) ayam kontrol sebesar 0.76 ppm. Nilai ini masih berada di bawah batas maksimum cemaran Pb dalam ketentuan SNI 7387:2009 sebesar 1 ppm. Akan tetapi, lain halnya dengan kandungan Kadmium (Cd). Kandungan Cd pada ayam kontrol sebesar 0.46. Nilai tersebut telah melewati batas maksimum cemaran yang ditetapkan SNI 7387:2009 sebesar 0.3 ppm. Nilai rataan kandungan Tembaga (Cu) sebesar 0.85 ppm. Dirjen Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia membatasi Cu maksimum dalam makanan adalah sebesar 5 ppm, sehingga kandungan Cu pada karkas ayam kontrol tidak melebihi batas.

Nilai kandungan logam Cd yang melebihi batas maksimum yang ditetapkan dapat disebabkan beberapa faktor. Salah satunya adalah sumber pencemar Cd yang lebih banyak dibandingkan logam Pb dan Cu. Sebagian besar sumber kontaminasi dari logam Cd berasal dari rokok (Norvell *et al.* 2000;

Melissa *et al.* 2004; Sudarmadji *et al.* 2006) dan asap knalpot. Logam Cd terabsorpsi banyak melalui pernafasan, yakni sekitar 10%–40% tergantung kondisi fisik wilayah. Pencemaran logam berat Cd juga dapat terjadi pada ternak melalui udara yang mengontaminasi pakan yang mengandung mineral fosfat tinggi, melalui biji-bijian maupun melalui air dan tanah. Jika ternak mengonsumsi pakan tersebut, maka akan mengakibatkan terakumulasinya logam Cd dalam tubuh ternak (Harlia *et al.* 2005).

Cemaran Logam Berat Timbal (Pb), Kadmium (Cd), dan Tembaga (Cu)

Cemaran Logam Berat Timbal (Pb)

Timbal atau Plumbum (Pb) adalah salah satu logam berat yang umum mencemari lingkungan. Darmono (1995) menyebutkan bahwa logam ini paling banyak menimbulkan keracunan pada makhluk hidup. Keracunan Pb kebanyakan disebabkan oleh pencemaran lingkungan atau udara, terutama di kota-kota besar. Pengujian kandungan logam Pb pada ayam kuning sukabumi ditampilkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai rata-rata kandungan Pb ayam kuning sukabumi 0 jam pemajaan dan setelah 3 jam pemajaan

No	Pedagang	0 jam pemajaan		3 jam pemajaan	
		Konsentrasi Pb (ppm)	Keterangan	Konsentrasi Pb (ppm)	Keterangan
1	K1	1.48± 0.38	TMS	5.74± 0.76	TMS
2	K2	1.21± 0.67	TMS	4.89± 2.89	TMS
3	K3	3.23 ± 0.13	TMS	5.43± 1.74	TMS
4	K4	2.74± 1.37	TMS	3.40± 1.92	TMS
5	K5	2.64± 1.02	TMS	4.64± 0.46	TMS
Rataan		2.26 ± 1.03a		4.81 ± 1.58b	

Keterangan : Superskrip berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata pada taraf uji 5%;

Batas Maksimum Cemaran= 1 ppm (SNI 7387:2009); ppm= part per million; TMS= Tidak Memenuhi Syarat

Hasil menunjukkan bahwa nilai tertinggi kandungan Pb pada ayam kuning sukabumi 0 jam pemajaan sebesar 3.23 ppm dan terendah 1.21 ppm, sedangkan pada 3 jam pemajaan tertinggi bernilai 5.74 ppm sedangkan terendah sebesar 3.40 ppm. Semua sampel menunjukkan nilai di atas batas maksimum cemaran, yakni sebesar 1 ppm. Kandungan Pb dipengaruhi secara nyata oleh lama pemajaan.

Hasil yang berbeda nyata diakibatkan adanya perbedaan lamanya sampel terpapar di pinggir jalan. Terpaparnya produk di pinggir jalan mengakibatkan Pb yang berasal dari asap kendaraan bermotor yang melintas mencemari produk. Asap knalpot yang berwujud partikel gas mengandung logam Pb yang dapat menempel dan mencemari produk ayam kuning sukabumi.

Sampel ayam kuning sukabumi 0 jam memiliki kandungan Pb yang cukup tinggi. Logam Pb yang terdapat pada ayam kuning sukabumi 0 jam dimungkinkan berasal dari ternak hidup ayam tersebut. Sentra peternakan ayam potong di Bogor tersebar di wilayah Kabupaten Bogor. Diperlukan transportasi yang cukup panjang untuk menuju sentra pemotongan ayam di Bogor terdapat di Kebon Pedes. Transportasi dari peternakan hingga Tempat Pemotongan Ayam (TPA), ternak melewati jalanan yang cukup padat dengan kendaraan dan fasilitas yang terbatas. Transportasi tersebut menyebabkan ayam menghirup asap knalpot yang cukup banyak. Menurut Sudarmaji *et al.* (2006), Pb yang dihasilkan dari asap knalpot dalam bentuk Pb organik. Jarup (2003) menambahkan bahwa Pb organik dapat masuk ke dalam tubuh melalui pernafasan dan terikat pada darah dan akan masuk ke dalam badan dan membrane sel darah merah. Eliminasi kandungan Pb berlangsung secara lambat melalui urin. Di dalam darah Pb mempunyai masa paruh mencapai 1 tahun.

Cemaran Logam Berat Kadmium (Cd)

Ayam sukabumi yang dijual di pinggir jalan menyebabkan adanya pencemaran logam Kadmium (Cd). Kadmium adalah logam yang terkandung pada asap kendaraan bermotor yang keluar bersama dengan logam berat lainnya, seperti Timbal (Pb), Merkuri (Hg), Arsen (As), dan Kromium (Cr) (Zereini *et al* 2005). Hasil pengujian kandungan logam Cd pada ayam kuning sukabumi ditampilkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Nilai rata-rata kandungan Cd ayam kuning sukabumi 0 jam pemajaan dan setelah 3 jam pemajaan

No	Pedagang	0 jam pemajaan		3 jam pemajaan	
		Konsentrasi Cd (ppm)	Keterangan	Konsentrasi Cd (ppm)	Keterangan
1	K1	0.58± 0.19	TMS	1.12± 0.25	TMS
2	K2	0.60± 0.06	TMS	1.16± 0.15	TMS
3	K3	0.87± 0.04	TMS	1.27± 0.02	TMS
4	K4	0.94± 0.13	TMS	1.15± 0.01	TMS
5	K5	0.80± 0.41	TMS	1.23± 0.08	TMS
Rataan		0.76 ± 0.22 ^a		1.18 ± 0.12 ^b	

Keterangan : Superskrip berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata pada taraf uji 5%; Batas Maksimum Cemaran= 0.3 ppm (SNI 7387:2009); ppm= part per million; TMS= Tidak Memenuhi Syarat

Hasil menunjukkan bahwa nilai tertinggi kandungan Cd pada ayam kuning sukabumi 0 jam pemajaan sebesar 0.94 ppm dan terendah 0.58 ppm, sedangkan pada 3 jam pemajaan kandungan tertinggi bernilai 1.27 ppm sedangkan terendah sebesar 1.12 ppm. Semua sampel menunjukkan nilai di atas batas maksimum cemaran, yakni sebesar 0.3 ppm. Nilai Cd dipengaruhi secara nyata oleh perbedaan lama pemajaan.

Penyebab kenaikan nilai kandungan logam Cd yang terjadi sama dengan penyebab kenaikannya logam Pb, yakni asap kendaraan bermotor. Di samping itu, sebagian besar sumber kontaminasi dari logam Cd berasal dari rokok (Sudarmadji *et al.* 2006). Menurut Massadeh *et al.* (2005), kandungan Cd dalam asap rokok berkisar 0.1-0.3 ppm. Logam Cd terabsorpsi banyak melalui pernafasan, yakni sekitar 10%–40% tergantung kondisi fisik wilayah. Pencemaran Cd juga dapat terjadi pada ternak selagi hidup melalui udara yang mengkontaminasi pakan yang mengandung mineral fosfat tinggi, melalui biji-bijian maupun melalui air dan tanah sehingga berdampak adanya akumulasi logam berat Cd pada ternak (Harlia *et al.* 2005).

Cemaran Logam Berat Tembaga (Cu)

Tembaga digolongkan ke dalam logam esensial. Tembaga dapat mengkontaminasi makanan melalui peralatan yang digunakan. Logam ini biasa bercampur dengan logam lain seperti As, Cd, Sn, dan Zn (Darmono 1995). Hasil pengujian kandungan logam Cu ayam kuning sukabumi ditampilkan pada Tabel 4. Sebesar 2.38 ppm dan terendah 1.76 ppm, sedangkan pada 3 jam pemajaan kandungan tertinggi sebesar 2.25 ppm sedangkan terendah sebesar 1.80 ppm. Semua sampel yang diujikan tidak ada yang melampaui batas cemaran maksimum yang telah ditetapkan. Uji analisis ragam dilakukan untuk mengetahui pengaruh lama pemajaan terhadap kandungan Cu. Hasil analisis ragam menunjukkan tidak berbeda nyata. Tidak adanya perbedaan nilai kandungan disebabkan karena logam Cu yang tidak terdapat pada pencemaran lingkungan.

Tabel 4. Nilai rata-rata kandungan Cu ayam kuning sukabumi 0 jam pemajaan dan setelah 3 jam dipajan

No	Pedagang	0 jam pemajaan		3 jam pemajaan	
		Konsentrasi Cu (ppm)	Keterangan	Konsentrasi Cu (ppm)	Keterangan
1	K1	2.16± 0.44	MS	2.00± 0.33	MS
2	K2	1.76± 0.02	MS	2.01± 0.08	MS
3	K3	2.38± 0.61	MS	2.25± 0.20	MS
4	K4	2.14± 1.05	MS	2.10± 0.18	MS
5	K5	1.95± 0.04	MS	1.80± 0.24	MS
Rataan		2.08 ± 0.48a		2.03 ± 0.23a	

Keterangan : Superskrip yang sama pada baris yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf uji 5%; Batas Maksimum Cemaran= 5 ppm (Dirjen Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia); ppm= part per million; MS= Memenuhi Syarat

Kandungan Cu pada ayam kuning sukabumi umumnya diperoleh dari ternak itu sendiri. Logam Cu yang terdapat dalam ternak masuk melalui pakan karena Cu merupakan logam esensial yang dibutuhkan oleh tubuh. Logam Cu yang umumnya terdapat pada pakan berasal dari biji-bijian yang

tergantung pada kondisi wilayah tersebut (Lee *et al.* 1999). Adanya proses pembumbuan dengan menggunakan kunyit juga menambah kandungan Cu pada ayam kuning sukabumi. Kumar *et al.* (2007) menyatakan bahwa kunyit mengandung mineral yang termasuk di dalamnya logam Cu sebesar 0.2 ppm.

KESIMPULAN

Logam Pb dan Cd pada ayam kuning sukabumi telah melewati batas cemaran yang telah ditentukan, sedangkan logam Cu tidak melewati batas cemaran yang telah ditentukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, F., R. Pembayun & F. Febry . 2009. Higiene dan sanitasi pada pedagang makanan jajanan tradisional di lingkungan sekolah dasar di Kelurahan Demang Lebar Daun Palembang tahun 2009. Jurnal Imiah Publikasi Fakultas Kesehatan Universitas Sriwijaya RA0421. <http://eprints.unsri.ac.id/64/>[7 oktober 2014]
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2009. SNI 7387:2009: Batas Maksimum Cemaran Logam Berat dalam Pangan Jakarta (ID): Badan Standardisasi Nasional
- Darmono. 1995. Logam dalam Sistem Biologi Mahluk Hidup. Jakarta (ID): Universitas Indonesia
- Google maps. Jalan KS Tubun dan Jalan Pajajaran Bogor .<https://www.google.co.id/maps/place/Jalan+K.+S.+Tubun,+Bogor+Utara.>[7 oktober 2014]
- Harlia, E., A. Yuli & TM. Eulies. 2005. Deteksi logam berat kadmium (Cd) dalam hati ayam buras dan upaya reduksi secara fisik (penggorengan) dan kimiawi (penggunaan filtrat belimbing wuluh). Prosiding Lokakarya Nasional Keamanan Pangan Produk Peternakan Jatnagor (ID): Puslitbangnak. hlm 37-41; <http://peternakan.litbang.deptan.go.id/fullteks/lokakarya/lkpangan05-9.pdf> [3 Maret 2013]
- Hasibuan, R. 2012. Analisa kandungan timbal (Pb) pada minyak sebelum dan sesudah penggorengan yang digunakan pedagang gorengan sekitar kawasan *traffic light* Kota Medan tahun 2012. Lingkungan dan Kesehatan Kerja :1-8. <http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0CDcQFjAC&url=http%3A%2F%2Fdownload.portalgaruda.org>
- Jarup L. 2003. Hazard of heavy metal contamination. Br. Med. Bull. 68(1):167-182.
- Kumar, NJI., H. Soni & RN. Kumar. 2007. Characterization of heavy metals in vegetables using inductive coupled plasma analyzer (ICPA). J Appl Sci Environ Manage 11(3): 75–79

- Lee, J., DG. Master., CL, White., ND. Grace & GJ Judson. 1999. Current issues in trace element nutrition of grazing livestock in Australia and New Zealand. *Aust J Agric Res* 50(8): 1341–1354
- Massadeh, AM., FQ. Alali & QM. Jaradat. 2005. Determination of cadmium and lead in different cigarette brands in Jordan. *Environmental Monitoring and Assessment* 2005(104):163-170.
- Melissa, A., Haendel, F. Tilton., GS. Bailey & RL. Tanguay. 2004. Developmental toxicity of the dithiocarbamate pesticides sodium metam in Zebra fish. *Toxicol Sci* 81(2):390–400.
- Milestone. 2010. Pro-16 and pro-24 rotors user manual for wet destruction on AAS/ICP sample Rev. 7. Sorisole Italy.
- Norvell, WA., J. Wu., DG. Hopkins & RM. Welch. 2000. *Division S-8-Nutrient management soil & plant analysis: Association of cadmium in durum wheat grain with soil chloride and chelate extractable soil cadmium. Soil Sci Soc Am J* 64(6): 2162–2168.
- Presiden Republik Indonesia. 1996. Undang-undang No. 7 Tahun 1996 Tentang : Pangan. LN 1996/1999 TLN 3656. Jakarta.
- Pence, NS., PB. Larsen., SD. Ebbs., DL. Letham., MM. Lasat., DF Garvin., D. Eide & LV. Kochian. 2000. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Di dalam: Pence NS, Larsen PB, Ebbs SD, Letham DL, Lasat MM, Garvin DF, Eide D, Kochian LV, editor. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. Washington (US): PNAS. hlm 4956-4960; Tersedia pada <http://www.pnas.org/content/97/9/4956.full.pdf>. [6 Juni 2013]
- Rachmawati, MA. 2012. Logaritma angka lempeng total dan faktor penyebab kontaminasi daging ayam di tempat pemotongan ayam, transportasi dan tempat penjualan di pasar Beringharjo Jogjakarta. *Buletin Laboratorium Veteriner* 12(3): 14–20
- Soeprapto F & A. Retno. 2009. Penilaian GMP dan SSOP pada bagian pengolahan makanan di katering X Surabaya dengan metode skoring sebagai prasyarat penerapan HACCP. *The Indonesian Journal of Public Health* 6(1):30–37.
- Steel, RGD & JH. Torrie. 1995. *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach*. Sumantri B, Penerjemah. Jakarta (ID): Penerbit PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Sudarmaji., J. Mukono & IP Corie. 2006. Toksikologi logam berat B3 dan dampaknya terhadap kesehatan. *J. Kesehatan Lingkungan* 2(2):129–142.
- Sudarmaji. 2005. Analisis Bahaya dan Pengendalian Titik Kritis (Hazard Analysis Critical Control Point). *J. Kesehatan Lingkungan* 1(2):183-191.

Zereini, F., F. Alt., J. Messerschmidt., C. Wiseman., I. Feldmann., A. von Bohlen., J. Muller., K. Liebl & W. Puttman. 2005. Concentration and distribution of heavy metal in urban airborne particulate matter in Frankfurt am Main Germany. *Environ. Sci. Technol.* 39(9):2983-2989.

