

# JURNAL

## KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER

Volume 6, Nomor 1, Jan - Des 2019



# JURNAL

KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER

VOLUME 6, No1 Jan-Des 2019

ISSN:2502-0463

# JURNAL

KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER

VOLUME 6, No.1 Jan-Des 2019

Editor : Armin Riandi  
Puji Rahayu  
Thufeil Yunindika  
Hanif Anisatun  
Metrizal

**Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan  
2019**

## **KATA PENGANTAR**

Puji syukur kami panjatkan kehadapan Tuhan Yang Maha Esa karena atas berkat rahmat-Nya Jurnal Ilmiah Kesehatan Masyarakat Veteriner Volume 6 Nomer 1, Bulan Januari–Desember 2019 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 mengharapkan 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 6, No.1 Jan-Des 2019**  
**ISSN:2502-0463**

1. **Perbandingan Penggunaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Metode *SYBR-Green* dan *TaqMan Probe* untuk Deteksi DNA Babi pada Pakan *Meat Bone Meal* (MBM).**  
*Puji Rahayu, Andini Khoerunnisa Astari, Hanif Anisatun, Diyan Cahyaningsari.....1*
2. **Validasi Metode Analisis Multiresidu Pestisida Organoklorin dalam Daging Sapi dengan Ekstraksi QuEChERS Menggunakan Kromatografi Gas-Detektor Penangkap Elektron.**  
*Aulia Yulanda , Fitri Amalia, Fevi Yani, Woro Dyah P.....10*
3. **Teknik *Real Time Polymerase Chain Reaction* (PCR) metode *Tagman Probe* untuk Deteksi DNA Babi Pada Sampel Gelatin .**  
*Puji Rahayu, Yohanna Amalia, Hanif Anisatun, Diyan Cahyaningsari.....16*
4. **Penentuan Kadar Residu Hormon Trenbolon Asetat pada Daging Sapi Menggunakan Metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).**  
*Firsti Isya Helfalia, Ahmad Sjahriza, Dini Tri Mardiani.....23*
5. **Validasi Metode Analisis Penentuan Kandungan Logam Berat As, Cd, Hg dan Pb dalam Telur Asin Dengan Menggunakan *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS).**  
*Puji Rahayu, Nida Pridananti, Elok Kania, Sani Susanty, Dini Tri Mardiani.....29*
6. **Pengujian Residu Quinolon Kuantitatif Pada Daging Ayam Tahun 2017 sampai dengan Tahun 2019 Dengan Metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).**  
*Riska Desitania, Oli Susanti, Attya Asuh Insani.....40*
7. **Validasi Metode Pengujian Logam Berat Menggunakan Instrument *Induced Coupled Plasma-Mass Spectrometry* (ICP-MS) pada Sampel Daging Unggas**  
*Puji Rahayu, Ervina Anggraini Wijaya, Elok Kania, Sani Susanti, Dini Tri Mardiani.....43*
8. **Analisa Residu Hormon Trenbolon Asetat pada Hati Sapi dengan Metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).**  
*Dini Tri Mardiani.....49*
9. **Penentuan Kadar Residu Cemaran Logam Berat Pada Susu Bubuk Dan Susu *Ultra High Temperature* (UHT) Menggunakan *Graphite Furnace Atomic Absorbtion Spectrophotometer* (GF-AAS).**  
*Taufiq Gunawan, Elok Kania Suryaningsih.....53*
10. **Analisis Cemaran *Staphylococcus Aureus* Dalam Daging Sapi Asal Pasar Tradisional.**  
*Sagita Dini Lestari, Ery Novarietha H, Sutiastuti.....60*
11. **Prevalensi *Escherichia coli* pada Daging Ayam di Unit Usaha di Provinsi Banten.**  
*Kanti Puji Rahayu, Ading Wahyudi.....66*
12. **Penentuan Kadar Aflatoksin M1 pada Susu Bubuk dengan Metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)**  
*Aufa Khairunnisa, Sani Susanty.....69*

<b>13. Pengaruh Penambahan Berbagai Macam Konsentrasi 2,3,5 Triphenyltetrazolium Chloride (TTC) pada pengujian Total Plate Count Terhadap Pertumbuhan Bakteri Gram Negatif dan Gram Positif.</b>	
<i>Ika Kartika Syarifah, Hasniah Achmad</i> .....	77
<b>14. Identifikasi Spesies Tikus Menggunakan <i>Real-Time PCR Melt Curve Analysis</i> (MCA)</b>	
<i>Diyan Cahyaningsari, Puji Rahayu, Hanif Anisatun, Metrizar</i> .....	82

## **Perbandingan Penggunaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Metode *SYBR-Green* dan *TaqMan Probe* untuk Deteksi DNA Babi pada Pakan *Meat Bone Meal* (MBM)**

**Puji Rahayu<sup>1\*</sup>, Andini Khoerunnisa Astari<sup>2</sup>, Hanif Anisatun<sup>1</sup>, Diyan Cahyaningsari<sup>1</sup>, Metrizar<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

<sup>2</sup>Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor

\*Email korespondensi penulis: pujirahayu@pertanian.go.id

### **ABSTRACT**

*Several methods can be used to detect pork in food of animal origin, including rapid tests, protein-based tests using Enzyme Linked Immuno Assay (ELISA), and DNA-based using Polymerase Chain Reaction (PCR). One type of detection method that is most accurate in detecting pork components and their derivatives is the DNA-based method, namely PCR (Polymerase Chain Reaction). DNA-based amplification method has a higher sensitivity and specificity compared to other methods. The research was aimed to identify and analyse the presence of pork and wild boar meat in beef and beef product by using rapid test and real-time PCR (qPCR) methods. The samples consisted of 30 porks and 30 wild boar meats. They were divided into 5 concentrations such as 2%, 1%, 0.5%, 0.25%, and 0.125% which were homogenized with either raw or cooked beef mixture.*

*The result of rapid test showed that the raw meat samples of pork were able to detect in concentration of 0.125% and wild boar meat were able to detect in 0.25%. The cooked samples of pork meatball were able to detect in 0.25% and wild boar meatballs were able to detect in 2%. Meanwhile, the result of qPCR showed that raw meat and cooked samples were able to detect in concentration of 0.125%. There were no significant difference in cycle threshold (Ct) value between pork and wild boar meats using real-time PCR ( $p \geq 0.05$ ), but there were significant difference between raw and cooked samples using qPCR ( $p < 0.05$ ). Rapid test and qPCR methods can be used to identify adulteration of pork and wild boar meat in beef and beef product with different limit of detection.*

**Keywords:** *adulteration, wild boar meat, rapid test, qPCR.*

### **PENDAHULUAN**

Pakan merupakan bahan-bahan yang bisa dimakan oleh ternak dan tidak mengganggu kesehatannya. Pakan berperan penting dalam kegiatan peternakan, karena menentukan tumbuh dan kembangnya suatu komoditas. Pakan dengan kualitas baik dan didukung oleh lingkungan hidup yang optimal akan menghasilkan produk yang juga berkualitas di pasaran. Kualitas suatu pakan dapat dilihat dari komposisi dan tekstur fisiknya (Halver 1989). Komposisi suatu pakan terdiri atas nutrisi dan bahan tambahan lainnya yang dapat menghasilkan energi. Seperti yang kita ketahui sumber utama energi berasal dari makromolekul berupa karbohidrat, protein, serta lemak. Meat and Bone Meal (MBM) merupakan salah satu bentuk pakan hasil pengolahan limbah yang berasal dari daging dan tulang sapi, kambing maupun domba atau produk ternak lainnya.

MBM yang merupakan bahan campuran dari beberapa limbah ternak ini rawan dioplos dengan bahan-bahan yang beresiko menyebabkan penyakit, kanibalisme dan membutuhkan penanganan khusus. Contohnya

produsen pakan yang nakal mencampur pakan dengan babi. Bagi masyarakat muslim tentu pakan dengan kandungan babi akan membutuhkan penanganan khusus seperti penggunaan sarung tangan atau yang lainnya untuk menghindari kontak dengan kandungan babi tersebut. Selain itu, adanya kandungan babi pada produk pakan menjadi suatu masalah dikarenakan adanya konsumen yang beragama Islam yang tidak diperbolehkan untuk mengonsumsi babi dan turunannya berdasarkan hukum halal. Dilain sisi, jika pakan ini diberikan kepada sesama jenisnya (misal: pakan mengandung babi diberikan kepada babi) maka akan menciptakan sifat kanibalisme. Maka dari itu, diperlukan suatu metode deteksi untuk mengetahui kandungan babi pada suatu sampel pakan.

Beberapa metode yang dapat dilakukan untuk mendeteksi babi pada produk pangan asal hewan, diantaranya uji cepat (rapid test), uji berbasis protein menggunakan Enzim Linked Immuno Assay (ELISA), dan berbasis DNA menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR). Salah satu jenis metode pendeteksian yang paling akurat dalam mendeteksi komponen babi dan

turunannya adalah metode berbasis DNA yaitu PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Metode berbasis amplifikasi DNA memiliki sensitifitas dan spesifisitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode lain (Che Man 2007). Pengembangan metoda PCR yang dapat mengkuantifikasi salinan produk amplifikasi DNA dikenal dengan real-time PCR atau quantitative PCR (qPCR). Metode real-time ini memungkinkan analisis dengan persen kemungkinan kontaminan sebesar 1%. Prinsip real-time PCR yaitu pendeteksian amplikon yang terbentuk dengan mengukur peningkatan sinyal fluoresens yang berpendar saat terikat dengan untai DNA ganda. Fluoresens yang dihasilkan akan sebanding dengan jumlah DNA baru yang terbentuk (Reece 2004). Tujuan dari pengujian ini adalah identifikasi DNA babi sebagai kontaminan dalam produk pakan dengan menggunakan Real-time PCR metode SYBR-Green dan Taqman probe.