**ANALISIS KADAR PROTEIN KUNING TELUR AYAM KAMPUNG
(*Gallus domesticus*)
DENGAN CARA PEMASAKAN YANG BERBEDA**

Hotmaroloan Silalahi¹, Sani Susanti², Hanif Anisatun^{2*}

¹Program Studi Farmasi Universitas 17 Agustus 1945

²Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

*Email korespondensi: hanipsa@gmail.com

ABSTRAK

Telur Ayam Kampung (*Gallus domesticus*) merupakan sumber protein hewani yang dibutuhkan oleh tubuh guna menjaga berlangsungnya metabolisme tubuh. Dari sebutir telur didapatkan gizi yang cukup sempurna karena mengandung zat-zat gizi yang lengkap dan mudah dicerna. Oleh karenanya, telur merupakan bahan pangan yang sangat baik untuk anak-anak yang sedang tumbuh dan memerlukan protein dalam jumlah banyak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh cara pemasakan yang berbeda terhadap kadar protein kuning telur ayam kampung (*Gallus domesticus*) dengan metode kjeldahl. Penelitian dilakukan dengan uji protein secara kualitatif dan kuantitatif. Hasil penelitian membuktikan bahwa rata-rata kadar protein pada kuning telur ayam kampung (*Gallus domesticus*) pada telur ayam kampung tanpa pengolahan 14,97 g/100g, telur ayam kampung rebus 14,89 g/100g, telur ayam kampung goreng 15,63 g/100g. Dari hasil analisis data diperoleh data bahwa waktu pemanasan tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kadar protein kuning telur ayam kampung ($P>0.05$).

Kata Kunci: Telur Ayam Kampung (*Gallus domesticus*), Protein

PENDAHULUAN

Telur merupakan produk peternakan yang memberikan sumbangan besar bagi tercapainya kecukupan gizi masyarakat. Dari sebutir telur didapatkan gizi yang cukup sempurna karena mengandung zat-zat gizi yang lengkap dan mudah dicerna (Sudaryani, 2003). Teknik pengolahan telur telah banyak dilakukan untuk meningkatkan daya tahan serta kesukaan konsumen (Irmansyah dan Kusnadi, 2009). Kandungan gizi telur antara lain: air 73,7 %; protein 12,9 %; lemak 11,2%; Karbohidrat 0,9%; dan lemak pada putih telur hampir tidak ada (Komala, 2008). Telur yang dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia umumnya berasal dari unggas yang diternakan. Jenis telur yang banyak dikonsumsi adalah telur ayam, telur itik, telur puyuh, telur penyu, telur kalkun, telur angsa, telur merpati dan telur unggas lainnya (Astawan, 2004).

Ayam kampung (ayam buras) merupakan ayam lokal di Indonesia. Ayam kampung juga dikenal dengan sebutan ayam buras (bukan ras), atau ayam sayur (Soekarto, 2013). Telur ayam kampung/buras memiliki berat yang berbeda dengan telur ayam ras, berat telur ayam kampung yaitu antara 34-45 gram perbutir. Namun harga telur ayam kampung lebih mahal dibandingkan telur ayam ras. Telur ayam kampung umumnya digunakan sebagai bahan ramuan jamu dan

dimakan setengah matang (Astawan, 2004). Secara ringkas, struktur telur pada umumnya terdiri dari kerabang (kulit telur) $\pm 10\%$, putih telur (albumen) $\pm 60\%$, dan kuning telur (yolk) $\pm 30\%$ (Sudaryani, 2006). Kuning telur mengandung air, protein, lemak, vitamin dan beberapa mineral. Kuning telur berbatasan dengan putih telur dan dibungkus oleh suatu lapisan yang disebut membran vitelin. Umumnya kuning telur berbentuk bulat, berwarna kuning atau oranye, terletak pada pusat telur dan bersifat elastis. Warna kuning dari kuning telur disebabkan oleh kandungan santrofil yang berasal dari makanan ayam. Pigmen lain yang banyak terdapat di dalamnya adalah pigmen karotenoid

Protein merupakan komponen penting dari makanan manusia yang dibutuhkan untuk penggantian jaringan, pasokan energi, dan makromolekul serbaguna disistem kehidupan yang mempunyai fungsi penting dalam semua proses biologi seperti sebagai katalis, transportasi, berbagai molekul lain seperti oksigen, sebagai kekebalan tubuh, dan menghantarkan impuls saraf (Fredrick, et al., 2013). Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Bakhtra dkk (2016) menunjukkan bahwa kandungan protein pada telur ayam kampung lebih tinggi jika dibandingkan dengan telur ayam ras, hal ini juga didukung oleh penelitian Ramadhani dkk (2018), bahwa kandungan protein pada putih telur dan kuning telur ayam kampung masing-masing memiliki kadar protein yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan telur ayam ras.

Pengolahan bahan makanan akan berdampak pada kadar gizi dari bahan makanan tersebut. Proses pengolahan dan metode pemasakan menyebabkan perubahan dalam kandungannya baik dengan cara meningkatkan kandungannya ataupun menurunkan kandungannya (Widowati, dkk., 2017). Penentuan jumlah protein secara empiris yang umum dilakukan adalah dengan menentukan jumlah nitrogen (N) yang dikandung oleh suatu bahan. Penentuan protein berdasarkan jumlah N menunjukkan protein kasar karena selain protein juga terikut senyawa N bukan protein misalnya urea, asam nukleat, ammonia, nitrat, nitrit, asam amino, amida, purin, dan pirimidin. Kadar protein yang ditentukan berdasarkan cara Kjeldahl sering disebut sebagai kadar protein kasar (crude protein) (Sudarmadji, dkk., 1989).

Dalam hal ini, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian tentang kandungan protein yang terdapat pada kuning telur ayam kampung dan mengetahui perbedaan kadar protein pada telur yang telah mengalami proses pemanasan dengan waktu yang berbeda dengan metode Kjeldahl.

MATERI DAN METODE

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental kualitatif dengan metode Uji Biuret dan kuantitatif dengan metode Kjeldahl. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan Bogor dan di Laboratorium Penelitian Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta pada bulan Agustus 2019 - Oktober 2019.

Bahan uji yang digunakan yaitu Telur Ayam Kampung yang diambil secara purposif di Pasar Bambu Kuning, Sunter Agung, Jakarta Utara.

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, labu Kjeldahl, lemari Asam, kjeldahl digestor, kjeldahl analyser, tecator scrubber, pipet serologik (20ml), oven, cawan, dan alat-alat gelas yang diperlukan dalam penelitian.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain H₂SO₄ (p) (Merck, Cat. No.100748.2500), CuSO₄, K₂SO₄, Pellet NaOH 40% (Merck, Cat. No. 106498.0500), H₃BO₃ 1% (Merck, Cat. No 100165.0100), HCl (p) 0,2 N (Merck, Cat. No. 100316.2500), Na₂B₄O₇.H₂O, Selenium mixture (Merck, Cat. No 108030.0250), Methyl Red (Merck, Cat. No. 106076.0025), Bromocresol Green (Merck, Cat. No.108121.0001), Aqua Destilata.

Pembuatan Pereaksi

Larutan NaOH 40%. Larutan NaOH 40% b/v dibuat dengan melarutkan 40 gram pellet NaOH dalam 100 mL aquades bebas CO₂ (Ditjen POM Depkes R.I, 1979).

Larutan H₃BO₃ 1%. Larutan H₃BO₃ 1% b/v dibuat dengan melarutkan 1 gram asam borat dengan air suling dalam labu ukur 100 ml (Ditjen POM Depkes R.I, 1979). **Larutan HCl 0,2N.** Larutan HCl 0,2 N yaitu encerkan 8,3 ml HCl (p) dengan air hingga 1000 ml (Ditjen POM Depkes R.I, 1979).

Prosedur Penelitian

Penyiapan Bahan Uji. Bahan uji yang digunakan adalah telur ayam kampung yang diambil purposif sampling bahwa bahan uji dapat mewakili populasi. Telur ayam kampung diambil dalam kondisi bagus dan bersih. Telur ayam kampung dikelompokkan menjadi tiga bagian yaitu tanpa pengolahan, rebus dan goreng.

Standarisasi Larutan HCl 0,1 N. Ditimbang 0,5 gram natrium tetraborat (Na₂B₄O₇.H₂O) BM=190,685, lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer 50 ml dan ditambah aquades 10 ml. Setelah larut ditambah 2 tetes indikator metil merah dan dititrasi dengan larutan HCl 0,2 N yang akan distandarisasi sampai warna kuning pucat. Semprot dinding gelas dengan aquades. Teruskan titrasi dengan tetesan lambat, hentikan titrasi bila timbul warna merah jambu muda (Ditjen POM Depkes R.I, 1979). Hitung normalitas larutan dengan menggunakan rumus :

$$\begin{array}{l} \text{Normalitas} \\ \text{Larutan HCl} \\ = \end{array} \quad \frac{\text{Berat Natrium Tetraborat (mg)}}{\text{BE Natrium Tetraborat} \times \text{Volume HCl (ml)}}$$

Penentuan Kadar N-Total dan Protein Total. Penentuan kadar protein total ditetapkan dengan metode Kjeldahl. Ditimbang 1 gram telur ayam kampung (mentah, goreng

dan rebus) yang telah dihaluskan dan dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl lalu tambahkan selenium mixture kedalamnya, kemudian ditambahkan katalisator dan H₂SO₄ pekat. Didekstruksi sampai cairan berwarna jernih pada suhu 375 °C dan didinginkan. Pindahkan secara kuantitatif ke dalam alat destilasi. Tambahkan NaOH 40%. Didestilasi selama 10 menit. Destilat ditampung dalam erlenmeyer berisi H₃BO₃ 1% dan indikator campuran metil merah dan bromocresol Green. Destilat dititrasi dengan larutan HCl 0,2 N. Dilakukan hal yang sama terhadap blanko (SNI, 2006). Kadar N-Total dihitung sesuai dengan rumus yang tercantum pada SNI (2006) yaitu:

$$\% \text{ N-Total} = \frac{\text{ml HCl (Sampel-Blanko)}}{\text{Berat Sampel (g)} \times 1000} \times \text{N HCl} \times 14,007 \times 100\%$$

(Keterangan: N HCl = Normalitas HCl hasil pembakuan 14,007 = Massa atom nitrogen).

Kadar protein total selanjutnya dihitung dengan mengalikan kadar nitrogen dengan faktor konversi. Kadar Protein Total (%) = % N-total x faktor konversi (Keterangan: Faktor Konversi = 6,25). Kadar nitrogen dan kadar protein yang diperoleh dari hasil penetapan kadar masing-masing sampel kemudian dianalisis secara statistik dengan metode standar deviasi menggunakan uji t.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemeriksaan Kualitatif

Pemeriksaan kualitatif pada bahan uji dilakukan dengan menggunakan metode reaksi biuret. Berdasarkan hasil pemeriksaan kualitatif, warna ungu pada reaksi biuret yang menunjukkan positif mengandung protein (Gambar 1).



Gambar 1. Pengujian Protein secara kualitatif. A : Sebelum penambahan NaOH 10% dan CuSO₄ (Uji Biuret) B : Sesudah penambahan NaOH 10% dan CuSO₄ (Uji Biuret)

Pengujian Kadar Protein Total dalam Sampel

Penentuan kadar protein dilakukan dengan metode Kjeldahl. Hasil kadar protein yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 4.2. Analisis dilanjutkan dengan Perhitungan statistik

perhitungan kadar N-total sebenarnya dan perhitungan kadar protein total sebenarnya dalam sampel.

Tabel 1. Hasil Penetapan Kadar N-total dan Protein Total dalam Bahan Uji.

Bahan Uji	Suhu Pengolahan	Waktu Pengolahan	Kadar (g/100g)		Rata-rata (g/100g)
			N-total	Protein Total	
Telur Ayam Kampung Tanpa pengolahan (TAKM)	-	-	2,397	14,97±0,34271	14,97
Telur Ayam Kampung Rebus (TAKR1)	100°C	3 Menit	2,434	15,21±0,8289	
Telur Ayam Kampung Rebus (TAKR2)	100°C	7 Menit	2,380	14,88±0,3723	14,89
Telur Ayam Kampung Rebus (TAKR3)	100°C	11 Menit	2,334	14,59±0,1380	
Telur Ayam Kampung Goreng (TAKG1)	120°C	20 Detik	2,368	14,80±0,0496	15,63
Telur Ayam Kampung Goreng (TAKG2)	120°C	30 Detik	2,539	15,87±0,7115	
Telur Ayam Kampung Goreng (TAKG3)	120°C	40 Detik	2,597	16,23±0,4582	

Keterangan: Data diatas merupakan rata-rata dari tiga kali pengulangan berdasarkan suhu dan waktu pengolahan

Pada Tabel 1 terlihat bahwa jenis bahan uji tanpa pengolahan diperoleh kadar protein sebenarnya adalah 14,97±0,34271 g/100g, dalam hal ini telur ayam kampung tanpa pengolahan lebih rendah kadar proteinnya dibandingkan dengan telur ayam kampung yang mengalami pengolahan. Apabila diambil rata-rata kadar proteinnya sebesar 14,97 g/100g. Maka, kadar proteinnya lebih tinggi dibanding telur ayam kampung direbus namun lebih rendah dari pada telur ayam kampung digoreng.

Pengolahan bahan uji telur ayam kampung rebus pada tiap waktu berbeda namun suhu sama, dimana pada telur ayam kampung rebus 1 (TAKR1) diperoleh kadar protein sebenarnya 15,21±0,8289 g/100g. Sedangkan telur ayam kampung rebus 2 (TAKR2) diperoleh kadar protein sebenarnya 14,88±0,3723 g/100g dan telur ayam kampung rebus 3 (TAKR3) diperoleh kadar protein sebenarnya 14,59±0,1380 g/100g. Dalam hal ini, kadar protein telur ayam kampung mengalami perbedaan. Namun, apabila hasil ketiganya dirata-ratakan maka kadar protein yang dihasilkan sebesar 14,89 g/100g. Sehingga kadar protein telur ayam kampung direbus lebih rendah dari pada telur ayam kampung tanpa pengolahan dan telur ayam kampung digoreng.

Pengolahan bahan uji telur ayam kampung goreng pada tiap waktu berbeda namun suhu yang sama dimana pada telur ayam kampung goreng 1 (TAKG1) diperoleh kadar protein

sebenarnya $14,80 \pm 0,0496$ g/100g. Sedangkan telur ayam kampung goreng 2 (TAKG2) diperoleh kadar protein sebenarnya $15,87 \pm 0,7115$ g/100g dan telur ayam kampung goreng 3 (TAKG3) diperoleh kadar protein sebenarnya $16,23 \pm 0,4582$ g/100g. Dalam hal ini, telur ayam kampung digoreng memiliki perbedaan. Namun, apabila hasil ketiganya dirata-ratakan maka kadar protein telur ayam kampung goreng lebih tinggi dibandingkan telur ayam kampung tanpa pengolahan dan telur ayam kampung direbus. Hasil rata-rata telur ayam kampung digoreng sebesar $15,63$ g/100g.

Penentuan kadar protein pada telur ayam kampung tanpa pengolahan, rebus dan goreng, membuktikan bahwa pada setiap pengolahan bahan uji telur ayam kampung memiliki kadar protein yang berbeda-beda. Menurut Ika (2011), bahwa perbedaan kadar protein yang berbeda disebabkan karena proses pengolahan yang dilakukan, jenis makanan, bentuk tubuh serta adanya perbedaan tingkat kadar air yang berbeda-beda dari setiap bahan.

Dari ketiga jenis pengolahan tersebut, kadar protein tertinggi terdapat pada pengolahan telur ayam kampung yang digoreng dengan rata-rata $15,63$ g/100g, kadar protein sedang terdapat pada pengolahan telur ayam kampung tanpa pengolahan dengan kadar $14,97$ g/100g dan yang paling rendah terdapat pada pengolahan telur ayam kampung yang direbus dengan rata-rata $14,89$ g/100g.

Proses denaturasi mempengaruhi kadar protein (Dewi, 2001). Pemanasan protein dapat menyebabkan reaksi denaturasi. Denaturasi adalah perubahan struktur molekul tanpa memutuskan ikatan peptida. Nilai nutrisi protein tidak hilang karena denaturasi, bahkan mungkin bertambah dari segi gizi, denaturasi protein dapat meningkatkan daya cerna suatu protein.