### **Pakan Meat Bone Meal (MBM)**

Pakan merupakan bahan-bahan yang bisa dimakan oleh ternak dan tidak mengganggu kesehatannya. Pada umumnya pengertian pakan (feed) digunakan untuk hewan yang meliputi kuantitatif, kualitatif, kontinuitas serta keseimbangan zat pakan yang terkandung di dalamnya. Pakan merupakan sumber energi dan materi bagi kehidupan dan pertumbuhan ternak. Zat makanan adalah penyusun bahan pakan yang umumnya memiliki komposisi kimia yang serupa yang diperlukan untuk hidup, ternak meliputi protein, karbohidrat, lemak, mineral, vitamin dan air. Zat yang terpenting dalam pakan adalah protein. Jumlah dan kualitas protein mempengaruhi pertumbuhan optimal ternak. Karena itu, dalam menentukan kebutuhan zat makanan, kebutuhan protein perlu dipenuhi terlebih dahulu (Amri dan Khairuman 2003).

Pakan buatan adalah pakan yang dibuat dengan formulasi tertentu berdasarkan pertimbangan kebutuhannya. Pembuatan pakan sebaiknya didasarkan pada pertimbangan kebutuhan nutrisi, kualitas bahan baku, dan nilai ekonomis. Dengan pertimbangan yang baik, dapat dihasilkan pakan buatan yang disukai oleh ternak, mudah dicerna, serta aman bagi ternak itu sendiri. Berdasarkan tingkat kebutuhannya pakan buatan dapat dibagi menjadi tiga kelompok yaitu pakan tambahan, pakan suplemen, dan pakan utama. Pakan tambahan adalah pakan pakan yang sengaja dibuat untuk memenuhi kebutuhan pakan. Pakan suplemen adalah pakan yang sengaja dibuat untuk menambah komponen nutrisi tertentu yang tidak mampu disediakan pakan alami. Sedangkan pakan utama adalah pakan yang sengaja dibuat

untuk menggantikan sebagian besar pakan alami (Dharmawan 2010).

Tepung daging dan tulang (MBM) merupakan salah satu bentuk dari pakan buatan utama yang banyak digunakan oleh peternak. Tepung ini berasal dari sisa-sisa daging yang tidak dikonsumsi manusia serta limbah pengolahan hewan ternak lainnya, biasanya merupakan daging melekat pada kulit dan tulang dalam bentuk tetelan atau berupa bulu ternak dan yang lainnya. Menurut Lovell (1989) kandungan protein yang terdapat pada MBM berkisar antara 45 -55 % bahkan lebih. Namun NRC (1993) mengatakan bahwa kualitas protein MBM masih berada di bawah tepung ikan. Scott et al. (1982) juga menambahkan bahwa tepung tulang dan daging (MBM) memiliki kandungan asam amino metionin dan sistein dalam jumlah sedikit tetapi memiliki kandungan asam amino lisin yang tinggi. Selain itu, karena merupakan hasil pengolahan limbah ternak yakni tulang dan daging maka bahan ini memiliki kandungan fosfor yang tinggi (Lovell 1989). Komposisi dari tepung daging dan tulang yang umum beredar di pasaran terdiri dari bahan kering 88.5%, abu 27.73%, protein 61.13%; lemak 11.75%, serat kasar 2.71% dan beta-N 0.68%.

### **DNA**

DNA adalah asam nukleat yang mengandung materi genetik dan berfungsi untuk mengatur perkembangan biologis seluruh bentuk kehidupan secara seluler. DNA memiliki struktur pilinan utas ganda yang antiparalel dengan komponen-komponennya, yaitu gula pentosa (deoksiribosa), gugus fosfat, dan pasangan basa. Pasangan basa pada DNA terdiri atas dua macam, yaitu basa purin dan pirimidin. Basa purin terdiri atas adenin (A) dan guanin (G) yang memiliki struktur cincinganda, sedangkan basa pirimidin terdiri atas sitosin (C) dan timin (T) yang memiliki struktur cincin-tunggal. Satu komponen pembangun (building block) DNA terdiri atas satu gula pentosa, satu gugus fosfat dan satu pasang basa yang disebut nukleotida. Genom adalah set lengkap materi genetik (DNA) yang dimiliki suatu organisme dan terorganisasi menjadi kromosom. DNA dapat diisolasi, baik dari sel hewan, manusia, maupun pada tumbuhan (Faatih 2009).

Untai double helix DNA bisa dipisahkan saat proses replikasi DNA, transkripsi RNA, serta rekombinasi genetik. Denaturasi DNA merupakan proses pemisahan untai DNA secara in vitro. Denaturasi terjadi saat basa nitrogen diberi perlakuan dengan suhu atau pemberian larutan dengan pH tertentu. Suhu saat DNA terdenaturasi separuhnya disebut dengan melting temperature ( $T_m$  DNA). 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).

Untuk deteksi DNA babi, salah satu gen yang dapat digunakan sebagai marka (penanda) spesifik adalah gen sitokrom b (cyt b). Gen ini dipilih untuk identifikasi species vertebrata karena menunjukkan variasi yang sangat terbatas dalam satu species tetapi variasinya sangat besar antara satu species dengan species lainnya. Sitokrom b merupakan satu dari 37 gen dalam genom sirkuler mitokondria. Sekuen gen cyt b memiliki keunikan, yaitu adanya bagian yang conserved di tingkat species, sehingga dapat digunakan untuk deteksi spesifik pada species tertentu.

Menurut Boes (2000), babi memiliki kekhasan saat mengalami amplifikasi. Saat hasil amplifikasi DNA babi teramati, ditemukan satu pita yang mempunyai ukuran sekitar dua kb, sedangkan DNA sapi yang diamplifikasi tidak menunjukkan pita yang jelas.

#### **Real-time PCR**

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu metode enzimatik untuk amplifikasi DNA secara *in vitro*. PCR pertama kali dikembangkan oleh Kary B. Mullis pada tahun 1985. Beberapa komponen yang diperlukan pada proses PCR diantaranya DNA cetakan, oligonukleotida primer, deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), enzim DNA polimerase, dan buffer. Terdapat tiga tahapan penting dalam proses PCR yang selalu terulang dalam 30-40 siklus dan berlangsung dengan cepat. Tahapan tersebut yakni denaturasi, annealing (penempelan primer), dan pemanjangan primer (extension). Denaturasi DNA yakni proses pembukaan untai ganda DNA menjadi untai tunggal. Denaturasi yang tidak lengkap mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (membentuk DNA ganda lagi) dan proses PCR gagal. Tahap penempelan primer perlu merancang primer yang baik. Primer yang baik yakni berukuran 18-25 basa, mengandung 50-60% G+C dan untuk kedua primer tersebut sebaiknya sama. Waktu annealing yang biasa dilakukan adalah 30-45 detik serta suhu penempelan berkisar 36°C -72°C, namun suhu yang umum adalah 50°C -60°C. Sekuens DNA masing-masing primer sebaiknya tidak saling berkomplemen, karena dapat membentuk struktur sekunder dan mengurangi efisiensi PCR. Pemanjangan primer, selama tahap ini Taq polimerase memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Penyusunan dilakukan pada suhu 72°C dan

menghasilkan 35-100 nukleotida/detik (Yusuf 2010).

Metode PCR kemudian berkembang menjadi real-time PCR. Metode ini telah diaplikasikan dalam berbagai aplikasi seperti diagnostik 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 real-time PCR yaitu pendeteksian amplikon yang terbentuk dengan mengukur peningkatan sinyal fluoresensi yang berpendar saat terikat dengan untai DNA ganda. Fluoresensi yang dihasilkan akan sebanding dengan jumlah DNA baru yang terbentuk (Reece 2004).

Real-time PCR memiliki dua jenis komponen bahan kimia untuk mendeteksi sampel selama siklus PCR yaitu pewarna fluoresensi SYBR green dan probe DNA. Pewarna berfluoresensi menginterkalasi DNA beruntai ganda, sedangkan probe DNA terdiri dari oligonukleotida yang dihubungkan dengan pewarna fluoresensi dan quencher (peredam pewarna). Proses pendegradasian akan melepaskan pewarna fluoresensi dari komponen yang berfungsi untuk pendegradasi sehingga menghasilkan emisi fluoresensi yang sebanding dengan jumlah templat DNA. Sinyal fluoresensi yang terbentuk diukur dan digunakan untuk kuantitasi DNA (Hui 2011).

Produk hasil duplikasi DNA disebut amplikon. Amplikon akan di deteksi berdasarkan peningkatan fluoresensi yang dihasilkan dari sintesis DNA. Fluoresensi ini dihasilkan ketika terjadi peningkatan ikatan double strand DNA dengan pewarna atau probe fluorogenik pada pencampuran amplifikasi. Peningkatan fluoresensi digambarkan dengan kurva yang terdiridari 3 buah fasa yaitu fasa awal atau fasa inisiasi yaitu fase terjadi pada siklus pertama PCR dimana pancaran fluoresensi belum dapat dibedakan dari baseline, fasa eksponensial atau fasa puncak merupakan fase peningkatan eksponensial dalam fluoresensi sebelum fase stabil tercapai, dan fase stabil atau fasa plateau yaitu fase saat tidak ada lagi peningkatan fluoresensi.

Prinsip dari SYBR-Green adalah pewarna fluoresensi akan mengikat bagian minor utas ganda DNA sehingga menghasilkan pendaran warna hijau pada akhir fase elongasi (Shipley 2006). Intensitas fluoresensi yang semakin meningkat (gambar 4) menunjukkan peningkatan jumlah utas ganda DNA yang terdeteksi oleh detektor. SYBR-Green umumnya digunakan singleplex dalam RT-PCR atau

menggunakan satu target dan sepasang primer. Metode SYBR-Green lebih sering digunakan karena memiliki beberapa keunggulan, diantaranya dapat digunakan pada berbagai jenis pengujian karena mampu bekerja pada berbagai jenis primer, lebih sederhana karena tidak perlu merancang probe, serta harga pewarna yang relatif lebih murah (Shipley 2006). Namun, kekurangan dari metode ini sendiri adalah dapat mengikat DNA utas ganda pada bagian tidak spesifik sehingga primer juga akan terikat. Tetapi hal ini tidak menjadi masalah yang besar karena produk tidak spesifik ini akan teridentifikasi melalui analisis pada melting curve.

Taqman probe merupakan salah satu contoh dari hidrolisis probe. Hidrolisis probe menggunakan oligonukleotida spesifik yang berkomplemen dengan DNA target yang disebut probe. Probe dilabeli oleh dua molekul, yaitu reporter pada ujung 5' probe yang merupakan pewarna fluorosens dan quencer pada ujung 3' probe yang merupakan molekul penerima sinyal fluorosens. Prinsip dari metode ini adalah saat probe belum berkomplemen dengan DNA target, molekul reporter akan mengeksitasi sinyal fluorosens ke molekul quencer karena jarak antara kedua molekul berdekatan. Kemudian probe akan berkomplemen dengan DNA target saat mencapai suhu annealing, lalu proses eksitasi sinyal fluorosens akan terhenti karena jarak molekul yang berjauhan. DNA polymerase akan memperpanjang DNA target sampai kedua molekul berdekatan, maka 5'nuklease yang terdapat pada DNA polymerase akan menghidrolisis molekul reporter sehingga sinyal fluorosensi akan tertangkap oleh detektor (gambar 5) (Shipley 2006). Berbeda dengan SYBR-Green, penggunaan probe biasanya multiplex yang menggunakan DNA target dan primer lebih dari satu dalam satu reaksi. Selain itu, probe akan bekerja secara spesifik dengan bebraoa DNA target yang berbeda (BioRad 2006).

## **MATERI DAN METODE**

### **Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan ialah neraca analitik, sudip, thermomixer, minisentrifuse, vortex mixer, rak tube, micro smash, micro smash beads, bleaching agent, mikropipet volume 10-100  $\mu$ L dan 100-1000  $\mu$ L, serta instrument Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) (Rotor-Gene Q, Qiagen, Malaysia), nano-drop spectrophotometer.

Bahan-bahan yang digunakan ialah sampel MBM, komponen KIT ekstraksi dengan merek Mericon Pig KIT meliputi lysis buffer; proteinase K, binding buffer, pre-wash buffer, wash buffer, elution buffer, serta KIT PCR dengan merk

Surefood® Animal ID Pork Sens Plus (100 React.) meliputi, PCR grade H<sub>2</sub>O, received tubes, spin filter, dan etanol 99,8%

### **Metode**

#### **Ekstraksi sampel**

Sebanyak sepuluh sampel gelatin yang telah dihomogenkan, kemudian ditimbang seberat 50 mg di dalam tube reaksi. Ditambahkan 580  $\mu$ L lysis buffer dan 20  $\mu$ L proteinase K, lalu dihomogenkan. Setelah itu, sampel diinkubasi dalam thermomixer pada suhu 65°C selama 30 menit. Selanjutnya sampel disentrifuse menggunakan minicentrifuge highspped dengan kecepatan 12.000 rpm selama satu menit. Sampel yang terlisiskan akan menunjukkan fase bening setelah lisis, fase bening tersebut langsung dipindahkan ke dalam spin filter berwarna hijau. Spin filter ditempatkan pada receiver tube berwarna kuning dengan volume 2,0 mL. Diambil bagian supernatan sebanyak 400  $\mu$ L. Kemudian receiver tube dengan spin filter disentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama satu menit, lalu cairan supernatan dipindahkan ke dalam spin filter baru dan ditambahkan 250  $\mu$ L binding buffer kemudian divortex hingga homogen.

Spin filter baru ditempatkan pada receiver tube yang baru (2.0 mL berwarna kuning). Selanjutnya, larutan diinkubasi pada suhu ruangan selama satu menit. Kemudian, sampel disentrifuse pada 12.000 rpm selama satu menit. Filtrat dibuang dan spin filter diletakkan kembali dalam receiver tube. Setelah itu, ditambahkan 550  $\mu$ L pre-wash buffer pada spin filter dan sampel disentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama satu menit. Filtrat dibuang dan ditambahkan 550  $\mu$ L wash buffer pada spin filter. Dilakukan sentrifuse pada 12.000 rpm selama satu menit, kemudian filtratnya dibuang. Residu etanol yang masih tersisa dibersihkan dengan proses sentrifuse selama dua menit dengan kecepatan 12.000 rpm.

Spin filter diletakkan pada receiver tube yang baru (2.0 mL tidak berwarna) dan ditambahkan 200  $\mu$ L elution buffer yang sebelumnya sudah dipanaskan. Sampel diinkubasi pada suhu 65°C selama tiga menit. Kemudian, disentrifuse selama satu menit pada 10.000 rpm. Dilakukan penambahan ulang lysis buffer dan binding buffer, masing-masing sebanyak 200  $\mu$ L ke dalam 200  $\mu$ L filtrate yang dihasilkan sebelumnya. Diletakkan campuran larutan yang telah disiapkan pada spin filter dan receiver tube yang baru. Larutan kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama satu menit.

Kembali dilakukan proses sentrifuse dengan kecepatan 12.000 rpm selama satu menit. Filtrat yang dihasilkan dibuang, spin filter ditempatkan kembali pada receiver tube yang

ada. DNA yang telah diekstraksi disimpan pada suhu -20°C untuk waktu penyimpanan lebih dari 24 jam. Kemudian dilakukan kuantifikasi DNA untuk menunjukkan kemurnian DNA yang diperoleh. Diambil beberapa mikro sampel untuk kemudian dibaca absorbansinya pada nano-drop spectrophotometer.

#### **Identifikasi Spesies dengan Real-Time PCR**

Preparasi PCR-mix dilakukan dengan mengacu pada KIT PCR (DNAeasy, Mericon). Setelah persiapan master-mix dan alat selesai, semua sampel disiapkan untuk proses pembacaan dalam alat, termasuk dengan negative control (NC) dan positive control (PC). Semua micro tube disentrifuse dengan kecepatan rendah. Kemudian, semua sampel diletakkan pada alat Realplex dan diatur sesuai ketentuan.

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **Ekstraksi Sampel**

Pengujian identifikasi spesies babi pada pakan MBM ini terdiri dari sepuluh sampel uji, satu positive control (PC), satu negative control (NC), dan satu extraction control (EC). Masing-masing sampel diberi kode sampel yaitu MBM 1, MBM 2, MBM 3, MBM 4, dan seterusnya hingga MBM 10.

**Tabel 1.** Hasil Kuantifikasi dan Kemurnian Sampel DNA Pakan MBM

No Sampel	Nama Sampel	Kuantifikasi (ng/ $\mu$ L)	260/280
1	MBM 1	294.6	2.13
2	MBM 2	244.9	2.14
3	MBM 3	222.4	2.12
4	MBM 4	212.9	2.13
5	MBM 5	214.7	2.14
6	MBM 6	325.3	1.67
7	MBM 7	296.9	1.65
8	MBM 8	304	1.68
9	MBM 9	272	2.12
10	MBM 10	270.3	2.13

Nilai kuantifikasi (tabel 1) yang didapatkan menunjukkan proses ekstraksi dilakukan dengan benar atau tidaknya. Tujuh sampel menunjukkan nilai rasio diatas dua, yang menunjukkan DNA masih terkontaminasi oleh fenol. Sedangkan tiga sampel lainnya memiliki nilai dibawah 1.8 yang menunjukkan ketiga sampel masih terkontaminasi protein dan polisakarida. Nilai kuantifikasi terendah ada pada

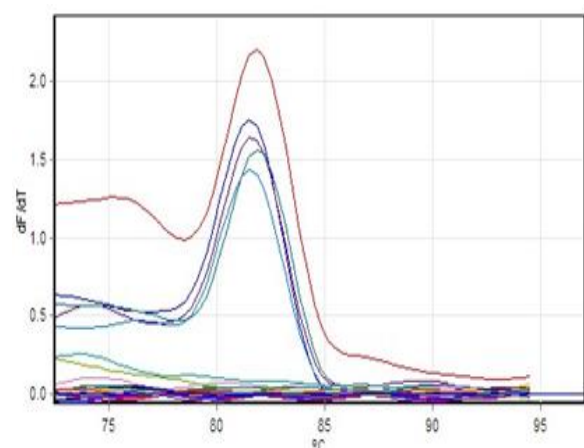
sampel MBM 7 yaitu 1.65 dengan total DNA yang teramati sejumlah 296.9 ng/ $\mu$ L. Tidak dilakukan proses ekstraksi ulang untuk sampel yang terkontaminasi.

#### **Identifikasi Spesies dengan Real-Time PCR**

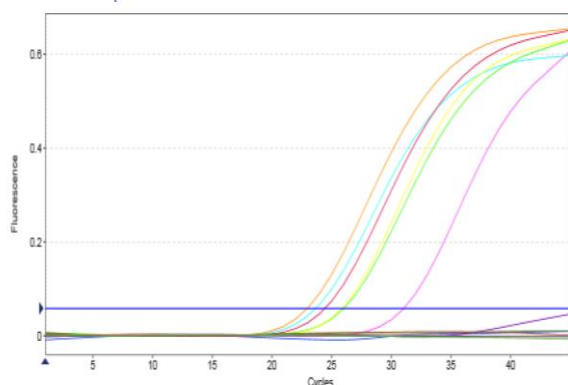
Analisis identifikasi spesies babi pada sepuluh sampel pakan MBM menyatakan lima pakan diantaranya positif mengandung babi, dan lima lainnya negatif mengandung babi. Hal tersebut dapat dilihat pada gambar 1 yang menunjukkan adanya persamaan kelinieran grafik dari positive control (PC) dengan lima sampel pertama. Sedangkan lima sampel lainnya linier dengan negative control (NC). Dapat dikonfirmasi hasil ini valid karena EC yang diuji pun menunjukkan hasil negatif yang mana berarti bahwa proses ekstraksi bebas dari kontaminasi.