KESIMPULAN

Kadar protein yang diperoleh pada bahan uji telur ayam kampung tanpa pengolahan sebesar $14,97$ g/100g, telur ayam kampung rebus (TAKR1) $15,21$ g/100g, telur ayam kampung rebus (TAKR2) $14,88$ g/100g, telur ayam kampung rebus (TAKR3) $14,59$ g/100g, telur ayam kampung goreng (TAKG1) $14,80$ g/100g, telur ayam kampung goreng (TAKG2) $15,87$ g/100g dan telur ayam kampung goreng (TAKG3) $16,23$ g/100g. Dari hasil analisis data diketahui bahwa terdapat perbedaan kadar protein pada kuning telur ayam kampung namun tidak bermakna.

DAFTAR PUSTAKA

- Astawan M. 2004. Sehat bersana aneka sehat pangan alami. Tiga serangkai. Solo.
- Bakhtra, D.D.A., Rusdi, Aisyah M. 2016. Penetapan Kadar Protein dalam Telur Unggas Melalui Analisis Nitrogen Menggunakan Metode Kjeldahl. Jurnal Farmasi Higea, Vol. 8, No.

2, 2016 143 .

- Dewi, E.N. (2001). Chemical Analysis During the Processing of Dried Salted and anchovy. *Journal of Coastal Development*, Volume 5, (number 2), 55-65
- Ditjen POM Depkes RI. (1979). *Farmakope Indonesia*. Edisi Ketiga. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Halaman 744, 748.
- Fredrick, W. S., Kumar, V. S., & Ravichandran, S. (2013). Protein analysis of the crab haemolymph collected from the trash. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 5, (4), 304-308.
- Ika SA. 2011. *Studi Pembuatan Konsentrat Protein Ikan (Fish Protein Concentrate) dari Ikan Gabus (Ophiocephalus striat)*. Jakarta (ID): Kementerian Pertanian.
- Komala, I. 2008. *Kandungan Gizi Produk Peternakan*. Student Master animal Science, Fac. Agriculture-UPM.
- Ramadhani, N. ,Heerlina, Anjani, C.P. 2018. Perbandingan kadar protein pada telur ayam dengan metode spektrofotometri sinar tampak. *KARTIKA: Jurnal Ilmiah Farmasi*, Des 2018, 6(2), 53-56 53 p-ISSN 2354-6565 /e-ISSN 2502-3438 DOI: 10.26874/kjif.v6i2.142
- SNI (2006). *Cara Uji Makanan dan Minuman*. SNI 01-2970-2006. Jakarta: Badan Standarisasi Nasional.
- Soekarto.S.T., 2013. *Teknologi Pangan Dan Pengolahan Telur*. Cv Alfabeta. Bandung.
- Sudarmadji, S., Haryono, B., dan Suhardi, B. (1989). *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Edisi Pertama. Cetakan Pertama. Yogyakarta: Penerbit Liberty. Halaman 119, 141-147.
- Sudaryani, T. (2003). *Kualitas Telur*. Jakarta: Penebar Swadaya. Halaman 1, 810, 13, 19.
- Sudaryani, T., 2006. *Kualitas Telur*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Widowati, H., Sulistiani, W. S., dan Sutanto, A. (2017). Pengaruh Proses Pengolahan Terhadap Kadar Logam Berat Dan Kadar Gizi Pada Kacang Panjang. *BIOEDUKASI VOL 8. NO 2 NOV*. Lampung: Fakultas Keguruan Dan Ilmu Pendidikan. ISSN 2080-4701. Halaman 171-174.

ANALISIS KANDUNGAN AFLATOKSIN M1 PADA SUSU KAMBING DENGAN METODE *ENZYM LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY* (ELISA)

Pawesti Wulan Sari¹, Sani Susanty^{2*}

¹Universitas Muhammadiyah Sukabumi

²Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

*e-mail korespondensi: sani@pertanian.go.id

ABSTRAK

Susu adalah salah satu bahan pangan asal hewan yang kaya akan zat gizi. susu kambing merupakan alternatif selain susu sapi pada umumnya. Susu kambing mempunyai protein terbaik setelah telur dan hampir setara dengan ASI. Susu adalah salah satu bahan pangan yang mudah sekali terkontaminasi, salah satunya terkontaminasi oleh aflatoksin golongan mikotoksin. Jenis toksin yang sering dijumpai pada produk susu adalah aflatoksin M1 (AFM1) yang merupakan hasil metabolisme hewan yang mengonsumsi pakan yang terkontaminasi dengan aflatoksin B1 (AFB1). Penentuan aflatoksin M1 pada susu kambing dilakukan dengan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Berdasarkan hasil pengujian, semua sampel yang di ujikan memiliki kandungan aflatoksin M1 kurang dari 500 ppt. Kandungan aflatoksin M1 yang kurang dari Batas Maksimum Residu (BMR) tersebut, mengindikasikan bahwa semua sampel susu kambing aman untuk dikonsumsi.

Kata kunci : *aflatoksin M1, ELISA, susu kambing*

PENDAHULUAN

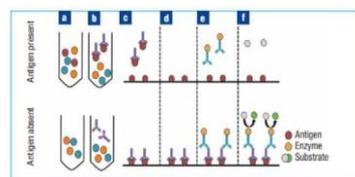
Susu adalah salah satu bahan pangan asal hewan yang kaya akan zat gizi. Kandungan gizi yang lengkap pada susu menjadi alasan tingginya kebutuhan dan permintaan masyarakat akan susu. Dalam memenuhi kebutuhan susu, masyarakat Indonesia juga banyak mengonsumsi susu kambing untuk dijadikan alternatif selain susu sapi pada umumnya. Susu kambing mempunyai protein terbaik setelah telur dan hampir setara dengan ASI (Air Susu Ibu) (Zakaria *et al.*, 2011). Susu merupakan salah satu bahan pangan yang mudah terkontaminasi, salah satunya terkontaminasi oleh aflatoksin golongan mikotoksin. Aflatoksin adalah senyawa hasil metabolit sekunder yang dihasilkan oleh jamur *Aspergillus flavus* yang bersifat sangat toksik (Safika *et al.*, 2015). *Aspergillus* dapat menghasilkan spora yang mudah tertiuap angin dan menyebar sehingga menyebabkan terjadinya kontaminasi berbagai bahan pangan (Safika *et al.*, 2015). *Aspergillus flavus* dapat menghasilkan sejenis mikotoksin aflatoksin yaitu aflatoksin B1 dan aflatoksin B2 (Sari dan Wantini, 2017).

Aflatoksin M1 (AFM1) merupakan metabolit hidroksilasi dari aflatoksin B1 (AFB1) dan sering atau dapat ditemukan pada susu akibat hewan laktasi mengonsumsi pakan yang tercemar AFB1. AFM1 dapat ditemukan pada produk olahan susu karena tidak terurai dengan pemanasan (Martindah dan Bahri, 2016). Salah satu metode untuk menguji kadar aflatoksin di

dalam susu adalah dengan menggunakan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

ELISA adalah metode yang pendeteksi antigen dengan *antibody* dan reaksi enzimatik yang ditunjukkan dengan adanya perubahan warna akibat keberadaan antigen yang terdeteksi secara spesifik. Tingkat akurasi hasil uji ELISA ditentukan oleh beberapa faktor yaitu proses preparasi dan konsentrasi antigen yang digunakan (Sumiati *et al.*, 2015). Proses analisis aflatoxin dilakukan dengan menggunakan jenis ELISA kompetitif. Proses analisis secara umum dilakukan melalui 5 tahapan (Gambar 1). Tahap pertama yaitu tahap *coating* atau pelapisan *well polysterene ELISA plate* dengan antigen. Tahap kedua yaitu tahap *blocking unbound site* atau tahap *bloking* pada antigen non target yang bertujuan untuk meminimalisasi terjadinya kesalahan analisis. Tahap selanjutnya yaitu tahap penambahan antibodi spesifik ke dalam *well* sehingga akan terjadi proses pengikatan antara antibodi dengan antigen pada sampel. Tahap keempat yaitu tahap penambahan enzim. Tahap terakhir adalah tahap penambahan substrat yang akan bereaksi dengan antigen dan antibodi (Herniawati, 2017).

Gambar 1. Proses pengikatan antigen dengan antibodi pada ELISA kompetitif. (Rightslink, 2016)



Metode ELISA tergolong sebagai metode pengukuran semi kuantitatif yang dapat mendeteksi jumlah kadar atau konsentrasi suatu antigen atau antibodi. Namun, metode ELISA masih membutuhkan uji lanjutan yang mendukung kespesifikasian hasil karena tingkat spesififikasi dalam mengenali antigen atau antibodi yang sesuai masih rendah. Uji lanjutan yang dapat dilakukan untuk mengonfirmasi kebenaran hasil metode ELISA adalah dengan HPLC (Lusiastuti dan Peranginangin, 2008).

MATERI DAN METODE

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah mikro sentrifugasi *eppendorf centrifuge 5430*, tabung mikro sentrifugasi, pipet mikro, labu ukur, ELISA reader, tisu, *well*, *microplate* dan *aluminium foil*. Bahan yang digunakan adalah susu kambing sepuluh sampel, *deamin water* (DW), kit Ridanscreen yang berisi standar aflatoksin 0 ppt, standar aflatoksin 5 ppt, standar aflatoksin 10 ppt, standar aflatoksin 20 ppt, standar aflatoksin 40 ppt, standar aflatoksin 80 ppt, *buffer wash* bubuk, konjugat, antibodi, substrat/kromogen, dan *stop solution*.

Metode

Preparasi Sampel. Ditimbang 5 gram sampel susu kambing dengan teliti dalam labu ukur 50 mL. Dimasukkan atau ditambahkan DW sampai batas tara kemudian dikocok hingga susu kambing larut dan menjadi homogen setelah itu pipet sebanyak 2 mL ke dalam mikrotube dan disentrifuse dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit.

Pembuatan Buffer Wash. *Buffer wash* dalam kemasan *sachet* dalam kit yang berbentuk bubuk dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml. *Buffer wash* dilarutkan, ditera dan dihomogenkan dengan DW hingga volume 100 ml. Larutan *buffer wash* sebanyak 5 ml dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml, ditambahkan dan ditera dengan 45 ml aquades.

Pengujian Aflatoksin dengan ELISA. *Well* ELISA aflatoksin M1 kit disiapkan. Larutan antigen atau antibodi sebanyak 100 gL ditambahkan ke setiap sumur dari *microwell*, dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu ruang (20-25°C /68-77° F) selama 15 menit. Larutan antigen dibuang dengan membalikkan posisi *microwell* pada kertas penyerap, kemudian dilakukan pencucian sebanyak 3 kali dengan 250 gL larutan *washing buffer* pada setiap sumur. Standar AFM1 dan sampel masing-masing sebanyak 100 gL ditambahkan ke setiap sumur, dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu ruang dalam keadaan gelap selama 30 menit. Cairan standar dan sampel dibuang dengan cara membalikkan posisi *microwell* pada kertas penyerap, kemudian dilakukan pencucian sebanyak 3 kali dengan 250 gL larutan *washing buffer*. Enzim konjugat sebanyak 100 gL ditambahkan ke setiap sumur, dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu ruang dalam keadaan gelap selama 15 menit. Cairan dibuang dengan cara membalikkan posisi *microwell* pada kertas penyerap, kemudian dilakukan pencucian sebanyak 3 kali dengan 250 gL larutan *washing buffer*. Substrat/kromogen sebanyak 100 gL ditambahkan ke setiap sumur dan dihomogenkan, kemudian diinkubasi pada suhu ruang dalam keadaan gelap selama 15 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 100 gL *stop solution* ke setiap sumur dan mengukur absorbansi pada 450 nm. Cara mengukurnya yaitu dengan memasukkan *plate* yang berisi *well* ke dalam ELISA reader kemudian dibaca dalam 15 menit setelah penambahan *stop solution*

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi Susu Kambing

Susu kambing merupakan sampel yang digunakan dalam analisis kandungan aflatoksin dengan ELISA. Sampel susu yang digunakan sebanyak sepuluh sampel yang berbeda. Sampel diperoleh di lingkungan sekitar balai yang diambil secara acak. Kondisi sampel yang diambil dalam keadaan terkemas rapi tanpa ada cacat atau kerusakan pada kemasan. Proses sentrifugasi dilakukan dengan menggunakan mikro sentrifugasi *eppendorf centrifuge* 5430. Sentrifugasi dilakukan untuk memisahkan mikotoksin AFM1 yang terkandung di dalam susu dari komponen-komponen susu lainnya. Prinsip sentrifugasi adalah pemisahan komponen-komponen sampel dengan memanfaatkan gaya putar sentrifugal berdasarkan bobot molekul. Setelah disentrifugasi sampel terpisah membentuk 3 lapisan yaitu endapan, supernatan yang mengandung AFM1, dan lapisan lemak susu. Pengujian dilakukan dengan mengambil supernatan pada lapisan tengah (Prasetyo *et al.*, 2017). Untuk aflatoksin M1 yang ingin diisolasi berada pada supernatan lapisan tengah hal ini dikarenakan ia termasuk senyawa hapten. Senyawa hapten sendiri merupakan *univalent*. Antigen *univalent* merupakan senyawa kimia yang dapat menyusun kompleks antibodi. Faktor yang membuat AFM1 berada pada supernatan lapisan tengah, karena bobot molekul AFM1 lebih besar dibandingkan dengan bobot molekul lemak susu (Iqbal, 2010).

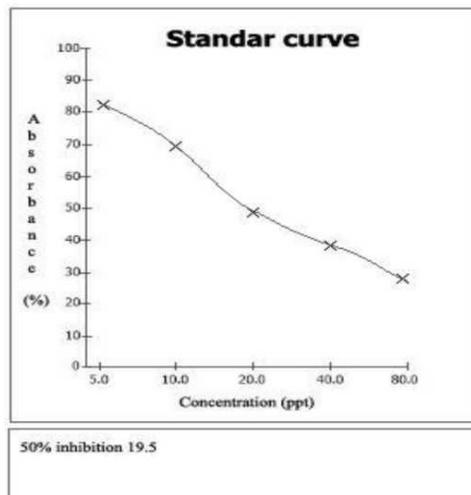
Tabel 1 Konsentrasi larutan standar aflatoksin M1 hasil pembacaan ELISA

[Konsentrasi] (ppt)	Absorbansi (A)	Rata-rata
0	1.890	1.890
	1.890	
5	1.570	1.571
	1.572	
10	1.312	1.313
	1.314	
20	0.932	0.931
	0.930	
40	0.748	0.738
	0.729	
80	0.493	0.517
	0.541	

Analisis Kandungan Aflatoksin M1 pada Susu Kambing

Seperti yang kita ketahui bahwa susu kambing merupakan susu yang mempunyai protein terbaik setelah telur dan hampir setara dengan Air Susu Ibu (ASI). Mengonsumsi susu kambing dengan kandungan aflatoksin M1 sendiri maka sangat berbahaya dan dapat menimbulkan beberapa kerugian bagi tubuh yang salah satunya adalah dapat menurunkan sistem kekebalan tubuh.

Tabel 1 menunjukkan konsentrasi larutan standar aflatoksin M1 hasil pembacaan menggunakan ELISA reader. Standar yang digunakan berjumlah 6 buah dengan konsentrasi yaitu 0; 5; 10; 20; 40 dan 80 ppt. Dari pembacaan tersebut didapat juga kurva standar, kurva yang diperoleh berbentuk *cubic spline* seperti terlihat pada Gambar 2. 50% inhibition kurva standar yang diperoleh adalah sebesar 19.5, nilai ini masuk ke dalam rentang 50% inhibition yang diperbolehkan merujuk kepada kurva standar optimum yang terdapat di dalam Ridascreen ELISA aflatoksin kit yang memiliki 50% inhibition sebesar 20.3.



Gambar 2. Kurva standar aflatoksin hasil pembacaan ELISA reader

Merujuk pada Tabel 2 tidak ada konsentrasi aflatoksin M1 yang melebihi Batas Maksimum Residu (BMR) yang diperbolehkan pada susu yaitu sebesar 500 ppt. Namun, ada beberapa sampel yang hasilnya di luar kurva yaitu ditunjukkan dengan adanya tanda bintang (*), dan hasil tersebut tidak signifikan. Hal tersebut dikarenakan hasil pembacaan absorbansi sampel tidak terdapat dalam rentang kurva standar aflatoksin M1 yang diperoleh. Namun, secara keseluruhan sampel susu kambing yang diuji memiliki kandungan Aflatoksin M1 di bawah BMR, hal tersebut menunjukkan sampel tersebut aman untuk dikonsumsi.