Identifikasi menggunakan probe memiliki second confirmation berupa internal control yang telah terkandung dalam kit yang digunakan (gambar 2). Dengan adanya internal control, kemungkinan hasil positif semu dapat dikurangi.

Validasi ulang hasil dari pengujian identifikasi spesies menggunakan metode Taq-man probe bisa dilakukan dengan pengujian ulang dengan metode three step SYBR-Green yang akan menunjukkan grafik melting curve serta cycling time dari proses Real-time PCR. Seperti yang ditampilkan pada kurva amplifikasi dengan metode Taq-man probe, melting curve (gambar 3) dari sampel 1 sampai 5 memiliki kemiripan yaitu mengalami titik yang sama yaitu pada kisaran 80-82°C.



**Gambar 1.** Kurva Melting Curve Metode SYBR Green



**Gambar 2.** Kurva Ct Metode SYBR-Green

Konfirmasi lainnya bisa dilihat dari Cycle threshold (Ct), Nilai Ct yaitu siklus dimana fluoresensi mencapai ambang batas atau threshold sehingga terjadi peningkatan signifikan saat pertama kali terdeteksi (Rodriguez 2013). Sampel satu sampai lima terkonfirmasi memiliki kemiripan dengan PC (gambar 4), namun terjadi perbedaan yang cukup besar dikarenakan PC yang digunakan memiliki konsentrasi yang besar dibandingkan dengan sampel yang diujikan. Lima sampel lainnya memiliki nilai Ct yang jauh berbeda dengan PC, maka sampel dinyatakan negatif mengandung babi.

**Tabel 2.** Perbandingan Nilai Ct pada Kedua Metode

No	Sampel	Nama Sampel SYBR-Green (Ct)	Metode PCR Probe (Ct)
1	MBM 1	31.24	23.68
2	MBM 2	30.98	26.03
3	MBM 3		25.86
4	MBM 4	32.04	22.97
5	MBM 5	32.06	24.46
6	MBM 6	-	-
7	MBM 7	-	-
8	MBM 8	-	-
9	MBM 9	-	-
10	MBM 10	-	-
11	EC	-	-

Tabel 2 menunjukkan perbandingan nilai Ct yang terbaca pada metode SYBR-Green dan Taq-man probe, kedua metode menampilkan hasil yang sama yaitu sampel satu sampai lima saja yang menunjukkan nilai Ct, sedangkan yang lainnya tidak.

Pakan tepung daging dan tulang atau Meat Bone Meal (MBM) merupakan produk pakan yang berasal dari limbah peternakan. Kebanyakan produk MBM berasal dari luar negeri karena keterbatasan untuk alat pengolahannya. Karena produk ini berasal dari

berbagai olahan limbah, maka produk ini beresiko dicampur dengan bahan limbah yang berasal dari babi. Kandungan babi pada suatu produk mengharuskan penanganan khusus (seperti penggunaan sarung tangan) untuk konsumen yang beragama Islam atau bahkan tentang kehalalan produk peternakan terkait karena hewan tersebut mengonsumsi pakan mengandung babi. Suatu metode deteksi diperlukan untuk mengetahui keberadaan gelatin babi pada suatu sampel pangan yang menggunakan gelatin sebagai bahan baku, salah satunya ialah menggunakan Real-time PCR.

Proses identifikasi spesies babi ini melewati beberapa tahapan diantaranya proses preparasi, ekstraksi serta amplifikasi. Tahap preparasi yang dilakukan adalah proses penimbangan sepuluh sampel beserta satu sampel EC (Extraction Control). Bobot sampel yang ditimbang sebesar 50 mg yang kemudian diletakkan dalam microtube untuk selanjutnya diekstraksi. Proses ekstraksi DNA merupakan tahap awal dilakukannya analisis sumber DNA. Ekstraksi DNA dilakukan untuk mendapatkan DNA genom dari pakan yang dapat diperoleh melalui cara mekanik maupun enzimatik. Ekstraksi pada pengujian kali ini dilakukan melalui cara enzimatik. Tiga tahap umum dalam proses ekstraksi DNA yaitu pelisisan sel dinding, pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Ardiana 2009). Pada pengujian ini, isolasi DNA dilakukan dengan metode ekstraksi menggunakan matriks dari kit komersial Mericon Pig KIT dengan protokol khusus untuk identifikasi produk pakan dan makanan. Proses ekstraksi DNA yang dilakukan pada sampel pakan melalui dua kali tahap pencucian karena kandungan dari pakannya sendiri yang kompleks.

Prinsip kerja dari teknik ini adalah asam nukleat akan teradsorpsi oleh matriks pada kit, yang kekuatannya bergantung pada ion dan pH lingkungan. Asam nukleat akan teradsorpsi oleh matriks dan akan mudah dibersihkan dari pengotor lainnya dibawah tekanan sentrifugal. Asam nukleat yang teradsorpsi pada matriks tersebut dapat dielusi dengan menambahkan larutan rendah garam (Tan dan Yip 2009, Chacon dan Griffiths 2014). Setelah DNA berhasil diekstraksi, kemudian dilakukan proses amplifikasi dengan menggunakan alat Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR). Prinsip real-time PCR yaitu pendeteksian amplikon yang terbentuk dengan mengukur peningkatan sinyal fluoresens yang berpendar saat terikat dengan untai DNA ganda. Fluoresens yang dihasilkan akan sebanding dengan jumlah DNA baru yang terbentuk (Reece 2004).

Sampel yang telah diekstraksi melalui

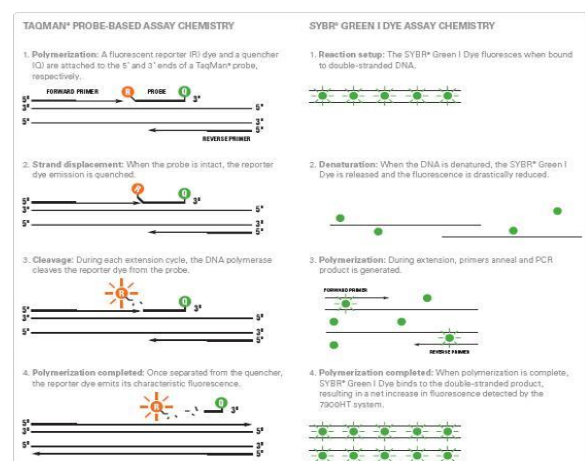


kuantifikasi terlebih dahulu. Kuantifikasi berfungsi untuk menentukan kemurnian dari DNA yang terekstraksi. Pengukuran RNA dan DNA dilakukan berdasarkan ratio antara A260/A280. Nukleotida dapat menyerap sinar ultraviolet secara maksimal pada panjang gelombang 260 nm dan protein pada panjang gelombang 280. Pada spektrofotometer, sampel dilewatkan pada panjang gelombang tersebut. Banyaknya radiasi ultraviolet yang diserap berbanding lurus nilainya dengan banyaknya DNA yang diekstraksi. Kemurnian DNA yang ideal didapatkan dari proses isolasi DNA adalah 95-100% dengan nisbah absorpsi sebesar  $2.00 \pm 0.05$  (Sambrook dan Russel 2009). Sampel melalui proses kuantifikasi ini dengan alat nano-drop spectrophotometer dengan kemurnian DNA yang berkisar 1.65 – 2.14. Wahyuni et al. (2019) menyatakan, apabila nilai kemurnian yang diperoleh dibawah kisaran 1.8, maka sampel tersebut masih terkontaminasi oleh protein dan polisakarida. Sedangkan, sampel yang memiliki kemurnian diatas dua terkontaminasi oleh fenol. Hal ini mengingat serapan maksimal fenol ada pada panjang gelombang 260 nm (Fatmawati et al. 2015).

Sesuai dengan rekomendasi KapaBiosystems tahun 2014 yang dikutip oleh Nugroho et al. (2017), konsentrasi DNA template yang dibutuhkan untuk PCR berkisar antara 10-100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , sehingga konsentrasi DNA total yang diperoleh dari proses ekstraksi ini cukup digunakan untuk proses PCR.

Proses dalam real-time PCR ialah amplifikasi template (DNA atau cDNA) yang memiliki tiga tahap yaitu denaturasi, annealing, elongasi. Proses amplifikasi dilakukan sebanyak 30 siklus yang dimulai dari tahap pertama yaitu denaturasi yang terlebih dahulu diaktivasi pada suhu  $95^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit. Tahap denaturasi ialah pemisahan untai ganda menjadi untai tunggal. Suhu  $95^{\circ}\text{C}$  akan memutus ikatan hidrogen antara basa yang saling berkomplementer. Semakin tinggi suhu yang digunakan akan menyebabkan aktivitas enzim berkurang (Yusriah dan Kuswytasari 2013). Kemudian, tahap annealing yaitu proses penempelan primer (oligonukleotida yang terdiri dari 18 hingga 25 basa). Proses penempelan primer pada DNA target terjadi di suhu  $60^{\circ}\text{C}$ . Basa nitrogen primer akan berpasangan dengan basa nitrogen pada untai DNA dan probe akan menempel pada DNA target. Primer dan probe akan membentuk ikatan hidrogen dengan untai DNA (Sulistyaningsih 2007). Lalu, dilanjutkan dengan tahap elongasi yaitu proses pemanjangan yang dilakukan oleh enzim polimerase. Enzim polimerase berfungsi untuk melekatkan dNTP pada template menjadi untai DNA pada tahap annealing dalam polimerisasi DNA.