Keberadaan aflatoksin M1 pada susu yang melewati BMR yang terdapat di Indonesia seharusnya dilakukan uji lanjutan seperti HPLC untuk menentukan kebenaran hasil uji ELISA yang didapat namun pada pengujian yang dilakukan dan setelah didapat data bisa dilihat bahwa konsentrasi aflatoksin masih dibawah BMR sehingga bisa di katakan bahwa sampel yang diuji layak untuk di konsumsi oleh masyarakat. Untuk batas maksimum residu di beberapa negara tentu saja berbeda oleh sebab itu akan berdampak baik dan buruk terhadap negara itu sendiri. (Lusiastuti dan Peranginangin, 2008).

Tabel 2 menunjukkan konsentrasi aflatoksin M1 pada 10 sampel susu kambing hasil pembacaan menggunakan ELISA reader.

Sampel	[Konsentrasi] (ppt)	Absorbansi (A)	Rata-rata
SK1	62.98	1.499	1.500
		1.501	
SK2	63.36	1.497	1.498
		1.499	
SK3	59.80	1.518	1.517
		1.516	
SK4	49.44*	1.575	1.575
		1.575	
SK5	65.83	1.483	1.485
		1.488	
SK6	-	1.901	1.901
		1.902	
SK7	14.54	1.855	1.854
		1.853	
SK8	15.59*	1.843	1.842
		1.841	
SK9	16.95*	1.828	1.827
		1.827	
SK10	15.59*	1.843	1.842
		1.842	

Batas maksimum kandungan mikotoksin adalah konsentrasi maksimum mikotoksin yang diizinkan terdapat dalam pangan (BSN, 2009). Batas maksimum kandungan AFM1 dalam susu dan produk olahannya di Indonesia ditetapkan dalam SNI 7385-2009 tentang batas maksimum kandungan mikotoksin dalam pangan (Nurhayati, 2014).

Tabel 3 Batas maksimum aflatoksin M1 pada susu dan produk olahannya.

Pangan	Batas maksimum AFM1 (ppt)
Susu dan minuman berbasis susu	500
Susu fermentasi dan produk susu hasil hidrolisa enzim renin (plain)	500
Susu kental dan analognya	500
Krim (plain) dan sejenisnya	500
Susu bubuk dan krim bubuk dan bubuk analog	500
Keju dan keju analog	500

Batas maksimum kandungan AFM1 dalam susu berbeda di beberapa Negara dengan kisaran 10 sampai 500 ppt. Batas maksimum Aflatoksin M1 di beberapa negara menurut *Food and Agriculture Organization* (Nurhayati, 2014).

BMR aflatoksin M1 di Indonesia lebih tinggi atau lebih longgar dibanding Uni Eropa, di Indonesia BMR aflatoksin M1 sendiri berkisar 500 ppt sedangkan Uni Eropa berkisar 50 ppt, ada keuntungan sendiri bagi Uni Eropa ketika mengeksport susu kepada Indonesia karena BMR mereka lebih kecil dibanding Indonesia. BMR yang berbeda ini dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti lingkungan dan letak geografis.

Tabel 4 Batas Maksimum Residu Aflatoksin M1 di beberapa Negara

Negara	Produk Pangan	AFM1
Uni Eropa	Susu segar, susu pasteurisasi dan produk olahannya	50
Amerika	Susu	500
China	Susu dan produk olahannya	500
Jerman	Susu	50
	Makanan bayi	10
Turki	Susu dan makanan bayi	50
	Susu bubuk	500
Iran	Susu segar, susu pasteurisasi	50
	Susu bubuk	500
	Susu bayi	10
Afrika Selatan	Susu	50
Argentina, Brazil, Paraguay, Uruguay	Susu cair	500

Seperti yang kita ketahui bahwa susu yang mengandung aflatoksin M1 sangatlah berbahaya maka akan lebih baik jika dilakukan upaya pengendalian untuk meminimalisasi kandungan AFM1 dalam susu dan dapat dilakukan dengan cara langsung. Upaya pencegahan dilakukan dengan pemberian pakan yang bebas atau sedikit mengandung AFB1. Pengendalian kontaminasi aflatoksin pada pakan dapat dilakukan mulai dari ladang pertanian, pabrik pakan, dan hingga di gudang penyimpanan pakan. Kondisi yang tetap kering akan membuat kapang penghasil AFB1 akan sulit untuk tumbuh. Pengendalian secara langsung dapat dilakukan dengan menggunakan absorben, bahan kimia, atau dengan memanfaatkan metode biologik (Widiastuti, 2014). Contoh metode langsung yang dapat dilakukan adalah dengan metode biologik yaitu memanfaatkan kapang non toksigenik *Rhizopus sp.* Kapang *Rhizopus sp.* berperan dengan mengubah AFB1 pada pakan ternak menjadi senyawa yang kurang toksik sehingga kontaminasi pada pakan ternak dapat berkurang (Endarwati dan Kusumaningtyas, 2017).

KESIMPULAN

Analisis kandungan aflatoksin M1 dapat dilakukan dengan menggunakan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Berdasarkan hasil pengujian, semua sampel yang di ujikan memiliki kandungan aflatoksin M1 kurang dari 500 ppt. Kandungan aflatoksin M1 yang kurang dari Batas Maksimum Residu (BMR) tersebut, mengindikasikan bahwa semua sampel susu kambing aman untuk dikonsumsi oleh masyarakat.

Pengukuran kadar aflatoksin M1 dengan metode ELISA memiliki keterbatasan yaitu jika konsentrasi aflatoksin dalam sampel terlalu tinggi melebihi limit deteksi maka kadar aflatoksin M1 dalam sampel tidak dapat terukur. Hal itu karena jumlah anti-aflatoksin antibodi yang terdapat dalam *microwell* jumlahnya terbatas sehingga akan terjadi kejenuhan dalam penangkapan antigen dari sampel oleh anti aflatoksin antibodi. Pengukuran aflatoksin M1 di luar dari kisaran deret konsentrasi standar dapat dilanjutkan secara *high performance liquid chromatography* (HPLC).

DAFTAR PUSTAKA

- Andini ST , Santosa B dan Anggraini H. 2016. Titer Anti-HBS Dengan Variasi Waktu Pembacaan Absorbansi Pada ELISA Reader.[Skripsi]. Semarang(ID): Universitas Muhammadiyah Semarang.
- [BPOM] Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2009. HK 00.06.1.52.4011. Jenis dan Batas Maksimum Kandungan Mikotoksin dalam Makanan. Jakarta (ID): BPOM. [Internet]. [Diunduh 28 Juli 2019]. Tersedia pada: <http://codexindonesia.bsn.go.id/uploads/download/Regulasi%20Pangan%20BPOM%20No%20HK.00.06.1.52.4011.pdf>
- [EC] Commission of the European Communities 2010. RegulationNo 165/2010 of 26 February 2010 amending regulation (EC) no 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxin: *Official Journal of the European Union*.
- Endarwati D, Kusumaningtyas E. 2017. Beberapa fungsi *Rhizopus sp* dalam meningkatkan nilai nutrisi bahan pakan. *Wartazoa*. 27(2): 81-88.
- Haryo R. 2009. Deteksi dan Uji Toksisitas LC50 Senyawa Aflatoxin B1, B2, G1, G2 Pada Kacang Tanah (*Arachis hypogea* L) [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Herniawati CN. 2017. Titer HBsAg dengan perbedaan waktu pembacaan absorbansi pada ELISA reader.[Skripsi]. Semarang (ID): Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Iromo H, Farizah N. 2014. Analisis Kandungan Hormon Tiroksin Dengan Metode *Elisa* Pada Induk Betina Kepting Bakau (*Acylla Serrata*).*Jurnal Harpodon Borneo*.7(1) : 1-8.
- Iqbal M , Lestari LA, Kurdanti W. 2010. Pengaruh Variasi Suhu Dan Lama Penyimpanan Terhadap Kualitas Gizi Pada Air Susu Ibu (ASI). *Jurnal Gizi Kita*. 11(2) : 50-55.

- Lusiastuti AM, Peranginangin R. 2008. Perbandingan kemampuan diagnose ELISA dan HPLC untuk deteksi toksin Diarrhetic shellfish poisoning pada kekerangan. *Media Akuakultur*. 3(1): 45-48.
- Martindah E dan S Bahri. 2016. Kontaminasi Mikotoksin Pada Rantai Makanan. *Jurnal Wartazoa*. 26 (3) : 115-124.
- Navyanti F, Adriyani R. 2015. Higiene Sanitasi, Kualitas Fisik dan Bakteriologi Susu Sapi Segar Perusahaan Susu X Di Suabaya. *Jurnal Departemen Kesehatan Lingkungan Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Airlangga*. Vol 8:1.
- Nurhayati D. 2014. Deteksi Aflatoksin Ml Pada Susu Pasteurisasi.[Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Prasetyo A, Astuti W, Saleh C. 2017. Isolasi dan karakterisasi lipase dari rebung bamboo betung *Dendrocalamus asper*. *Jurnal Kimia Mulawarman*. 15(1): 6668.
- Putri EV, Prasmatiwi FE, Adawiyah R. 2015. Permintaan dan kepuasan konsumen rumah tangga dalam mengonsumsi susu bubuk di Bandar Lampung. *JIIA*. 3(4): 402-408.
- Ratya N, Taufik E dan arief I. 2017. Karakteristik Kimia , Fisik Dan Mikrobiologis Susu Kambing Peranakan Etawa Di Bogor. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan*. 5(1) : 1-4.
- Rightslink. 2016. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British Journal of Hospital Medicine*. 77(7): 98-101.
- Riyanto J , Sunarto B.S ,Hertanto M, Cahyadi , Hidayah R dan Sejati W. 2016. Produksi Dan Kualitas Susu Sapi Perah Penderita Mastitis Yang Mendapat Pengobatan Antibiotik. *Jurnal Sains Peternakan*. 14 (2) : 30-41.
- Safika, Jamin F dan Aisyah S. 2015. Deteksi Aflatoksin B1 Pada Jenis Makanan Olahan Jagung Menggunakan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). *Jurnal Medika Veterinaria*. 9 (1) : 23-25.
- Sahputra D , Ferasyi RT, Ismail,Razali, Sulasmi dan Darmawi. 2016. *Isolasi* Bakteri *Coccus* Gram Positif Di Dalam Susu *Ultra High Temperature* (UHT) 6 dan 3 Bulan Menjelang Kedaluwarsa. *Jurnal Medika Veterinaria*. 10 (1) : 48-50.
- Sumantri I, Agus A, Irawan B, Habibah, Faizah N dan Wulandari KJ. 2017. Cemaran Aflatoksin Dalam Pakan Dan Produk Itik Alabio (*Anas platyrinchos borneo*) Di Kalimantan Selatan. *Buletin Peternakan*. 41(2) : 163-168.
- Sumiati T , Sukenda , Nuryati S dan Lusiastuti AM. 2015. Perkembangan Metode Elisa Untuk Mendeteksi Respon Imun Spesifik Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Yang Divaksinasi Terhadap *Aeromonas Hydrophila* Dan *Streptococcus Agalactiae*. *Jurnal Riset Akuakultur*. 10(2) : 243-250.
- Sunarlim R. 2009. Potensi *Lactobacillus*, *SP* Asal Dari Dadih Sebagai Starter Pada Pembuatan Susu Fermentasi Khas Indonesia. *Jurnal Buletin Teknologi Pascapanen Pertanian*. Vol 5:2.
- Usmiati S, Nurdiannah N. 2014. Perbandingan kualitas susu sapi peternak anggota KUD Sarwamukti dan KSU Tandangsati: studi kasus. *JITV*. 19(2): 279283.
- Wantini S, Sari NM. 2017. Gambaran jamur *Aspergillus flavus* pada kecap manis hasil

industry. *Jurnal Analisis Kesehatan*. 6(1) : 585-589.

Widiastuti R. 2014. Residu aflatoksin dan metabolitnya pada berbagai produk pangan asal hewan dan pencegahannya. *Wartazoa*. 24(4): 179-190.

Yenny.2006.Aflatoksin Dan Aflatoksikosis Pada Manusia. *Jurnal Universa Medicina*. 25(1) : 41-52.

Zakaria Y, Helmy , MY dan Safara Y.2011. Analisa Kualitas Susu Kambing Peranakan Etawah Yang Disterilkan Pada Suhu Dan Waktu Yang Berbeda. *Jurnal Agrivet*. 11(1) : 29-31

VALIDASI METODE PENETAPAN RESIDU HORMON TRENBOLON ASETAT SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI PADA DAGING SAPI

Dwi Herlambang¹, Woro Dyah Pinilih^{2*}

¹ Program Keahlian Supervisor Jaminan Mutu Pangan, Institut Pertanian Bogor

² Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

*Email korespondensi: worodyahpinilih@gmail.com

ABSTRAK

Trenbolone acetat (TBA) adalah hormon penggerak pertumbuhan (*Growth Hormone Promotor*) yang diimplantasikan pada ternak untuk mempercepat peningkatan berat badan. Konsentrasi residu trenbolon tertinggi ditemukan pada otot, tetapi residu hormone tersebut dapat ditemukan pada hati, ginjal dan lemak. Menurut *Codex Alimentarius*, hormone TBA memiliki *Maximal residue limits* (MRL), yaitu 2 µg/kg pada otot dan 10 µg/kg pada hati. Keputusan badan Karantina Pertanian Nomor 513.a/Kpts/Ot.210/L/12/2008 menyatakan bahwa residu hormon pada pangan segar asal hewan yang melampaui batas maksimal residu telah ditentukan tidak aman dan tidak layak dikonsumsi karena dapat merugikan, mengganggu dan membahayakan kesehatan manusia. Oleh karena itu diperlukan analisis residu hormon yang meliputi ekstraksi sampel, elusi dan injeksi kedalam KCKT. Metode pengujian dengan KCKT dan akibat yang ditimbulkan cukup kompleks sehingga diperlukan validasi secara berkala, Tujuan khusus dari Praktek kerja lapangan di BPMSPH adalah melakukan validasi terhadap metode pengujian TBA dengan KCKT. Adapun parameter validasi yang digunakan adalah akurasi, presisi, linearitas, LOD dan LOQ serta *Robustness*. Hasil validasi yang telah dilakukan menunjukkan bahwa parameter akurasi, presisi, linearitas serta LOD dan LOQ. Metode analisis hormone TBA menggunakan KCKT di BPMSPH telah memenuhi persyaratan sebagai suatu metode yang valid. Akan tetapi pada parameter *robustness*, metode tersebut tidak dapat dikatakan *robust* (tangguh) dikarenakan tidak memberikan hasil yang memenuhi kriteria (hasil t-test > 0,05). Salah satu solusi yang mungkin dilakukan untuk meningkatkan Robustness pada metode tersebut dengan cara mengurangi rasio air pada campuran fase gerak.

Kata kunci : Validasi, Hormon Trenbolone Acetat, Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

PENDAHULUAN

Menurut UU. No. 12 Tahun 2008 tentang pangan menjelaskan bahwa pangan adalah segala sesuatu yang berasal dari sumber hayati produk pertanian, perkebunan, kehutanan, perikanan, peternakan, perairan, dan air, baik yang diolah maupun tidak diolah yang diperuntukkan sebagai makanan atau minuman bagi konsumsi manusia, termasuk bahan tambahan pangan, bahan baku Pangan, dan bahan lainnya yang digunakan dalam proses penyiapan, pengolahan, dan/atau pembuatan makanan atau minuman.

Keamanan Pangan adalah kondisi dan upaya yang diperlukan untuk mencegah Pangan dari kemungkinan cemaran biologis, kimia, dan benda lain yang dapat mengganggu, merugikan, dan membahayakan kesehatan manusia serta tidak bertentangan dengan agama, keyakinan, dan

budaya masyarakat sehingga aman untuk dikonsumsi. Salah satu komoditas pangan yang menjadi sorotan mengenai keamanan pangan adalah bahan pangan hewani.

Bahan pangan hewani adalah bahan makanan yang berupa atau berasal dari hewan atau produk-produk yang diolah dengan menggunakan bahan dasar asal hewan. Pangan hewani mempunyai berbagai keunggulan dibanding pangan nabati. Pertama, pangan hewani terasa gurih atau enak karena mengandung protein dan lemak yang banyak. Kedua, pangan hewani mengandung protein yang lebih berkualitas karena mudah digunakan tubuh dan memiliki komposisi asam amino yang lengkap (Hardinsyah 2008).