Secara kuantitatif, Real-time PCR memiliki dua metode yang cukup populer yaitu Taq-man dan SYBR Green. Secara umum, jika kita bekerja dengan SYBR-Green maka biaya yang dikeluarkan relatif kecil dan lebih mudah penggunaannya dibanding Taq-man karena tidak membutuhkan probe dan proses sintesis. Keunggulan dari metode Taq-man sendiri adalah karena desainnya yang unik dan khusus, maka data yang dihasilkan akan kecil kemungkinan mengalami kegagalan proses pembacaan. Sedangkan dalam metode SYBR-Green kemungkinan hasil positif palsu akan muncul karena adanya produk yang tidak spesifik. Hasil positif palsu ini akan menurunkan performa hasil dari pengujian (Tajadini et al. 2014). Teknik SYBR-Green berdasarkan pada ikatan fluorosens dengan dsDNA (double stranded deoxyribonucleic acid), sedangkan pada Taq-man berdasarkan pada label ganda oligonukleotida dan aktivitas eksonuklease dari enzim Taq polymerase (Tajadini et al. 2014).



**Gambar 3.** Perbedaan SYBR-Green dan Taqman probe (thermofisher.com)

Elemen lainnya yang penting adalah primer. Primer merupakan oligonukleotida pendek rantai tunggal yang akan berkomplemen dengan DNA template yang nantinya akan diperpanjang. Proses PCR tentu membutuhkan primer yang sesuai dengan urutan nukleotida awal dan akhir DNA target, pada proses identifikasi spesies pakan MBM ini primer yang digunakan merupakan design primer yang disiapkan sendiri sebelumnya. Urutan primernya adalah sebagai berikut: Forward primer: 5'-CAATAACTCAACGAATTTGTC-3' dan Reverse primer: 5'-CGTGATCTAATGGTAAGGAATA-3'. Metode RT-PCR mampu melakukan amplifikasi walaupun hanya dengan lima fragmen primer DNA saja.

Proses identifikasi spesies ini

menggunakan komponen dari kit Surefood® Animal ID Pork Sens Plus (100 React.), dimana kit ini dilengkapi dengan dua emisi fluoresensi, yaitu masing-masing pada 510 nm dan 580 nm dengan pembacaan pada instrumen Qiagen Rotor Gene Q.6, Malaysia. Produk ini ditujukan untuk identifikasi kontaminasi silang (seperti: babi, sapi, dan unggas) yang tak terhindarkan ketika proses produksi dilakukan secara bersamaan atau bahkan penambahan secara sengaja oleh oknum nakal. Secara internasional sendiri, tidak ada deklarasi mengenai ketentuan ambang batas maksimal kandungan babi pada suatu produk pakan. Namun, di beberapa bagian di Eropa telah ditetapkan bahwa batas ambang kandungan babi pada suatu produk pakan adalah 0.5% hingga 1%. Begitu pula di negara Indonesia, menurut Peraturan Menteri Pertanian No 23 Tahun 2015 Pasal 11f menyatakan bahwa : “Unit Usaha Negara tidak mengolah Bahan Pakan Asal Hewan yang berasal dari babi, bangkai, dan satwa liar”.

Dari sepuluh sampel MBM yang diujikan, lima diantaranya positif mengandung sampel babi. Secara umum, pakan MBM yang ada di Indonesia berasal dari Amerika, Australia serta India. Karena produk ternak utama pada Negara tersebut merupakan sapi dan babi, maka kemungkinan produk tersebut mengandung babi meningkat. Pasar dari MBM lebih tinggi dibanding dengan tepung tulang ikan yang harganya relatif lebih mahal. Tepung tulang ikan sebenarnya lebih kaya akan protein, maka dari itu untuk menggantikan sumber protein pada MBM dilakukan pencampuran berbagai bahan lainnya seperti babi. Taq-man probe memiliki kelebihan tersendiri yaitu memiliki internal control untuk second confirmation dan SYBR-Green dengan konfirmasi ulang melalui melting curve. Analisis melting curve pada SYBR-Green secara luas digunakan untuk menentukan produk non-spesifik yang terbentuk saat proses amplifikasi (Cao dan Shockey 2012). Lima sampel diantaranya memiliki peak yang sama dengan positive control yaitu dengan kisaran suhu 81-83°C. Dan lima lainnya sama dengan negative control.

Kedua metode memiliki hasil yang sama dengan menunjukkan sampel MBM 1, MBM 2, MBM 3, MBM 4, dan MBM 5 memiliki hasil yang positif. Namun, yang menjadi perbedaan nilai pembacaan pada Ct. Hal ini menunjukkan kedua pengujian qPCR dapat dipakai untuk analisis identifikasi DNA pada pakan. Sehingga kedua metode bisa dipakai bersamaan untuk konfirmasi ulang saat pengujian. Tetapi, Taq-man qPCR lebih sensitif dibandingkan dengan SYBR-Green qPCR yang menjadikan metode Taq-man lebih disarankan (Cao dan Shockey 2012).

## KESIMPULAN

Pengujian menggunakan SYBR-Green dan Taq-man terbukti menunjukkan hasil yang sama. Sehingga kedua metode dapat digunakan untuk perbandingan atau konfirmasi ulang identifikasi spesies. Hasil identifikasi spesies babi pada sampel pakan MBM menyatakan lima dari sepuluh sampel positif mengandung babi. Hal ini terlihat kurva yang dihasilkan, terjadi kemiripan bentuk kurva sampel MBM 1-5 dengan PC. Dengan adanya kandungan babi pada beberapa sampel pakan MBM, maka pengendalian peredaran pakan ini harus diperketat agar konsumen yang beragama Islam bisa berhati-hati dalam menangani produk pakan ini.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Merga D, Raff M, Roberts K, Walter P. 2015. *Molecular Biology of The Cell 6<sup>th</sup> ed.* New York (US): Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
2. Amri K dan Khairuman. 2003. *Membuat Pakan Ikan Konsumsi.* Tangerang(ID): Agromedia Pustaka.
3. Ardiana DW. 2009. Teknik isolasi DNA genom tanaman pepaya dan jeruk dengan menggunakan modifikasi buffer CTAB. *Buletin Teknik Pertanian.* 14(1): 12-16.
4. Arifin M. 2014. Analisa dan perancangan sistem informasi praktek kerja lapangan pada instansi/perusahaan. *Jurnal Simetris.* 5(1): 49-56.
5. BioRad. 2012. *Protocols: Nucleic Acid Electrophoresis.* California (US): BioRad Laboratories, Inc.
6. Cao H, Shockey JM. 2012. Comparison of Taqman and SYBR-Green qPCR methods for quantitative gene expression in Tung Tree tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 60(1): 12296-12303.
7. Chacon DC, Griffiths LR. 2014. Methods for extracting genomics DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine.* 2(1): 1-9.
8. Chatterjea MN, Rana S. 2012. *Textbook of Medical Biochemistry 8<sup>th</sup> Ed.* New Delhi(IN): Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd.
9. Che ManYB, Aida AA, Raha AR, Son R. 2007. Identification of Pork Derivates in Food Products by SpeciesSpecific Polymerase Chain Reaction (PCR) For Halal Verification. *Journal of Food Control.* 18(1) : 885-889.
10. Dharmawan B. 2010. *Usaha Pembuatan Pakan Ikan Konsumsi.* Yogyakarta(ID): Pustaka Baru

- Press.
11. Dorak MT. 2006. *Real-time PCR*. New Castle (UK): Taylor & Francis Group.
  12. Faatih M. 2009. Isolasi dan digesti DNA kromosom. *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*. 10(1): 61-67.
  13. Fatmawati DA, Wirajana N, Yowani SC. 2015. Perbandingan DNA dengan menggunakan metode boom original dan boom modifikasi pada isolat *Mycobacterium tuberculosis* 151. *Jurnal Kimia*. 9(1): 41-45.
  14. Fraga D, Meulia T, Fenster S. 2008. Real-time PCR. *Current Protocols*. doi.org/10.1002/2019/9780470089941.et1003s00.
  15. Halver JE. 1989. *Fish Nutrition*. California(US) : Academic Press, Inc.
  16. Hui YH. 2011. *Handbook of Food Science Technology and Engineering Third Edition*. China (CN): Crc Pr I LLC.
  17. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White JT. 1990. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego (US): Academic Press Inc.
  18. Lovell T. 1989. *Nutrition and Feeding of Fish. An A VI Book*. New York(US): Van Nostrand Reinhold.
  19. Morihito RVSA, Chungdinata SE, Nazareth TA, Pulukadang MI, Makaley RAM, Pinontoan B. 2017. Identifikasi perubahan struktur DNA terhadap pembentukan sel kanker menggunakan dekomposisi graf. *Jurnal Ilmiah Sains*. 17(2): 153-160.
  20. National Research Council (NRC). 1993. *Nutrient Requirement of Warm Water Fishes and Shelfish*. Washington DC(US): Nutritional Academy of Sciences.
  21. Nugroho K, Terryana RT, Lestari P. 2017. Metode ekstraksi DNA cabai (*Capsicum annuum* L.) menggunakan modifikasi buffer CTAB (*Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide*) tanpa nitrogen cair. *Scripta Biologica*. 4(2): 91-94.
  22. Reece RJ. 2004. *Analysis of Genes and Genomes*. Inggris (EN): Jhon Wiley and Sons Lid.
  23. Rodriguez D, Lazaro. 2013. *Real-time PCR in Food Science Current Technology and Applications*. Spanyol (ES): Caister Academia Press.
  24. Scott ML, Nesheim MC, Young RJ. 1982. *Nutrition of The Chicken 3<sup>rd</sup> Ed*. New York(US): ML Scott and Associates Ithaca.
  25. Shipley GL. 2006. An introduction to realtime PCR, dalam Dorak MT (Ed) *Real-Time PCR*. New Castle (UK): Taylor & Francis Group.
  26. Sue MJ, Yeap SK, Omar AR, Tan SW. 2014. Application of PCR-ELISA in molecular diagnosis. *Journal of Biomed Research International*. doi.org/10.1155/2014/653014.
  27. Sulistyaningsih E. 2007. *Polymerase Chain Reaction (PCR): era baru diagnosis dan manajemen penyakit infeksi*. *Biomedis*. 1(1): 17-25.
  28. Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard SH. 2014. Comparison of SYBR-Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Advanced Biomedical Research*. doi:10.4103/2277-9175.127998.
  29. Tan SC, Yiap BC. 2009. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. doi:10.1155/2009/574398.
  30. Wahyuni S, Maryam S, Aminah. 2019. Validasi metode analisis cemaran DNA babi pada bakso sapi menggunakan primer mitokondria D-Loop22 dengan metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. *Jurnal Farmasi Galenika*. 5(1): 65-72.
  31. Yusriah Y, Kuswyasari ND. 2013. Pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas protease *Penicillium* sp. *Jurnal Sains dan Seni ITS*. 2(1): 48-50.
  32. Yusuf ZK. 2010. *Polymerase chain reaction*. *Jurnal Saintek*. 5(6): 1-6.