Peningkatan kesejahteraan dan kesadaran masyarakat mengenai pentingnya mengonsumsi sumber protein hewani, ikut mendorong meningkatnya tingkat konsumsi daging sapi di Indonesia pada tahun 2013 mencapai 550.000 ton, sementara produksi daging lokal baru mencapai 85% atau sekitar 467.500 ton, sehingga sekitar 15% atau sekitar 82.500 ton kebutuhan daging harus dipenuhi dari impor (Anonim, 2013). Kekurangan stok daging sapi ini disebabkan tidak berimbangnya antara permintaan dan persediaan daging dalam negeri. Populasi ternak penghasil daging untuk konsumsi kemungkinan tidak mampu memenuhi seluruh kebutuhan daging sapi di Indonesia. Rendahnya produktivitas dan kesehatan ternak merupakan salah satu penyebab rendahnya populasi ternak penghasil daging.

Solusi dengan mendatangkan sapi impor memberikan konsekuensi yang mengkhawatirkan yaitu daging merupakan hasil implantasi hormon pemacu pertumbuhan (*Hormone Growth Promoters*, HGP, contoh trenbolon asetat). Trenbolon asetat (TBA, 17 β -acetoxyestra-4,9,11-triene-3-one) adalah hormon pemacu pertumbuhan yang digunakan pada sapi bakalan. TBA diimplantasikan sebagai senyawa tunggal ataupun bersamaan dengan senyawa esterogen seperti *diethylstilboesterol* (DES). Kondisi demikian apabila diikuti dengan penyembelihan tanpa memperhatikan waktu henti (*withdrawal time*) dapat menimbulkan residu baik dalam bentuk senyawa induk (TBA) ataupun metabolitnya 17 β -trenbolon. Residu TBA ataupun 17 β -trenbolon bila masuk ke dalam tubuh manusia secara terus menerus dapat menjadi zat yang bersifat karsinogenik yang dapat memicu kanker.

Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan (BPMSPH) sebagai salah satu institusi pemerintah yang bertanggung jawab terhadap mutu produk pangan hasil dari hewan yang beredar di seluruh Indonesia memiliki metode yang dapat menganalisa keberadaan residu trenbolon asetat menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Kromatografi cair kinerja tinggi sendiri adalah teknik pemisahan campuran berdasarkan perbedaan distribusi komponen tersebut diantara fase gerak dan fase diam. (Hamita, 2012) Kromatografi cair kinerja tinggi juga merupakan sistem pemisahan dengan ketepatan dan efisiensi tinggi yang dapat menganalisis cuplikan secara kualitatif dan kuantitatif, baik dalam bentuk komponen tunggal ataupun campuran (Putra, 2004).

Mengingat pentingnya analisis residu hormon trenbolon asetat, guna menjamin keamanan daging sapi yang akan dikonsumsi, maka diperlukan adanya validasi metode pengujiannya. Validasi metode sendiri adalah suatu tindakan penilaian terhadap metode analisis tertentu berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan metode analisis tersebut memenuhi persyaratan untuk digunakan. Persyaratan yang digunakan dalam validasi metode meliputi batas deteksi dan kuantitasi, presisi, akurasi, linearitas, dan ketangguhan metode. Penulisan jurnal ilmiah ini akan mengkaji seluruh parameter tersebut untuk mengetahui sejauh mana metode dapat memberikan hasil yang benar.

Tujuan dari penelitian ini adalah menguraikan gambaran validasi metode analisis residu hormon trenbolon asetat pada daging sapi secara KCKT untuk digunakan secara rutin di Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan (BPMSPH).

MATERI DAN METODE

Materi

Alat dan bahan

Alat alat yang dibutuhkan dalam validasi metode analisis hormon trenbolon asetat adalah KCKT Agilent 1000 series, kolom C18 fase terbalik, neraca analitik, evaporator, mikropipet, vortex mixer, labu kocok, pipet volumetrik, labu kocok, labu evaporator, labu ukur, corong gelas, dan gelas piala.

Bahan bahan yang dibutuhkan dalam validasi metode ini adalah daging sapi, dan standar trenbolon asetat. Selain itu, validasi metode ini juga dibutuhkan bahan penunjang seperti filter PTFE (0,45 μm , 47 mm), Mini kolom cartridge C18, disposable syringe 1cc, 10cc, kertas timbang, kertas saring dan botol (vial).

Metode

Ekstraksi sampel. Sampel daging sapi yang telah dipisahkan dari lemaknya sekitar \pm 200 gram pertama-tama dihaluskan dengan menggunakan blender daging. Daging sapi yang telah halus selanjutnya ditimbang dengan bobot 10 gram. Sampel diberi nomor yaitu 1, 2, 3, 4, 5, 6, dan 7. Setelah itu kedalam masing masing sampel ditambahkan spike standar hormone trenbolon asetat 1 ppm sebanyak 10 μL , kemudian ditambahkan 30 mL asetonitrile. Sampel dihomogenkan selama 5 menit dengan menggunakan *homogenizer* pada kecepatan < 4000 rpm kemudian disaring menggunakan kertas saring dan ditampung dalam lapu pisah, kemudian sampel diekstrak sekali lagi dengan menggunakan asetonitril. Filtrat asetonitril yang ditambahkan dengan 50 mL n-heksan yang telah dijenuhkan dengan asetonitril dan dikocok selama 5 menit di dalam ruang asam.

Lapisan asetonitril yang merupakan lapisan bagian bawah pada corong pisah ditampung dalam labu evaporator dan dievaporasi pada suhu 40°C. Residu yang mengering pada dinding labu evaporator dilarutkan dengan menggunakan 10 mL air bebas ion dan dimasukkan kedalam sonikator, untuk dilakukan proses sonikasi selama 10 menit.

Pemurnian sampel. Pemurnian sampel dilakukan dengan cara melewatkan sampel ke dalam kolom C18 (bond elut). Sebelum dilewatkan, pertama tama kolom C18 diaktivasi dengan cara melewatkan air bebas ion sebanyak 10 mL, kemudian dilanjutkan dengan 10 mL methanol LC. Kolom C18 yang telah teraktivasi dilewati sampel untuk selanjutnya dicuci dengan menggunakan 20 mL methanol 40% untuk selanjutnya dielusi dengan menggunakan 10 mL methanol 80%. Setelah itu, filtrat dipindahkan ke dalam labu evaporator untuk dilakukan evaporasi pada suhu 40°C. Proses evaporasi bertujuan untuk menguapkan methanol tanpa mengurangi jumlah residu hormon trenbolon pada labu evaporator.

Labu evaporator yang telah mengering, selanjutnya dilarutkan dengan fase gerak yang terdiri dari campuran acetonitrile, air dan methanol (5:4:1 v/v) sebanyak 1 mL. Setelah itu, labu evaporator dilakukan proses sonikasi menggunakan sonikator selama \pm 2 menit untuk selanjutnya diratakan menggunakan vortex dan dimasukkan ke dalam vial menggunakan syringe.

Pembuatan larutan stok standar. Pembuatan larutan stok standar dilakukan dengan cara standar hormon trenbolon asetat (TBA) ditimbang sebanyak 4,9 mg dan dilarutkan pada air 4,802 mL sehingga diperoleh larutan stok standar hormon TBA dengan konsentrasi 1000 ppm.

Pembuatan larutan standar kerja. Berdasarkan larutan stok standar 1000 ppm yang didapat, dibuat larutan standar kerja konsentrasi 100 ppm sebanyak 1 mL dengan cara menambahkan 900 μ L air ke dalam 100 μ L larutan stok standar 1000 ppm.

Pembuatan larutan kurva standar. Pembuatan larutan kurva standar dilakukan dengan cara larutan standar kerja 100 ppm diencerkan menjadi 10 ppm, 1 ppm, 0,5 ppm, 0,25 ppm, 0,125 ppm, 0,0625 ppm, 0,03125 ppm, dan 0,015625 ppm sebanyak 1 mL pada vial KCKT.

Pembuatan larutan fase gerak KCKT. Pembuatan larutan fase gerak KCKT dilakukan dengan cara acetonitrile, methanol dan air deionisasi dicampurkan dengan konsentrasi berturut turut 50%, 10%, dan 40%.

Analisis Dengan KCKT

Sebanyak 20 μ L sampel dan standar diinjeksikan ke dalam KCKT Aglient 1000 series. Adapun kondisi KCKT menggunakan filter kolom Bondapak C18, sistem fase terbalik, dengan fase gerak Acetonitrile : Methanol : DW = (50:10:40), kecepatan alir : 1 mL / Menit, Detektor UV 340 nM, kolom silica C-18,

Uji Linearitas

Uji linearitas dilakukan dengan cara menginjeksikan standar hormon trenbolon asetat dengan konsentrasi 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125 dan 0,013625 ppm ke dalam KCKT sebanyak 20 µL. Slinearitas ditentukan dengan menggyunakan metode regresi kuadrat terkecil. Persamaan linearitas yang digunakan adalah $y = a + bx$. Selain persamaan linearitas ditentukan juga nilai slope, intercept, correlation dan diagram perbandingan antara konsentrasi standar dengan hasil yang didapatkan. Standar dapat dikatakan lulus uji linearitas apabila didapatkan correlation sebesar $>0,995$.

Uji Presisi : Reprodusibilitas

Sebanyak 7 sampel daging yang mewakili 7 kali ulangan yang telah diberi spike standar trenbolon asetat dengan konsentrasi 1 ppm dianalisis sebanyak 20 µL ke dalam KCKT. Setelah sampel diukur, luas puncak yang diperoleh ditentukan simpangan baku (SD) dan simpangan baku relatifnya (RSD).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

Uji Akurasi

Uji akurasi kali ini, pada setiap sampel diberi *spike* standar hormon trenbolon asetat sebanyak 1 ppm. Setelah diinjeksikan ke dalam KCKT, data yang diperoleh ditentukan nilai % *Recovery*. Nilai perolehan kembali menggunakan rumus :

$$\frac{C_t - C_u}{C_s} \times 100\%$$

C_t merupakan konsentrasi trenbolon asetat setelah diberi *spike*. C_u adalah konsentrasi trenbolon asetat dalam larutan uji (sampel), dan C_s adalah konsentrasi standar trenbolon asetat Suatu metode analisis dikatakan memiliki akurasi yang baik bila memiliki % perolehan kembali (*Recovery*) berkisar antara 80 – 120% .

Batas Deteksi (LOD) dan batas Kuantitasi (LOQ)

Larutan standar hormon trenbolon asetat dengan konsentrasi terendah yaitu 0,015625 sebanyak 10µL dianalisis menggunakan KCKT sebanyak tujuh kali ulangan. Setelah dianalisis, dihitung respon simpangan standarnya menggunakan rumus :

$$Q = X + kSD$$

Q adalah batas deteksi dan batas kuantitasi dengan x adalah luas puncak rata rata konsentrasi terendah. Sedangkan SD atau standar deviasi dari luas puncak selama tujuh kali ulangan.

Ketangguhan Metode (*Robustness*)

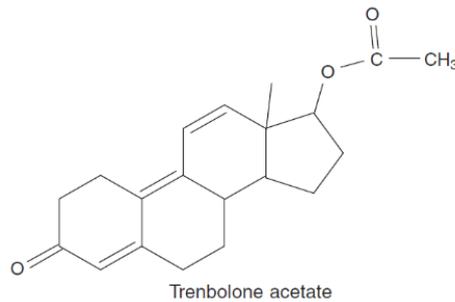
Sampel dan standar hormon trenbolon asetat yang telah dianalisis menggunakan KCKT kembali di analisis namun dengan sedikit gangguan pada metodenya. Jika seharusnya fase gerak KCKT untuk hormon trenbolon asetat menggunakan campuran acetonitrile, air dan methanol (5:4:1 v/v), untuk menguji ketangguhan metode, fase gerak diganti dengan hanya menggunakan acetonitrile dan methanol (5:1 v/v).

Setelah dianalisis, hasil luas puncak dari analisis yang menggunakan fase gerak asetonitril dan methanol (5:1 v/v) dibandingkan dengan luas puncak sampel yang menggunakan fase gerak normal. Kedua hasil tersebut dibandingkan menggunakan T Test, dan metode tersebut dikatakan memiliki ketangguhan terhadap perubahan fase gerak jika nilai T test > dari pada 0,05

HASIL DAN PEMBAHASAN

Daging adalah sumber pangan yang berperan penting bagi manusia karena kaya akan protein, vitamin, dan mineral. Oleh karena itu, dalam penanganannya, tidak hanya memperhatikan pengolahannya saja, namun juga sejak proses pemeliharaan hewan, penyembelihan, hingga penanganan pasca penyembelihan, harus dapat mencegah dari kemungkinan adanya cemaran biologis, kimia, dan lainnya yang dapat mengganggu, merugikan, bahkan membahayakan kesehatan manusia. Salah satu yang men Residu hormon TBA pada daging termasuk bahaya kimia, sehingga perlu dilakukan pengujian hormon untuk melindungi konsumen (Nazli *et al.*, 2005).

Trenbolon asetat (TBA) adalah hormon pengertak pertumbuhan yang diimplantasikan pada ternak untuk mempercepat peningkatan berat badan. Bersama dengan *Melengesterol Acetate* (MGA), dan 17β *Oestradiol*, trenbolon asetat masuk ke dalam *Growth Promotor Hormone* (GHP) sintesis golongan steroid. Penanaman (*Implant*) hormon Implantasi trenbolon asetat biasanya dengan cara dimasukan menggunakan senjata implant khusus pada bagian berdaging dari telinga dalam bentuk pellet yang biasanya mengandung lebih dari satu GHP. Berikut struktur kimia dari hormon TBA dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur kimia dari trenbolon asetat (Horie, 2000)

Proses penanaman hormon TBA pada ternak akan menimbulkan residu yaitu 17α -trenbolon dan 17β -trenbolon pada produk ternak yang dihasilkannya. Kedua metabolit tersebut terbentuk melalui proses hidrolisis TBA menjadi 17β -trenbolon disebabkan adanya asam lemak rantai panjang serta kolesterol pembawanya dan hanya terdapat di jaringan otot. Dua puluh jam setelah aplikasi, 17β -trenbolon dan produk oksidasinya akan diubah menjadi 17α -trenbolon melalui metabolisme empedu, kemudian dikonjugasikan dalam bentuk glukoronida dan sulfat yang diekskresikan melalui urin dan feses (Widiastuti *et al.*, 2007). Residu 17α -trenbolon umumnya ditemukan pada hati, sedangkan 17β -trenbolon umumnya ditemukan pada otot hewan ternak. Residu hormon tersebut dapat juga ditemukan pada ginjal dan lemak, namun konsentrasi tertinggi ditemukan pada otot (*Directorate Consumer Policy and Consumer Health Protection*, 1999).

Menurut *Codex Alimentarius*, hormon TBA memiliki *Maximal residue limits* (MRL), yaitu 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pada otot dan 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pada hati (Horie, 2000). Berdasarkan Surat Edaran Direktur Kesehatan Hewan No.329/XII-C tanggal 4 oktober 1983 dan hasil rapat Komisi Obat Hewan tanggal 12 Agustus 1998, Indonesia tidak mengizinkan penggunaan hormon termasuk hormon trenbolon sebagai penggerak pertumbuhan sapi. Kenyataannya, masih dapat ditemukan sapi impor yang mengandung hormon TBA.

Menurut Rasyid (2010), Sapi impor dari Australia yang diambil di pelabuhan Tanjung Priok yang digemukkan selama 2-5 bulan di feedlotter di Bogor dan Sukabumi terdeteksi seratus persen hormon trenbolon. Meski jumlah residu masih dibawah ambang batas aturan internasional Standar *Codex*, yakni 2 ppb untuk daging sapi dan 10 ppb untuk hati sapi. Meskipun dibawah standar *Codex* bila dikonsumsi secara terus menerus, dapat menimbulkan kanker rahim dan payudara pada perempuan serta menimbulkan kanker prostat pada laki-laki.

Oleh karena itu, pemeriksaan residu hormon pada daging impor perlu dilakukan sebagai bentuk usaha perlindungan konsumen. Adapun analisis hormon TBA dengan mengekstrak dari produk hewan (Daging atau hati) untuk selanjutnya dianalisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).

Ekstraksi sampel

Proses analisis hormon trenbolon asetat (TBA) pertama-tama diawali dengan ekstraksi sampel. Proses ekstraksi sendiri bertujuan untuk memisahkan zat yang diinginkan (hormon TBA) dari daging sapi. Proses ekstraksi diawali dengan daging sapi dihaluskan dan dihomogenkan menggunakan mixer laboratorium. Setelah sampel halus dan ditimbang 10 gram, setiap sampel ditambahkan 10 µL standar hormon TBA 1 ppm untuk mendapatkan nilai *recovery* yang merupakan salah satu parameter validasi metode. Campuran sampel dan standar yang telah tercampur dihaluskan dengan pelarut organik. Pelarut organik yang dapat digunakan dalam proses ekstraksi ini adalah larutan buffer natrium asetat dan asetonitril. Menurut Tsai (2004) larutan buffer natrium asetat dan asetonitril dapat melarutkan hormon trenbolon asetat akan tetapi, asetonitril lebih baik dalam melarutkan karena hasil perolehan kembali (*recovery*) bila dibandingkan dengan larutan buffer natrium asetat (90% : 44%). Selain menggunakan pelarut asetonitril, dalam proses ekstraksi juga digunakan larutan N- Heksana jenuh asetonitril yang berfungsi memisahkan lemak yang terbawa dalam asetonitril. Asetonitril yang telah terpisah dari lemak dalam N-Heksana selanjutnya dievaporasi secara vakum untuk memisahkan asetonitril dari residu.

Residu yang didapat tambahkan air bebas ion dan dilakukan proses sonikasi. Sonikasi sendiri bertujuan memecah ikatan, membantu kelarutan analat, serta menghilangkan gelembung dengan bantuan getaran mekanis melalui tekanan suara dengan frekuensi yang lebih besar dari pada pendengaran manusia. Setelah residu larut dalam air bebas ion, selanjutnya sampel dapat masuk ke tahap *clean up*.

Clean up sampel

Residu yang telah melalui proses ekstraksi menggunakan asetonitril dan pemisahan lemak menggunakan N-Heksana, tidak bisa langsung dianalisis menggunakan KCKT dikarenakan masih adanya matriks selain hormon TBA muncul pada hasil analisis KCKT (kromatogram). Oleh karena itu, untuk memurnikan residu dari matriks selain TBA dapat dengan cara *clean up* menggunakan kartrid Bond Elut C18 500 mg karena jenis kartrid lainnya (Bond Elut 500 mg dan Bond Elut CN 500 mg) walaupun memberikan hasil pengujian dengan *recovery* diatas 85% namun tidak efektif dalam memurnikan matriks selain TBA (Tsai, 2004).

Proses *clean up* sendiri pertama-tama mengkondisikan kolom bond elut (C18) dengan pelarut methanol dan air. Pengkondisian ini dilakukan untuk membasahi permukaan kolom dan untuk membersihkan kolom sehingga perubahan kimia yang tidak diharapkan ketika sampel dimasukan dapat dihindari. Proses selanjutnya adalah melewatkan sampel pada kolom C18 untuk selanjutnya dicuci dengan methanol 40% dan 80 %. Fungsi dari pencucian dengan methanol pada dua konsentrasi yang berbeda adalah pada methanol 40% berfungsi sebagai mengangkut zat pengotor selain hormon TBA dari kolom C18. Sedangkan methanol 80% untuk melarutkan hormon TBA pada kolom C18 sehingga saat mencuci dengan methanol 80%, hasil

buangannya ditampung untuk selanjutnya dilakukan proses evaporasi methanol. Analat yang telah dimurnikan, selanjutnya ditambahkan fase gerak dan dianalisis menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).

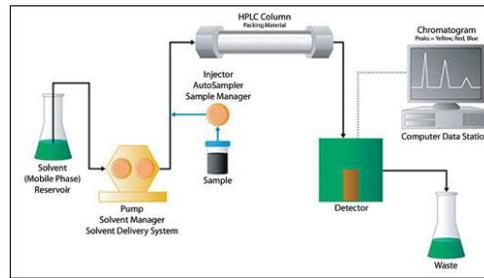
Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Validasi metode analisis hormon TBA dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). KCKT dikembangkan pada akhir tahun 1960 dan 1970. Saat ini KCKT merupakan teknik analisis yang digunakan secara luas pada berbagai bidang diantaranya bidang farmasi, lingkungan, dan industri makanan. (Putra, 2004). KCKT umum digunakan karena dapat memisahkan molekul pada suatu campuran, analisis yang cepat, kepekaan yang tinggi, dapat menghindari rusaknya sampel yang akan dianalisis, dan detektor yang dapat digunakan kembali (Putra, 2004). KCKT sendiri terdiri atas beberapa komponen penting diantaranya adalah pompa, injektor, kolom, dan detektor.

Pengoperasian KCKT untuk analisis hormon TBA pertama tama dengan menambahkan fasa gerak pada sampel yang mengandung analat. Fase gerak untuk KCKT harus memiliki kemurnian yang tinggi dan bebas dari komponen partikel padat yang dapat menyumbat kolom yang dapat mengurangi kontak analat dengan fase diam (detektor). Fase gerak yang digunakan untuk hormon TBA adalah asetonitril, methanol dan air deionisasi dengan perbandingan 50:10:40 (Tsai,2004). Setelah residu hormon larut dalam fase gerak, sebanyak 10 μ L sampel dan standar diinjeksikan dan dibawa oleh fase gerak ke dalam kolom. Kelebihan larutan yang diinjeksikan akan secara otomatis dibuang melalui saluran pembuangan.

Sistem kromatografi pada kolom yang digunakan untuk validasi metode analisis residu hormon TBA merupakan sistem kromatografi fase terbalik, yaitu fase geraknya polar maka untuk analat yang kepolarannya lebih tinggi akan terelusi terlebih dahulu, sehingga waktu retensinya pendek. Hal ini didasarkan pada prinsip “*like and dislike*”, yaitu senyawa yang sifatnya sama akan saling berinteraksi lebih kuat.

Solut memasuki detektor setelah keluar dari kolom. Detektor KCKT yang digunakan untuk analisis hormon TBA adalah UV–vis. Detektor Uv–vis (*Ultra Violet Visible*) dalam mendeteksi komponen pada sampel didasarkan pada adsorpsi sinar ultra violet. Adapun panjang gelombang yang digunakan untuk mendeteksi hormon TBA adalah 340. Setelah mendeteksi sampel, detektor mengirimkan signal pada *recorder* untuk selanjutnya dicetak hasilnya sebagai kromatogram yang berupa pita puncak yang memiliki luas area dan waktu retensi. Analisis puncak pita dilakukan dengan melihat waktu retensi sampel yang sesuai atau mendekati waktu retensi dari standar. Berikut adalah skema sederhana berikut komponen dari KCKT (Gambar 2).



Gambar 2. Skema standar KCKT

Validasi Metode Analisis

Menurut ISO 17025 : 2005 Validasi metode adalah proses pembuktian bahwa metode tersebut sesuai untuk maksud/tujuan tertentu.. Validasi metode menurut JECFA (2006), direkomendasikan untuk memastikan bahwa suatu metode dapat menghasilkan data yang akurat dan dapat dipercaya. Beberapa manfaat validasi metode analisis yaitu untuk mengevaluasi kemampuan kerja suatu metode analisis, menjamin prosedur analisis, menjamin keakuratan dan keterulangan hasil prosedur analisis, dan mengurangi resiko penyimpangan yang mungkin timbul. Parameter uji yang dilakukan pada validasi metode ini adalah linearitas, limit deteksi, limit kuantitasi, presisi, akurasi dan ketangguhan metode.

Akurasi

Akurasi merupakan kedekatan antara nilai hasil uji suatu metode analisis dengan nilai sebenarnya. Akurasi sering dinyatakan sebagai persentase perolehan kembali. Uji akurasi dilakukan untuk mengetahui adanya gangguan matriks di dalam contoh uji terhadap pereaksi yang digunakan atau untuk mengetahui ketepatan metode yang digunakan. Secara umum dikenal tiga cara yang digunakan untuk evaluasi akurasi metode uji, yaitu:

1. Uji perolehan kembali (*Recovery Test*). Uji dilakukan dengan mengerjakan pengujian di atas contoh yang diperkaya dengan jumlah kuantitatif analat yang akan ditetapkan.
2. Uji Relatif terhadap akurasi metode baku. Uji dilakukan dengan mengerjakan pengujian paralel atas contoh uji yang sama menggunakan metode uji yang sedang dievaluasi dan metode uji lain yang telah diakui sebagai metode baku
3. Uji terhadap *Standard Reference Material* (SRM). Uji terhadap SRM untuk mengevaluasi akurasi suatu metode uji dilakukan dengan menguji SRM dengan menggunakan metode uji yang sedang dievaluasi.

Pengujian akurasi metode yang dilakukan di BPMSPH menggunakan uji perolehan kembali atau *Recovery test*. Pengujian yang dilakukan dengan menambahkan 10 µL standar hormon TBA 1 ppm pada sampel sebelum dilakukan pengujian. Setelah mengalami tahapan ekstraksi dan analisis menggunakan KCKT didapatkan nilai *recovery* pengujian sebesar 86,89 %. Hasil *recovery* yang telah didapatkan selanjutnya dibandingkan dengan rentang *recovery*

yang dapat diterima. Rentang nilai penerimaan kecermatan suatu metode akan bervariasi sesuai kebutuhannya. Adapun AOAC menetapkannya seperti dalam tabel berikut :

Tabel 1 Rentang recovery berdasarkan jumlah analat dalam sampel

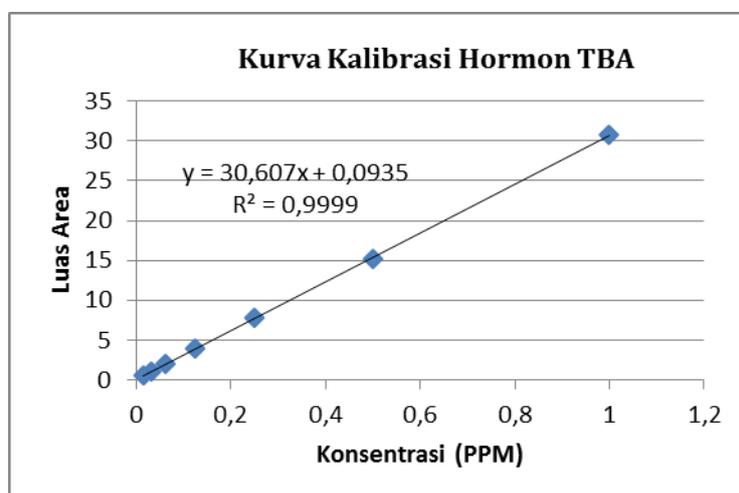
% Analat	Unit	Rata Rata Recovery (%)
100	100%	98 – 102
10	10%	95 – 102
1	1%	97 – 103
0,1	0,10%	95 – 105
0,01	100 ppm	90 – 107
0,001	10 ppm	80 – 110
0,0001	1 ppm	80 – 110
0,00001	100 ppb	80 – 110
0,000001	10 ppb	60 – 115
0,0000001	1 ppb	40 – 120

(Sumber : AOAC 2002)

Berdasarkan tabel di atas dapat dilihat pada uji akurasi dengan penambahan *spike* 1 ppm maka nilai perolehan kembali (*recovery*) adalah dalam kisaran 80 – 110 %, sehingga dapat dikatakan bahwa metode yang digunakan untuk analisis residu hormon TBA memiliki nilai akurasi yang baik karena masih memenuhi syarat keberterimaan dari uji akurasi.

Linearitas

Linearitas adalah kemampuan metode analisis untuk memperoleh hasil percobaan yang berbanding lurus dengan konsentrasi analat di dalam sampel. Parameter ini merupakan ukuran seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon (y) dengan konsentrasi (x). Linearitas dapat diukur dengan melakukan pengukuran tunggal pada konsentrasi yang berbeda dan selanjutnya ditentukan nilai kemiringan (Slope) dan intersep serta koefisien korelasi (Septyanita, 2010). Berikut adalah kurva standar untuk validasi metode hormon TBA beserta persamaan regresi dan koefisien korelasinya (gambar 3):



Gambar 3. Kurva kalibrasi hormon TBA

Uji linearitas pada penetapan residu hormon TBA dilakukan dengan menggunakan deret standar pada rentang konsentrasi 1,0 – 0,015625 ppm. Berdasarkan uji linearitas menunjukkan bahwa adanya hubungan yang berbanding lurus antara konsentrasi standar dengan luas puncak. Semakin besar konsentrasi suatu standar, maka semakin besar pula luas puncak yang dihasilkan. Persamaan linear yang diperoleh dari pengujian tersebut adalah $y = 30,607x + 0,0935$ dengan koefisien korelasi 0,999966645. Menurut Association of Official Analytical Chemist (AOAC) (2005) menyatakan bahwa suatu metode dapat dikatakan linear apabila menghasilkan nilai koefisien korelasi $> 0,9900$. Hal ini menunjukkan bahwa metode analisis residu hormon TBA menggunakan KCKT memberikan hasil yang linear karena memenuhi syarat keberterimaan koefisien korelasi (r) (Tabel 2).

Tabel 2. Parameter dan nilai untuk pengujian linearitas metode analisis hormon TBA

Parameter	Nilai
Linearitas (rentang (ppm))	1,0 – 0,015625
Regresi (R^2)	0,9999
Koefisien korelasi (r)	0,999966645
Kemiringan (b)	30,607
Intersep (a)	0,0935

Presisi

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*).

Tabel 3 Hasil uji presisi beserta hasil perhitungannya

Sampel	[Kadar] ppb
1	87.09403078
2	83.95056686
3	84.17443722
4	82.64357827
5	83.46309668
6	86.03244356
7	84.36194335
Total	591.7200967
Mean	84.53144239
SD	1.528553579

RSD	1.808266292
CV Horwitz	5.49730247
Recovery	86.89447471

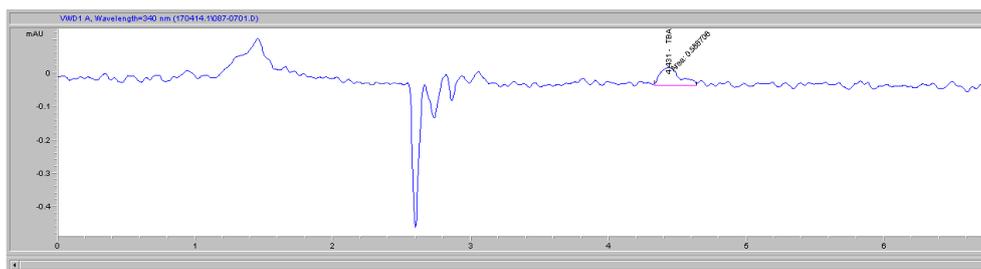
Keterulangan adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Keterulangan dinilai melalui pelaksanaan penetapan terpisah lengkap terhadap sampel-sampel identik yang terpisah dari *batch* yang sama, jadi memberikan ukuran keseksamaan pada kondisi yang normal. Ketertiruan adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Biasanya analisis dilakukan dalam laboratorium-laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut, dan analis yang berbeda pula. Analisis dilakukan terhadap sampel-sampel yang diduga identik yang dicuplik dari *batch* yang sama. Ketertiruan dapat juga dilakukan dalam laboratorium yang sama dengan menggunakan peralatan, pereaksi, dan analis yang berbeda.

Uji presisi yang dilakukan dalam validasi kali ini, menggunakan metode keterulangan (*repeatability*). Pengujian dilakukan dengan menggunakan ulangan 7 sampel oleh analis yang sama dan pada kondisi yang sama. Pengujian juga diukur sebagai simpangan baku relatif (%RSD). Berikut adalah hasil dari pengujian presisi :

Berdasarkan hasil uji presisi menurut Harmita (2004) suatu metode pengujian dikatakan memiliki keseksamaan yang baik jika nilai CV (%RSD) lebih kecil dari nilai CV Horwitz. Berdasarkan data diperoleh %RSD untuk uji presisi hormon TBA adalah 1,808%. Nilai tersebut memenuhi persyaratan $\%RSD < CV \text{ Horwitz}$ ($CV \text{ Horwitz} = 5,4973$)(Tabel 3). Hal ini dapat menginformasikan bahwa sistem pengujian, alat dan analis memiliki nilai presisi yang baik terhadap metode dengan respon yang relatif konstan, sehingga hasil pengukuran memiliki nilai presisi yang memenuhi persyaratan dan dapat dikatakan valid. Berdasarkan APVMA (2004) presisi dikatakan baik bila memiliki $\% RSD < 10\%$, sehingga presisi untuk analisis hormon TBA tergolong baik.