## **Validasi Metode Analisis Multiresidu Pestisida Organoklorin dalam Daging Sapi Dengan Ekstraksi Quechers Menggunakan Kromatografi Gas-Detektor Penangkap Elektron**

**Aulia Yulanda<sup>1</sup>, Fitri Amalia<sup>2\*</sup>, Fevi Yani<sup>2</sup>, Woro Dyah P.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Studi Kimia Universitas Lampung

<sup>2</sup>Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

\*email korespondensi : fitriamalia@pertanian.go.id

### **ABSTRACT**

*Validation of multiresidual analysis method of organochlorine pesticide in meat have been by QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) technique extraction used Chromatography Gas-Electron Capture Detector (GC-ECD). This research objective are to keep meat safety and also give valid result for every multiresidual organochlorine pesticide. The validation parameter analysis method that used in this research are linearity, accuracy, precision (repeatability and reproducibility), LoD, LoQ, and ruggedness. Results shown good value to lindan, heptaklor, and aldrin in determination coefficient value ( $R^2$ ) are 0.9957; 0.9964; and 0.9972. LoD value are 0.03  $\mu\text{g/L}$ , 0.03  $\mu\text{g/L}$ , and 0.01  $\mu\text{g/L}$ . The value of LoQ are 0.09  $\mu\text{g/L}$ , 0.09  $\mu\text{g/L}$ , and 0.05  $\mu\text{g/L}$ . Value of %RSD <  $\frac{1}{2}$  CV Horwitz for repeatability and value %RSD <  $\frac{2}{3}$  CV Horwitz which mean the value is already fulfill the requirement to accepted in precision category. Accuracy range from the analysis of lindan 95.44 – 115.34%, heptachlor 80.20-101.37%, and aldrin 66.76-78.29%, and the ruggedness test already fulfill the requirement that  $T_{\text{result}} > T_{\text{table}}$ . It can be concluded that this method already valid and can be used continuously in laboratory.*

**Key words :** Validation, Organochlorine, QuEChERS

### **PENDAHULUAN**

Pestisida organoklorin merupakan pestisida yang efektif dan efisien untuk mengendalikan, mencegah, dan memberantas hama sehingga dapat meningkatkan produksi pada sektor pertanian dalam waktu singkat (Murphy, *et al.*, 2002). Akan tetapi, pestisida organoklorin memiliki kelarutan yang sangat tinggi dalam lemak, kemampuan degradasi yang rendah, beracun, serta termasuk dalam kategori *Persisten Organic Pollutants* (POPs) yang berarti dapat bertahan selama bertahun-tahun dan mengalami akumulasi (residu) (Rusdita, dkk., 2016; Timothy dan Brian, 2004).

Penelitian Cahyaningrum, dkk. (2018) membuktikan sifat POPs dan akumulasi pestisida organoklorin dengan menemukan adanya residu pestisida pp-DDE (>0,01  $\mu\text{g/mL}$ ) dan dieldrin (<0,01  $\mu\text{g/mL}$ ) dalam ASI (Air Susu Ibu). Penelitian Indiraningsih dan Yulvian (2006) menyatakan bahwa pestisida organoklorin dapat masuk ke dalam tubuh manusia salah satunya melalui daging sapi. Hal ini mungkin terjadi karena terkontaminasi residu pestisida

organoklorin pada pakan jadi (13,8 ppb) dan hijauan (35,5 ppb). Kontaminasi pakan tidak hanya disebabkan oleh penyemprotan tetapi dapat juga disebabkan oleh penggunaan pestisida dimasa lalu yang tidak sesuai dengan aturan sehingga meningkatkan konsentrasi bahan aktif sebesar 0,4-0,5% kemudian organoklorin akan mengalami akumulasi, resisten, dan sulit terurai dalam tanah yang menyebabkan cemaran residu pestisida berikutnya pada tumbuhan yang tumbuh di area kontaminasi (Kuspartoyo, 1991).

Dampak negatif dari cemaran residu pestisida organoklorin pada daging sapi yaitu dapat membahayakan kesehatan manusia. Pestisida organoklorin tercatat sebagai penyebab dari 20.000 kasus meninggal dunia setiap tahunnya dan 5.000-10.000 pekerja mengalami dampak lainnya seperti penurunan daya tahan tubuh, fungsi hati, paru-paru serta organ reproduksi, gangguan sistem endokrin, penurunan perkembangan mental dan motorik, gangguan sistem syaraf, dan kanker (Ohorella, dkk., 2014), sehingga pengawasan pada mutu daging sapi perlu dilakukan untuk



menciptakan daging sapi yang ASUH (Aman, Sehat, Utuh, dan Halal) serta berdaya saing agar tidak menghambat proses perdagangan sesuai dengan UU RI Nomor 18 tahun 2012 tentang Pangan.

Pengawasan dapat dilakukan dengan analisis melalui metode QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*) yaitu teknik ekstraksi yang sesuai untuk preparasi sampel residu pestisida (Anastassiades, dkk., 2003). Keunggulan dalam teknik ini berupa kemudahan dan kecepatan pada proses ekstraksi dengan sedikit tahapan analisis dan efektif pada proses *clean-up* (Zhang, *et al.*, 2015; Biziuk dan Stocka, 2015). Analisis residu pestisida menggunakan GC-ECD karena lebih efektif, pelarut yang digunakan lebih sedikit, dan murah dibandingkan HPLC (Skoog, 1997) serta dilengkapi dengan detektor penangkap elektron (ECD) yang sangat selektif, dapat menghasilkan resolusi puncak kromatogram yang baik, dan cepat untuk mendeteksi keberadaan residu pestisida organoklorin (Pakvilai, *et al.*, 2015).

Kehandalan dan kebenaran dalam metode analisis pengujian perlu dilakukan apabila telah ditemukan metode yang sesuai untuk analisis multiresidu pestisida organoklorin dalam daging sapi. Metode analisis yang akan digunakan di laboratorium terakreditasi harus melakukan validasi metode terlebih dahulu (KAN, 2005). Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan validasi metode analisis multiresidu pestisida organoklorin dalam daging sapi dengan ekstraksi QuEChERS menggunakan kromatografi gas-detektor penangkap elektron untuk mengkonfirmasi kebenaran dan keandalan metode melalui pengujian dan pengadaan bukti yang objektif sehingga dapat digunakan secara rutin di laboratorium untuk menjaga keamanan pangan Indonesia.

## MATERI DAN METODE

### Materi

#### Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah timbangan analitik (Adventures Ohaus), pipet volumetrik 6 mL (Pyrex Grade A), *micropipette* 1.000  $\mu$ L (Eppendorf), *bulb* (penyedot cairan), *microtube*, satu set kromatografi gas (GC-Agilent Technologies 7890 A) dengan detektor ECD, tabung sentrifus plastik 10 mL, tabung sentrifugasi plastik 50 mL, gelas kimia 1.000 mL

(Pyrex), *homogenizer mixer* (Vortexer), tabung vial (Agilent Technologies 8-425), *ceramic homogenizer* (Agilent Technologies) 2 dan 3 cm, rak tabung sentrifus, gunting, pinset, labu evaporasi 50 mL (Pyrex), *vacuum rotary evaporator* (Heildolph), *meat grinder* dan sentrifus (Eppendorf 5810 R).

**Bahan.** Bahan yang digunakan adalah sampel daging sapi, magnesium sulfat anhidrat, natrium asetat, asetonitril, C18 *endcapped*, PSA (*Primary Secondary Amines*), aseton, asam asetat glasial, dan baku standar pestisida organoklorin (lindan, heptaklor, dan aldrin).

#### Kondisi Alat Kromatografi Gas

Kondisi alat kromatografi gas yang digunakan untuk analisis multiresidu pestisida yaitu menggunakan kolom Agilent HP-5 (5% *Phenyl Methyl Polysiloxan*) 30 m x 320  $\mu$ m x 0,25  $\mu$ m, suhu inlet 100 °C (1,4 menit), suhu oven ; Suhu-1, 110°C (0,5 menit); Suhu-2, 130°C (1 menit, laju 10 °C/menit), Suhu-3, 150°C (2 menit, laju 15 °C/menit), Suhu-4 180 °C (13 menit, 20 °C/menit), Suhu-5 250 °C (1 menit, 20°C/menit), Suhu-6 280 °C (0 menit, 20°C/menit). Suhu injector 110°C, splitless, dengan volume injeksi 1  $\mu$ L, detector uECD, 300°C, dan menggunakan gas pembawa Helium, 25 psi, 5,4 mL/min.

#### Prosedur

Ekstraksi sampel daging sapi dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi QuEChERS. Ekstraksi ini menggunakan 15 gram daging sapi yang sudah dihaluskan, dimasukkan ke dalam tabung sentrifus 50 mL kemudian ditambahkan 15 mL asetonitril yang mengandung 1% asam asetat dan garam QuEChERS (6 gram  $\text{MgSO}_4$  dan 1,5 gram  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) lalu ditambahkan *ceramic homogenizer* untuk mempermudah proses pencampuran. Parameter dalam memvalidasi metode seperti akurasi, presisi, LoD, LoQ dan ketangguhan metode membutuhkan teknik *spiking* pada tahap ini sampel ditambahkan larutan standar sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan (*spike sample*), sementara untuk mengetahui apakah sampel mengandung pestisida yang akan diujikan atau tidak maka diperlukan adanya *blank sampel*. *Blank sampel* tidak perlu ditambahkan larutan standar (*spiking*). Sampel kemudian dikocok selama 1 menit untuk menghomogenkan seluruh bagian bahan dilanjutkan dengan pengocokan menggunakan *vortexer* selama 5 menit.

Ekstraksi dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 13 menit, pada suhu 14°C, dan kecepatan 4000 rpm, lalu pindahkan 6 mL supernatan ke dalam tabung sentrifus 15 mL yang telah terisi *ceramic homogenizer* dan *dSPE* (1,2 gram MgSO<sub>4</sub>, 0,4 gram C18 Endcapped, dan 0,4 gram PSA), kocok tabung selama 1 menit dilanjutkan dengan *vortexer* selama 2 menit kemudian dibiarkan selama 1 menit. Sentrifugasi selama 10 menit, pada suhu 14°C, dan kecepatan 4000 rpm. Apabila supernatan dan endapan telah terpisah, pindahkan 1 mL supernatan ke dalam labu evaporasi kemudian uapkan sampel dengan *vacuum rotary evaporator* (hindari penguapan dengan panas) sampai kering. Sampel yang sudah kering kemudian ditambahkan 1 mL aseton dan pindahkan ke dalam tabung vial 1,5 mL agar dapat diinjeksikan pada kromatografi gas (AOAC, 2007).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Linearitas

Konsentrasi standar pestisida yang digunakan untuk uji linearitas pada standar pestisida Lindan, Heptaklor, dan Aldrin dalam penelitian secara berturut-turut adalah: 0,063; 0,125; 0,25; 0,5; dan 1 µg/mL, sehingga didapatkan nilai R<sup>2</sup>. Metode dikatakan valid ketika nilai R<sup>2</sup> ≥ 0,99 seperti pada **Tabel 1** (Huber, 2007; AOAC, 2012).

**Tabel 1.** Data hasil uji linearitas

No	Nama Pestisida	M <sub>teori</sub> (µg/mL)	M <sub>percobaan</sub> (µg/mL)	Persamaan Regresi Linear	R <sup>2</sup>
1	Lindan	0,06	0,052	$y = 1,068x - 0,0427$	0,9957
		25	6		
		0,12	0,096		
		50	4		
		0,25	0,207		
		00	0		
2	Heptaklor	0,50	0,455	$y = 1,0607x - 0,0401$	0,9964
		00	0		
		1,00	1,045		
		00	4		
		0,06	0,052		
		25	2		
3	Aldrin	0,12	0,097	$y = 1,0522x - 0,0361$	0,9972
		50	6		
		0,25	0,209		
		00	4		
		0,50	0,457		
		00	2		
		1,00	1,038		
		00	8		
		0,06	0,052		
		25	6		
		0,12	0,099		
		50	6		
		0,25	0,212		
		00	9		
		0,50	0,461		
		00	5		
		1,00	1,031		
		00	9		

Standar pestisida organoklorin yang diujikan seluruhnya memiliki nilai R<sup>2</sup> ≥ 0,99 yang menunjukkan adanya hubungan yang linear antara konsentrasi seharusnya (teori) dengan konsentrasi hasil percobaan maka berdasarkan uraian tersebut dapat dikatakan seluruh standar pestisida yang diujikan pada penelitian ini linear dan memiliki kualitas yang baik (*valid*).

### Akurasi

Pengujian akurasi dilakukan untuk menunjukan kedekatan antara hasil analisis dengan nilai yang sebenarnya, pada penelitian ini telah dilakukan pengujian sampel pada *spiking* rendah (0,05 µg/mL), sedang (0,25 µg/mL), dan tinggi (1 µg/mL). Nilai *recovery*, dapat dihitung dengan rumus :

$$\% Recovery = \frac{C_s - C_c}{S} \times 100\% \quad (1)$$

Keterangan :

C<sub>s</sub> : Hasil akhir *spike* (µg/kg)

C<sub>c</sub> : Hasil akhir sampel atau contoh (µg/kg)

S : Konsentrasi baku standar yang ditambahkan (µg/kg). Apabila hasil % *recovery* untuk analisis multiresidu pestisida ini berada pada *range* 60-140% maka akurasinya dapat diterima (SANCO, 2011).

**Tabel 2.** Data hasil analisis akurasi

No.	Nama Pestisida	Spike (µg/mL)	% Recovery	Rentang recovery
1.	Lindan	0,05	115,34	95,44- 115,34%
		0,25	96,13	
		1,00	95,44	
2.	Heptaklor	0,05	80,20	80,20- 101,37%
		0,25	107,64	
		1,00	101,37	
3.	Aldrin	0,05	78,29	66,76- 78,29%
		0,25	76,52	
		1,00	66,76	

Hasil uji akurasi pada **Tabel 2.** menunjukan nilai *recovery* telah memenuhi standar nilai %*recovery* untuk analisis residu pestisida secara rutin yaitu 60-140% untuk residu pestisida organoklorin (SANCO, 2011) ), serta memberikan hasil yang relatif lebih baik apabila dibandingkan dengan penelitian Dubey, dkk. (2018) yang telah memvalidasi metode ekstraksi QuEChERS untuk organoklorin dan pyrethroid sintetik dalam buah-buahan dan sayur-sayuran menggunakan GC-ECD yang

memiliki nilai *recovery* lindan 63,1%-74,4%, heptaklor 56,3-71,2%, aldrin 70,3-79,6%.

### Presisi

Uji presisi merupakan ukuran 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 (Harmita, 2006). Presisi dilakukan dengan menguji sampel homogen sebanyak 6 (enam) kali ulangan. Uji presisi dilakukan dengan uji *repeatability* yaitu dengan melakukan pengujian dengan teknik *spiking* 1 µg/mL lindan, heptaklor, dan aldrin pada masing-masing sampel dengan kondisi yang sama, yaitu analisis sama, alat, dan laboratorium sama serta waktu pengujian yang hampir bersamaan, kemudian dilanjutkan dengan uji *reproducibility* yaitu pengujian di laboratorium yang sama dengan menggunakan peralatan dan pereaksi yang sama, namun dilakukan oleh analis yang berbeda. Hasil dari uji *repeatability* dapat dilihat pada **Tabel 3** dan **Tabel 4**.

**Tabel 3.** Data hasil uji *repeatability*

Nama Pestisida	Parameter			
	Rata-rata	SD (%)	RSD (%)	½ CV Horwitz
Lindan	0,82	0,07	7,97	8,24
Heptaklor	1,01	0,07	7,17	7,99
Aldrin	0,60	0,05	8,52	8,71

**Tabel 4.** Data hasil uji *reproducibility* (12 Data)

Nama Pestisida	Parameter			
	Rata-rata	SD (%)	RSD (%)	2/3 CV Horwitz
Lindan	0,92	0,09	9,47	10,80
Heptaklor	1,02	0,08	7,86	10,64
Aldrin	0,59	0,06	11,00	11,55

Tabel 3 dan Tabel 4 dapat disimpulkan bahwa metode analisis QuEChERS ditunjukkan dengan Nilai keberterimaan *repeatability* yaitu  $RSD < \frac{1}{2} CV$  Horwitz yang berarti telah memenuhi angka syarat keberterimaan untuk uji keterulangan atau *repeatability* (Gonzales dan Herrador, 2007), dan nilai keberterimaan *reproducibility* ketika  $\%RSD \leq 16\%$  dan nilai  $RSD < \frac{2}{3} CV$  Horwitz.

### LoD

LoD dalam penelitian ini digunakan sebagai penentu jumlah terkecil dari analit yang dapat terdeteksi. konsentrasi *spiking* 0,05 µg/mL

sebanyak 10 (sepuluh) kali ulangan. LoD diperoleh dengan rumus :

$$LoD = 3 SD$$

(2)

Keterangan, SD : Standar Deviasi.

**Tabel 5.** Data hasil analisis LoD

Nama Pestisida	Parameter		
	BMR (µg/mL)	LoD (µg/mL)	Keberterimaan*
Lindan	2,00	0,03	√
Heptaklor	0,20	0,03	√
Aldrin	0,20	0,01	√

\*) √ menandakan bahwa nilai LoD telah memenuhi syarat keberterimaan.

Apabila dibandingkan dengan penelitian Lestari, dkk. (2015) yang telah melakukan analisis multiresidu pestisida organoklorin pada daging sapi menggunakan GC-MS, LoD yang diperoleh lindan yaitu 0,048 µg/ml, heptaklor 0,060 µg/ml, aldrin 0,027 µg/ml. Data tersebut menunjukkan bahwa LoD dalam penelitian ini cukup baik dengan nilai LoD yang lebih kecil dari penelitian yang telah dilakukan oleh Lestari, dkk.