LOD dan LOQ

Batas deteksi (LOD) merupakan jumlah terkecil dari analat yang terkandung dalam sampel yang masih dapat dideteksi, namun tidak memerlukan angka kuantitatif yang tepat. Batas kuantitasi (LOQ) adalah jumlah terkecil analat yang terkandung dalam sampel yang dapat dikuantitasi secara presisi dan akurat. Sebelum dilakukan uji batas deteksi dan kuantitasi dilakukan injeksi standar yang telah dibuat (1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125, 0,015625 ppm). Setelah dianalisis, standar dengan konsentrasi terkecil (0,015625 ppm) dilihat apakah masih dapat memberikan perbedaan antara *peak* dengan *noise*. Berikut adalah hasil kromatogram untuk standar TBA 0,015625 ppm :



Gambar 6. Kromatogram standar TBA 0,015625 ppm

Berdasarkan gambar diatas dapat dilihat walaupun terdapat noise, KCKT masih dapat membedakan peak standr dari hormone TBA. Oleh karena itu, untuk menguji batas deteksi dan batas kuantitasi menggunakan standar hormon TBA konsentrasi 0,015625 ppm yang diinjeksikan sebanyak tujuh kali ulangan. Berikut adalah hasil untuk batas deteksi dan batas kuantitasi (Tabel 4).

Tabel 4. Hasil uji presisi beserta hasil perhitungannya

Ulangan	Area Terkecil yang bisa terdeteksi
1	0.485563
2	0.499779
3	0.485901
4	0.492766
5	0.496347
6	0.476528
7	0.518518
Total	3.455402
Mean	0.493628857
SD	0.013432818

Berdasarkan tabel 5 nilai batas deteksi menunjukkan bahwa pada konsentrasi 0,016224557 ppm hormon TBA masih dapat membuat bias dalam perhitungan. Selanjutnya pada nilai batas kuantitasi, menunjukkan bahwa pada konsentrasi 0,019081858 ppm sinyal yang didapatkan dapat dibedakan dengan *noise*. Hal ini berarti pada kadar hormon TBA yang relatif kecil, metode analisis ini dapat memberikan ketelitian dan ketepatan yang baik.

Tabel 5. Nilai batas deteksi dan batas kuantitasi metode

Analat	Nilai batas deteksi	Nilai batas kuantitasi
Hormon TBA	0,016224557 ppm	0,019081858 ppm

Robustness

Robustness atau ketangguhan adalah kemampuan suatu metode analisis untuk tidak terpengaruh oleh perubahan / variasi kecil parameter metode. Pengujian *robustness* dilakukan dengan cara membandingkan hasil pada kondisi normal dengan kondisi yang telah dimodifikasi. Modifikasi yang dapat dilakukan dalam pengujian *robustness* meliputi : stabilitas larutan analat, variasi Ph dalam fase gerak, perbedaan kolom (lot/supplier), 93ormone93ure, laju alir.

Pengujian *robustness* yang dilakukan kali ini adalah dengan mengganti fase gerak yang terdiri dari campuran antara campuran acetonitrile, air dan methanol (5:4:1 v/v), dengan hanya menggunakan acetonitrile dan methanol (5:1 v/v). Pengujian dilakukan dengan menggunakan sampel yang sama dan di analisis menggunakan KCKT dengan spesifikasi yang sama. Hasil dari analisis dibandingkan antara sampel yang diuji dengan fase gerak normal dengan yang mengalami modifikasi. Berikut adalah hasil injeksi kedua sampel dan perbandingannya :

Tabel 6. Hasil perbandingan analisis TBA dengan fase gerak normal dengan yang telah mengalami perlakuan

Sampel	Fase Gerak Berubah [sampel] mg/g	Fase Gerak Normal [sampel] mg/g
1	9.60193E-05	8.7094E-05
2	9.77832E-05	8.39506E-05
3	9.58583E-05	8.41744E-05
4	9.55978E-05	8.26436E-05
5	9.66221E-05	8.34631E-05
6	9.51755E-05	8.60324E-05
7	9.74251E-05	8.43619E-05
T. Test	4.45514247873233E-06	

Menurut Guiard (2004) untuk menguji *robustness* suatu metode antara metode normal dengan yang telah mengalami perubahan dapat menggunakan t-test. Untuk mendapatkan kesimpulan dari data tersebut maka hasil dari t-test tersebut dibandingkan dengan 0,5. Apabila hasil t-test lebih besar dari 0,5 maka metode masih dapat mempertahankan hasil dari perlakuan yang diberikan. Selanjutnya, apabila nilai t-test lebih kecil dari 0,5 maka metode analisis tidak dapat mempertahankan hasil dari perlakuan yang diberikan.

Berdasarkan data perbandingan pada Tabel 6 dihasilkan nilai dari t-test adalah sebesar $4.45514247873233 \times 10^{-6}$. Apabila ditarik kesimpulan pada pengujian *robustness* ini, maka dapat dikatakan metode analisis 93ormone TBA tidak dapat mempertahankan hasil yang baik dari perlakuan yang diberikan. Hal ini dapat dilihat dari nilai t-test yang lebih kecil dibandingkan 0,5.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil validasi yang dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa metode analisis hormon TBA dengan KCKT tidak memenuhi persyaratan sebagai suatu metode yang valid. Hal ini dikarenakan walaupun berdasarkan parameter akurasi, presisi, linearitas, LOD dan LOQ memenuhi persyaratan, namun parameter ketangguhan metode (*robustness*) tidak menunjukkan hasil yang memenuhi kriteria (hasil t-test > 0,5).

DAFTAR PUSTAKA

- [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. 2002. AOAC International Methods Committee Guidelines For Validation Of Qualitative And Quantitative Food Chemical Official Methods Of Analysis. Washington :AOAC Int.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. 2005. Chlortetracycline, Oxytetracycline, and tetracycline in edible animal tissues. Washington :AOAC Int.
- [APVMA] Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. 2004. Guidelines For The Validation of Analytical Methods for Active Constituent, Agricultural And Veterinary Chemical Product. Australia .
- [Barantan] Badan Karantina Pertanian. 2008. Keputusan Kepala Badan Karantina Pertanian nomor 513.a/Kpts/OT.210/L/12/2008. Manual pengujian residu hormon pada pangan segar asal hewan. Jakarta (ID): Departemen Pertanian.
- [BSN] Badan Standarisasi Nasional. 2008. Persyaratan Umum Kompetensi Laboratorium Pengujian dan Laboratorium Kalibrasi. Dalam Standar Nasional Indonesia No. 01:17025:2008.
- Directorate Consumer Policy and Consumer Health Protection. 1999. Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health assessment of potential risks to human health from hormone residues in bovine meat and meat products. Eropa (EU): European Commission.
- Gandapurnama, B. 2013. Kuota Impor Sapi Ditambah, Feedloter dan Pedagang Bergairah. www.finance.detik.com. [17 April 2014]
- Guiard V, Rasch D. 2004. The Robustness of Two Sample Test For Means A Reply On Von Eye's Comment.
- Harmita. 2012. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. Di dalam : Majalah Ilmu Kefarmasian. Depok. Departemen Farmasi FMIPA-UI
- Horie M, Hiroyuki N. 2000. Determination of trenbolone and zeranol in bovine muscle and liver by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chrom A*. 882:53–62.
- Ilham. 2001. Analisis Penawaran Dan Permintaan Daging Sapi di Indonesia. Didalam : Seminar Nasional Teknologi Peternakan Dan Veteriner. Pusat Penelitian dan Pengembangan Sosial ekonomi Pertanian.

- Iriani, N. 2006. Validasi Metode Analisis Protein Dengan Auto Analyzer. Bogor (ID) : Balai Penelitian Ternak.
- [JECFA] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 1998. Consideration of maximum residue limits (MRL) for veterinary drugs. Thirty-second Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Codex Committee on Residues of veterinary Drugs in Foods. WHO Technical Report Series 763. Geneva(CH): World Health Organization.
- [JECFA] joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 2006. Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jcc_2181.htm[20 April 2014]
- Kantasubrata, J. 2005. Validasi Metode. Bandung (ID) : Pusat Penelitian Kimia –LIPI.
- L Edward, Johnson, Stevenson R. 1991. Dasar Kromatografi Cair. Bandung (ID): Institut Teknologi Bandung.
- Putra, E D L. 2004. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Dalam Bidang Farmasi. Medan (ID) : Fakultas Ilmu Pengetahuan alam universitas Sumatra Utara.
- R Widiastuti, TB Indraningsih, Murdiati, Firmansyah R. 2001. Residu Trenbolon Pada Domba Garut Yang Diimplantasi Dengan Trenbolon Asetat. Di dalam : Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner Vol. 6 No. 3 Tahun 2001. Bogor : Balai Penelitian Veteriner.
- R Widiastuti, Firmansyah R, Indraningsih. 2007. Residu Trenbolon Pada Jaringan Dan Urine Dari Sapi Jantan muda Peranakan Onggole yang Diimplantasi Trenbolon Asetat. Bogor (ID) : Balai Besar Penelitian Veteriner.
- [RI] Republik Indonesia. 2009. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 18 Tahun 2009 tentang Peternakan dan Kesehatan Hewan. Lembaran Negara RI Tahun 2009, No. 84. Jakarta (ID): Sekretariat Negara.
- Setiawan, A. 2012. Perbandingan Koefisien Variasi Antara 2 Sampel Dengan Metode Bootstrap. Di dalam : Studi kasus Pada Analisis Inflasi Bulanan komoditas Beras, Cabe Merah Dan Bawang Putih Di Kota Semarang. Semarang : Universitas Kristen Satya Wacana.
- Tsai F C, Chang M H, Pan J Q, Chou S S. 2004. A Method For The Determination Of Trenbolone In Bovine Muscle and Liver. Di dalam : Journal Of food and Drug Analysis Vol. 12 No.4, 2004. Taipei (CN) : Bureau Of Food And Drug Analysis, Department Of Health.

**PENENTUAN LOGAM BERAT ARSEN (AS), TIMBAL (PB) DAN CADMIUM (CD)
PADA SUSU BUBUK MENGGUNAKAN
INDUCTIVELY COUPLED PLASMA-MASS SPECTROMETRY (ICP-MS)**

Dini Tri Mardiani^{1*}, Elok Kania¹, Atzhar Rezha Siregar¹, Fitri Amalia¹

¹Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

*Email korespondensi : dinimardiani@pertanian.go.id

ABSTRAK

Susu merupakan bahan pangan yang sangat penting dan banyak dikonsumsi oleh manusia. Susu adalah bahan makanan yang seimbang dan bernilai gizi tinggi, karena mengandung hampir semua zat-zat makanan seperti karbohidrat, protein, mineral, dan vitamin. Di antara berbagai susu, susu sapi merupakan produk yang paling banyak dikonsumsi. Susu bubuk merupakan salah satu jenis produk susu yang diperoleh dengan menghilangkan sebagian besar air dari susu dengan cara pengeringan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan kandungan logam berat As, Cd dan Pb dalam susu bubuk. Penentuan logam berat pada susu bubuk dilakukan dengan ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry*). Hasil yang diperoleh menunjukkan residu logam berat As dan Pb tidak terdeteksi dalam sampel. Sedangkan konsentrasi tertinggi residu logam Cd di dalam sampel yaitu 0,0053 mg/kg.

Kata kunci: ICP-MS, logam berat, susu bubuk

PENDAHULUAN

Susu dapat didefinisikan sebagai sekresi normal dari kelenjar susu mamalia. Susu dan produk susu tidak hanya dikonsumsi untuk anak-anak, tetapi juga untuk dewasa. Di antara berbagai sumber susu, susu sapi merupakan produk yang paling banyak dikonsumsi (Eckles, 1980). Susu mengandung protein, lemak, laktosa, mineral dan vitamin (Jensen, 1995). Susu dianggap sebagai makanan dengan nutrisi yang hampir lengkap (Iman *et al.*, 2017). Salah satu jenis produk susu yang banyak dikonsumsi adalah susu kering atau susu bubuk. Susu bubuk adalah produk susu berwarna putih kekuningan, bau dan rasa khas susu. Produk ini diperoleh dengan menghilangkan sebagian besar air dari susu dengan cara pengeringan yang pada umumnya melalui proses pengabutan, dibuat sebagai kelanjutan dari proses pengabutan, dibuat sebagai kelanjutan dari proses penguapan biasa kadar air dikurangi sampai di bawah 5% (Susilorini *et al.*, 2007).

Kualitas produk susu bubuk ditentukan oleh kualitas bahan yang digunakan, kualitas proses dan kualitas kemasan. Kualitas tersebut diusahakan agar terhindar dari kontaminasi logam-logam berat. Kontaminasi logam berat pada bahan pangan seperti susu dapat berbahaya bagi tubuh manusia jika terakumulasi dalam tubuh dengan kadar yang tinggi seperti dapat menyebabkan kerusakan jaringan, terutama jaringan detoksikasi dan ekskresi (hati dan ginjal).

Logam berat diketahui dapat mengumpul di dalam tubuh dan tetap tinggal dalam tubuh untuk jangka waktu lama sebagai racun yang terakumulasi (Saeni, 1997).

Logam berat merupakan istilah yang digunakan secara umum pada kelompok logam berat dan metalloid di mana densitasnya lebih besar dari 5 gr/cm³, termasuk pada unsur Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb dan Zn (Hutagalung *et al.*, 1997). Logam berat terdapat di seluruh lapisan alam dengan konsentrasi rendah. Pada kadar rendah terdapat beberapa logam berat yang dibutuhkan oleh organisme hidup untuk pertumbuhan dan perkembangan hidup. Namun sebaliknya apabila kadarnya meningkat, maka logam berat tersebut akan menjadi racun. Logam berat umumnya didefinisikan sebagai logam dengan densitas, berat atom atau nomor atom tinggi (Darmono, 1995). Dalam kadar rendah pun logam berat pada umumnya sudah beracun bagi tumbuhan, hewan termasuk manusia. Logam berat Cd, Hg dan Pb dinamakan sebagai logam sebagai logam non esensial dan pada tingkat tertentu menjadi logam beracun bagi makhluk hidup (Subowo, 1999). Penyebab kontaminan pada susu diantaranya dapat berupa obat-obatan, logam berat, radionuklida, mikotoksin, dan pestisida. Kontaminan kimia dapat masuk melalui dalam pakan ternak yang dikonsumsi dan menghasilkan residu dalam susu (Abubakar *et al.*, 2017). Pakan ternak biasanya berupa rerumputan yang sengaja ditanam atau yang tumbuh di alam liar.

Kegiatan industri dan pertanian telah menghasilkan peningkatan konsentrasi logam berat di udara, air dan tanah. Mereka kemudian diambil oleh tanaman atau hewan dan mereka akhirnya menemukan jalan masuk ke dalam rantai makanan (Salah *et al.*, 2013). Hewan seperti sapi, domba, dan kerbau memakan rerumputan dan tanaman yang mungkin mengandung polutan seperti logam berat yang dapat terakumulasi dalam jaringan mereka, sehingga menyebabkan berbagai bahaya kesehatan atau ditransfer ke konsumen mereka (Aslam *et al.*, 2011). Selain itu, sumber pakan ternak seperti sapi yang dipelihara terkadang berupa campuran sampah yang mengandung bahan-bahan yang kemungkinan bersifat toksik, sampah tersebut akan masuk ke dalam tubuh sapi dan terdistribusi keseluruh bagian tubuh sapi. Dengan demikian sapi yang mengkonsumsi sampah tersebut memiliki resiko tinggi terpapar bahan toksik. Salah satu bahan toksik yang menjadi faktor resiko adalah logam-logam berat (Rasyid *et al.*, 2013).

Toksistas logam berat pada hewan komersial biasanya berpengaruh pada produksi dari hewan tersebut, seperti daging dan susu yang dihasilkan, juga menimbulkan residu logam berat dalam tubuh ternak. Sapi yang makan sampah atau makanan yang tercemar bahan toksik logam berat akan mengakumulasi logam tersebut. Jika sapi tersebut kemudian dimanfaatkan sebagai sumber pangan pada manusia, maka manusia yang mengkonsumsi bahan pangan tersebut kemungkinan juga akan mengakumulasi logam-logam berat dan akhirnya akan mengalami gangguan kesehatan (Darmono, 2001). Susu juga dapat terkontaminasi dengan logam melalui bahan makanan dan air atau melalui proses manufaktur dan pengemasan (Iman *et al.*, 2017).

Meskipun susu merupakan sumber yang ideal untuk unsur makro (Ca, K dan P) dan unsur mikro (Cu, Fe, Zn, Se), kontaminan logam berat dapat memasuki tingkat yang berbahaya bagi

manusia (Qin *et al.*, 2009). Beberapa efek umum dari toksisitas logam berat termasuk kegoncangan otak, insomnia pada anak-anak, kehilangan memori, dan perkembangan keterlambatan tremor demensia (Duruibe *et al.*, 2007). Logam mengakibatkan gangguan pada sistem saraf, pertumbuhan terhambat, gangguan reproduksi, peka terhadap penyakit infeksi, kelumpuhan dan kematian dini, serta dapat juga menurunkan tingkat kecerdasan anak (Harurani, 2011). Oleh karena itu, adanya residu logam berat dalam susu merupakan masalah yang serius, karena sebagian besar susu dikonsumsi oleh bayi dan anak-anak (Ogabiele *et al.*, 2011). Batas maksimum kadar logam berat dalam susu ditetapkan dalam peraturan SNI 2970:2015 tentang syarat baku mutu susu bubuk, yaitu 0,1 mg/kg untuk As, 0,2 mg/kg untuk Cd, 0,02 mg/kg untuk Pb.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan kadar logam berat As, Cd dan dalam susu bubuk dengan menggunakan ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry*). Beberapa kelebihan dari penggunaan ICP-MS dalam analisis kadar logam berat adalah kemampuan pembacaan multi-element, sensitivitas tinggi dan dapat memperoleh informasi mengenai isotop dari sampel yang dianalisis. ICP menggunakan plasma sebagai sumber ionisasi, dan MS untuk menganalisis pendeteksian ion-ion yang dihasilkan. Komponen dari ICP-MS antara lain yaitu nebulizer, wadah spray, plasma, celah ion, gas argon, pompa, quadropole, spektrofotometer massa dan detektor.

Prinsip kerja dari ICP-MS yaitu sampel harus berupa cairan, kemudian sampel dipompa oleh pompa peristaltik ke dalam nebulizer, sampel akan diubah menjadi aerosol kemudian aerosol akan masuk ke dalam chamber dan mengalami desolvasi untuk mendapatkan ukuran aerosol yang lebih kecil. Unsur yang telah mengalami ionisasi akan memasuki spektrofotometer massa. Penganalisis yang dilakukan adalah quadropole yang terdiri dari empat buah batang berbentuk silinder yang memisahkan unsur berdasarkan rasio massa dan muatan (m/z). Dasar pemisahan ini berdasarkan gerakan ion dalam medan magnet. Quadropole beroperasi menggunakan arus AC/DC yang akan dialirkan secara berlawanan pada keempat batang silinder. Hanya ion dengan massa tertentu saja yang dapat melewati quadropole sampai ke detektor. Komponen alat harus dalam keadaan vakum karena proses ionisasi sampel sampai deteksi dengan spektrofotometer massa terjadi dalam keadaan atmosfer tujuannya agar ion dapat bergerak bebas tanpa bertabrakan dengan udara (Thomas 2004).

MATERI DAN METODE

Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah High Performance Microwave Digestion (HPLD) merk Milestone, tabung vessel, ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry*) merk Thermo, timbangan, labu takar, pipet mikro, pipet volumetrik, bulb, dan

corong. Bahan yang digunakan meliputi larutan H₂O₂ 30%, Larutan HNO₃ 65% , air demin dan larutan stok standar As, Cd, Pb 1000 ppm serta sampel susu bubuk yang diambil secara acak dari beberapa provinsi di Indonesia.

Metode

Pembuatan Larutan Standar As, Cd, dan Pb. Larutan standar logam As, Cd dan Pb dibuat dalam deret konsentrasi yaitu 1,25; 2,50; 5; 10; 20; 40 dan 80 ppb sebanyak 25 mL. Larutan ini dibuat dari larutan stok standar As, Cd dan Pb dengan konsentrasi 1000 ppm . Pengenceran dilakukan secara bertingkat yaitu dari konsentrasi 1000 hingga menjadi 100 dan 10 ppb dengan menggunakan rumus pengenceran.

Larutan standar 100 ppb dipipet sebanyak 20; 10; 5 dan 2,5 ml untuk membuat larutan standar dengan konsentrasi 80; 40; 20 dan 10 ppb. Dipipet larutan standar 10 ppb masing masing sebanyak 12,5; 6,25 dan 3,125 ml untuk membuat larutan standar dengan konsentrasi 5; 2,5 dan 1,25 ppb. Kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing labu takar 25 ml yang sudah dilabeli sesuai dengan deret konsentrasi di atas. Larutan yang digunakan dalam pengenceran adalah larutan HNO₃ 10,4%.

Ekstraksi Sampel. Sampel ditimbang sebanyak 0,3-0.5 gram, lalu dimasukkan ke dalam tabung sampel (*vessel*). Selanjutnya ditambahkan 8 ml asam nitrat (HNO₃) 65% dan 2 ml hidrogen peroksida (H₂O₂) 30%. Tabung *vessel* yang telah berisi sampel diletakkan dalam tabung pelindung sesuai dengan nomor sampel dan ditutup rapat. Tabung sampel dimasukkan dalam microwave untuk dilakukan destruksi. Pada microwave tabung 1 (blanko) dihubungkan dengan termokopel sebagai sensor temperatur. Destruksi sampel dilakukan dengan menggunakan *High Performance Microwave Digestion* dengan program suhu sebesar 148°C selama 40 menit dengan daya 15000 W dan tekanan 1000 mbar. Hasil destruksi dipindahkan ke dalam labu takar 50 mL dan ditera menggunakan air demin hingga tanda garis.

Pengukuran Deret Standar dan Sampel Uji. Pengukuran deret standar dan sampel uji dilakukan dengan menggunakan ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry*). Sebelum digunakan, ICP-MS dioptimalkan terlebih dahulu dengan menggunakan larutan tuning hingga memenuhi syarat yang ditentukan. Setelah alat mencapai kondisi optimal, dilakukan pengukuran terhadap deret standar untuk membuat kurva kalibrasi, kemudian diikuti dengan pengukuran terhadap sampel. Pembacaan intensitas dilakukan sebanyak 3 kali ulangan pada masing-masing standar atau sampel.

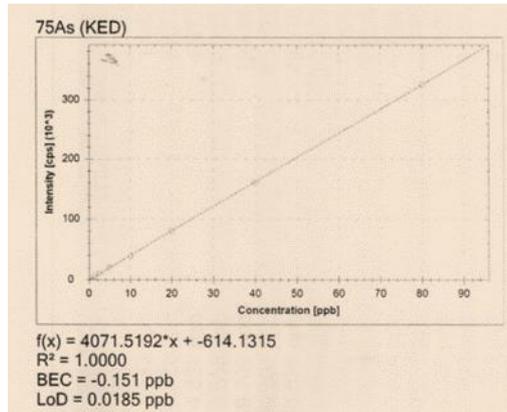
HASIL DAN PEMBAHASAN

Kurva Kalibrasi

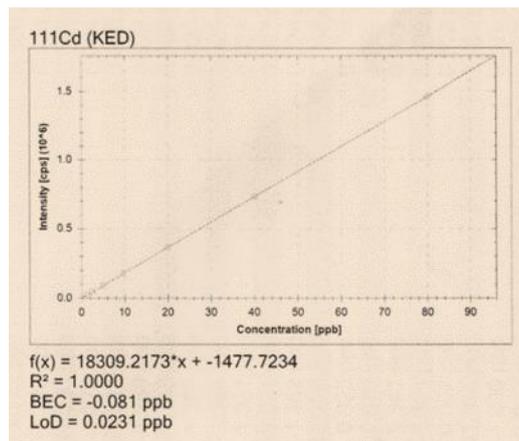
Penentuan kadar analit dalam sampel secara kuantitatif dengan menggunakan instrumentasi kimia secara umum dapat dilakukan melalui kurva kalibrasi yang memiliki linearitas yang baik. Kurva kalibrasi menggunakan blanko dan deret larutan standar logam arsen

(As), kadmium (Cd) dan timbal (Pb) dalam beberapa variasi konsentrasi larutan dengan metode *least square*.

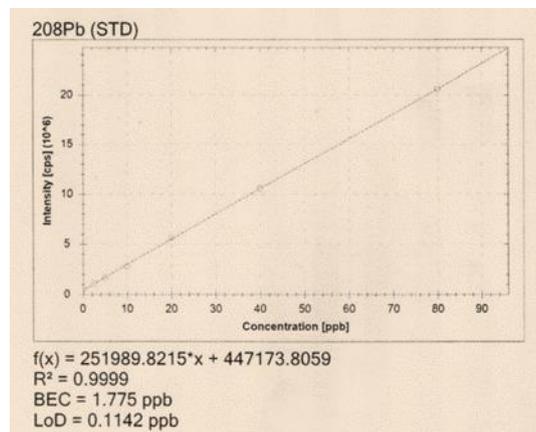
Fungsi larutan blanko adalah sebagai pengoreksi intensitas. Perhitungan regresi linier berguna untuk mengetahui hubungan antar variabel. Hasil pengukuran deret standar logam arsen (As), cadmium (Cd), dan timbal (Pb) dengan ICP-MS yang ditampilkan pada Gambar 1, 2 dan 3.



Gambar 1. Kurva Kalibrasi Larutan Standar Logam As



Gambar 2. Kurva Kalibrasi Larutan Standar Logam Cd



Gambar 2. Kurva Kalibrasi Larutan Standar Logam Cd

Kandungan Logam dalam Sampel

Penentuan kadar logam berat pada penelitian ini adalah menentukan kadar logam As, Cd, dan Pb dalam sampel susu bubuk . Hasil pengukuran ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1 Hasil Pengukuran Kadar Logam Berat dalam Sampel

Sampel	Logam Berat dalam Sampel (mg/kg)		
	As	Cd	Pb
SB 1	TTD	0,0007	TTD
SB 2	TTD	0,0014	TTD
SB 3	TTD	0,0008	TTD
SB 4	TTD	0,0046	TTD
SB 5	TTD	0,0024	TTD
SB 6	TTD	0,0006	TTD
SB 7	TTD	0,0014	TTD
SB 8	TTD	0,0038	TTD
SB 9	TTD	0,0033	TTD
SB 10	TTD	0,0038	TTD
SB 11	TTD	0,0035	TTD
SB 12	TTD	0,0053	TTD
SB 13	TTD	0,0038	TTD
SB 14	TTD	0,0053	TTD
BMR	0,1000	0,2000	0,0200

Keterangan : TTD : Tidak Terdeteksi

Pada tabel tersebut menunjukkan bahwa pada semua sampel tidak terdeteksi adanya logam As dan Pb. Hasil penelitian mengindikasikan bahwa semua sampel tidak mengandung logam As dan Pb atau diperkirakan logam As dan Pb berada pada konsentrasi yang sangat rendah dan berada dibawah limit deteksi alat sehingga tidak terbaca pada pengukuran. Logam Cd terdeteksi pada semua sampel yang diuji. Konsentrasi logam Cd yang tertinggi terdapat pada sampel SB 12 dan SB 14 yaitu sebesar 0,0053 mg/kg. Ditinjau dari proses pembuatan susu bubuk, tidak terdapat penggunaan alat yang mengandung logam Cd. Sehingga potensi cemaran logam Cd ditimbulkan dari penggunaan pakan sapi atau sumber air yang tercemar akibat polusi, tempat dan proses penyimpanannya. Mengacu pada BMR menurut SNI 2970:2015 (susu bubuk), semua sampel susu bubuk masih dapat dikonsumsi karena kontaminan logam Cd tidak melebihi batas ketentuan yaitu 0.2 mg/kg.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada semua sampel tidak terdeteksi adanya residu logam As dan Pb. Sedangkan residu logam Cd ditemukan pada seluruh sampel, dan konsentrasi tertinggi terdapat di dalam sampel SB 12 dan SB 14 yaitu sebesar 0,0053 mg/kg.

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar F, Salihu L. 2017. Evaluation of Heavy Metals and Nutrients in Powdered Milk Marketed Within Kaduna Metropolis, Nigeria. *IOSR Journal of Applied Chemistry (IOSR-JAC)*, 10(7), 11-15 e-ISSN: 2278-5736.
- Aslam BI, Javed F, Ur-Rahman Z. 2011. Uptake of Heavy metal residues from sewage sludge in the milk of goat and cattle during summer season. *Pakistan Veterinary Journal*, 31(1), 2011, 75-77.
- Darmono. 1995. *Logam Dalam Sistem Biologi Makhluk Hidup*. UI Press. Jakarta.
- Duruibe, J., Ogwuegbu, M. and Egwurugwu, N. (2007). *Heavy Metals Pollution and Human Toxic Effects*. *International Journal of Physical Science*, 2 (5): 112 -118.
- Eckles, C.H., Willes, B.C. and Harold, M. 1980. *Milk and Milk Products*. New Delhi: Tata McGraw-Hill. 21, 37.
- Iman MM, Muhammad Z, Zakari A. 2017. *Determination of Some Heavy Metals in Milk of Cow Grazing At Selected Areas, of Kaduna Metropolis*. *International Journals of Advanced Research in Computer Science and Software Engineering*, 7(7), 341-346 ISSN(E): 2277-128X, ISSN(P): 2277- 6451, DOI: 10.23956/ijarcsse/V7I6/01617.
- Jensen, Robert G. 1995. *Handbook of Milk Composition*. United States of America: Academic Press. 2.
- Harurani, L. 2011. Analisa Kandungan Logam Berat Pb dan Fe dengan Metode Spektrofotometri Serapan Atom terhadap Susu Kental Manis di Pekanbaru.
- Hutagalung. 2017. Pencemaran Laut oleh Logam Berat : Status Pencemaran Laut di Indonesia dan Teknik Pemantauannya. P3O-LIPI. Jakarta.
- Ogabiele, E.E., Udiba, U.U., Adesina, O.B., Hammuel, C., Ajayi, A., Yebpella, G.G., Mmereole, U.J. & Abdullah, M. (2011). *Assesment of Metal Levels in Fresh Milk from Cow's Grazed Around Challawa Industrial Estate of Kano Nigeria*. *Journal of Basic and Applied Scientific Research*, 1(7), 533-538.
- Qin, L. Wang, X., Long, X. And Long W. (2009). *The Minerals and Heavy Metals in Cow Milk from China and Japan*. *Journal of Health Science*, 55(2):300 – 305.
- Rasyid, R., Humairah, Zulharmitta. 2013. Analisis Kadmium (Cd), Seng (Zn), dan Timbal (Pb) pada Susu Kental Manis Kemasan Kaleng Secara Spektrometri Serapan Atom (SSA). *Jurnal Farmasi Higea*, 5(1), 63-71.
- Saeni, M. S. 1997. Penentuan Tingkat Pencemaran Logam Berat dengan Analisis Rambut. Orasi Ilmiah. Fakultas Matematika dan Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Salah Fa, Esmat IA, Mohammed AB. 2013. *Heavy Metals Residues and Trace Elements in Milk Powder Marketed in Dakahlia Governorate*. *International Food Research Journal*, 20(4), 1807- 1812.
- Subowo. 1999. Pengaruh Logam Berat Pb dalam Tanah terhadap Kandungan Pb, Pertumbuhan dan asil Tanam Caisem (*Brassica rapa*). *Prosiding Seminar Sumber Daya Tanah, Iklim dan Pupuk*. Puslittanak. Bogor.

Susilorini, T.E. dan M.E. Sawitri. 2007. Produk Olahan Susu. Penebar Swadaya. Yogyakarta.

Thomas R. 2004. Practical Guide to ICP-MS. USA: Marcel Dekker Inc Wcas. 1993.
Enviromental Analysis Using ICP-MS. Enviromental Laboratory. 8 : 44-49.



Kementerian Pertanian Republik Indonesia
Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan
Jalan Pemuda No.29 A Bogor 16161
Telp: (0251)8353712, 8377111, Faksimili : (0251)8353712
Website : bpmsph.ditjenpkh.pertanian.go.id / bpmsph.org
E-Mail : bpmsph@pertanian.go.id / bpmsph@yahoo.com

PERTANIAN

ISBN 977-250-204-601-5



9 772502 046015