### LoQ

LoQ dalam penelitian ini bertujuan untuk mengetahui batas konsentrasi analit terendah yang dapat diterapkan secara kuantitatif dengan tingkat akurasi dan presisi yang dapat diterima ketika metode QuEChERS diaplikasikan (Vera, 2011). LoQ diperoleh dari 10 (sepuluh) kali SD dengan konsentrasi analit 0,05 µg/mL. LoQ diperoleh dengan rumus :

$$LoQ = 10 SD$$

(3)

Keterangan, SD : Standar Deviasi.

**Tabel 6.** Data hasil analisis LoQ.

Nama Pestisida	LoQ (µg/mL)
Lindan	0,09
Heptaklor	0,09
Aldrin	0,05

### Uji Ketangguhan Metode (*Ruggedness*)

Uji *ruggedness* bertujuan untuk melihat ketangguhan metode dengan mengubah perlakuan pada saat ekstraksi. Pada penelitian ini, perlakuan yang diubah adalah proses pengocokan pada tahan *clean up* dengan menggunakan alat *homogenizer mixer*. Nilai *ruggedness* diperoleh dari uji T dengan hipotesis sebagai berikut :

Ho : nilai sampel untuk bahan yang tidak dikocok akan sama dengan nilai bahan yang tidak dikocok  
Ha : nilai sampel untuk bahan yang tidak dikocok tidak sama dengan nilai bahan yang tidak dikocok  
Nilai Ho diterima apabila  $T_{\text{tabel}} > T_{\text{hitung}}$ .

Berdasarkan data dari **Tabel 7** maka lindan, heptaklor, dan aldrin menyatakan bahwa Ho diterima yang berarti data yang dihasilkan tidak memiliki perbedaan yang berarti (tidak berbeda nyata), atau dapat dikatakan metode ini telah memenuhi kriteria ketangguhan dalam suatu metode.

**Tabel 7.** Data analisis uji ketangguhan metode (*ruggedness*)

Nama Pestisida	Parameter		Keterangan
	$T_{\text{tabel}}$	$T_{\text{hitung}}$	
Lindan	1,78	0,61	Tidak Berbeda Nyata
Heptaklor	1,78	-0,82	Tidak Berbeda Nyata
Aldrin	1,78	-7,88	Tidak Berbeda Nyata

## KESIMPULAN

Validasi analisis multiresidu pestisida telah memenuhi angka keberterimaan linearitas yaitu lindan sebesar 0,9957; heptaklor sebesar 0,9964; dan aldrin sebesar 0,9972. Rentang %*recovery* dari analisa pada lindan 95,44-115,34%, heptaklor 80,20-101,37%, aldrin 66,76-78,29% memenuhi rentang keberterimaan yang disyaratkan yaitu 60-140%. Metode analisis multiresidu pada penelitian ini telah memenuhi angka keberterimaan presisi (*repeatability* dan *reproducibility*) yaitu memiliki nilai %RSD < 16% dan  $< \frac{1}{2}$  CV Horwitz untuk *repeatability* dan  $< \frac{2}{3}$  CV Horwitz untuk *reproducibility*. Limit deteksi (LoD) yang diperoleh dari penelitian ini yaitu lindan 0,03 µg/mL; heptaklor 0,03 µg/mL; aldrin dan 0,01 µg/mL. Limit kuantisasi (LoQ) pada penelitian ini yaitu lindan 0,09 µg/mL; heptaklor 0,09 µg/mL; dan aldrin 0,05 µg/mL. Lindan, aldrin, dan heptaklor memenuhi syarat dalam uji

ketangguhan metode yaitu memiliki nilai  $T_{\text{tabel}} > T_{\text{hitung}}$ .

## DAFTAR PUSTAKA

1. AOAC Official Method 2007.01. *Pesticide Residue in Food by Acetonitril Extraction and Partitioning With Magnesium Sulfate*. Washington DC.
2. AOAC. 2012. *Official Methods of Analysis of The Association Agricultural Chemists 10<sup>th</sup> Ed.* Washington DC.
3. Biziuk, M. dan Stocka. J. 2015. Multiresidue Methods for Determination of Currently Used Pesticides in Fruit and Vegetables using QuEChERS Technique. *International Journal of Environment Science and Development* 6 (1) : 18-22.
4. Cahyaningrum, D., Hanifa. M. D., dan Muhammad, S. A. 2018. Kandungan Pestisida Organoklorin dalam Air Susu Ibu di Daerah Pertanian Bawang Merah Kabupaten Brebes. *Jurnal Promosi Kesehatan Indonesia*. 13 (1) : 32-45.
5. Dubey, J. K., Patyal, S. K., dan Ajay, S. 2018. Validation of QuEChERS Analytical Technique for Organochlorines and Synthetic Pyrethroids in Fruits And Vegetables using GC-ECD. *Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018*. India.
6. González, A. G. dan M. ángeles Herrador. 2007. A Practical Guide to Analytical Method Validation, Including Measurement Uncertainty and Accuracy Profiles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 26(3): 227-238.
7. Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 1(3) : 117-135.
8. Huber, L. 2007. Validation of Analytical Methods: Validation and Qualification in Analytical Laboratories. 2nd Edition. *Informa Healthcare*. New York.
9. Indiraningsih dan Yulvian, S. 2006. Residu Pestisida dalam Jaringan Otak Sapi Perah di Lembang. Jawa Barat. *JITV*. 11 (1) : 76-83.
10. KAN (Komite Akreditasi Nasional). 2005. *ISO/IEC 17025 (Versi Bahasa Indonesia) Tentang Persyaratan Umum Kompetensi Laboratorium Pengujian dan Laboratorium Kalibrasi, Edisi Kedua*. Diterjemahkan oleh Komite Akreditasi Nasional.

11. Lestari, S., Sugeng, Z., dan Arrum, P. M. 2015. Validasi Metode QuEChERS untuk Menganalisis Residu Pestisida Organoklorin dalam Daging Sapi Menggunakan Alat Gas Chromatography-Mass Spectrophotometer (GCMS). *Buletin Laboratorium Veteriner*. 15(3):16-24.
12. Murphy, H. H., Phung Hoan. N., Matteson. P., dan Morales, A. A. L.C. 2002. Farmer's self-surveillance of pesticide poisoning: A 12-month pilot in Northern Vietnam. *International Journal of Occupational and Environmental Health*. 8.(3) : 201-211.
13. Ohorella, A., Anwar, D., dan Anwar. 2014. *Identifikasi Residu Pestisida Golongan Organoklorin Bahan Aktif Lindan pada Wortel di Pasar Tradisional (Pasar Terong) dan Pasar Modern (Swalayan Ramayana M'Tos) Kota Makasar Tahun 2013*. FKM Universitas Hasanudin. Makasar.
14. Pakvilai, N., Prapomontol. T., Thavornyutikarn. P., Mangklabruks. A., Chantara. C., Hongsibsong. S, dan Santasup. C. 2015. A Simple and Sensitive GC-ECD Method for Detecting Synthetic Pyrethroid Insecticide Residues in Vegetable and Fruit Samples. *Chiang Mai Journal of Science*. 2(1) : 196-207.
15. Rusdita, Q. W. S., Aulia, Heru, S. K., dan Dwi, A. 2016. Hubungan Higiene Perorangan dan Cara Penyemprotan Pestisida dengan Tingkat Keracunan Pestisida pada Petani di Desa Kembang Kuning Kecamatan Cepogo. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
16. SANCO. 2011. *Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residue Analysis in Food and Feed*. Document N°SANCO/12495/2011.
17. Skoog, D. A. 1997. *Fundamental of Analytical Chemistry Eight Edition*. Brooks/Cole. Kanada.
18. Timothy, C. M. dan Brian, B. 2004. *Pesticide Toxicology and International Regulation*. Wiley. USA.
19. Undang-Undang Republik Indonesia (UU RI) Nomor 18 tahun 2012 tentang Pangan.
20. Vera. 2011. Analisis Logam Timbal (Pb), Timah (Sn) dan Kadmium (Cd) dalam Buah Lengkeng Kemasan Kaleng secara Spektrofotometri Serapan Atom. *Skripsi*. Universitas Indonesia. Depok. Indonesia.
21. Wilkowska, A. dan Biziuk, M. 2011. Determination of Pesticide Residues In Food Matrices using The QuEChERS Methodology. *Food Chemistry*. 125:803-812.

## **Teknik *Real Time Polymerase Chain Reaction* (PCR) metode *Tagman Probe* untuk Deteksi DNA Babi pada Sampel Gelatin**

Puji Rahayu<sup>1\*</sup>, Yohanna Amalia<sup>2</sup>, Hanif Anisatun<sup>1</sup>, Diyan Cahyaningsari<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

<sup>2</sup>Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor

\*Email korespondensi penulis: pujirahayu@pertanian.go.id

### **ABSTRACT**

*Gelatine is a food that can be obtained from raw materials for mammals such as pig skin, cow skin, beef bone, and fishery products. The presence of pork content especially in food products is a problem due to the presence of Muslim consumers who are not allowed to consume pork and derivatives based on halal law. The purpose of this test is to detect the presence of pork genomes in gelatin samples using a Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) tool with a Taqman probe. The principle of real-time PCR is the detection of amplicons formed by measuring the increase in fluorescent signals when bound to a double DNA strand. The resulting fluorescence will be proportional to the amount of new DNA formed. All samples showed negative results with no C<sub>t</sub> or curves appearing.*

**Key words:** *Gelatine, pork, DNA, Detection, real-time PCR*

### **PENDAHULUAN**

Gelatin merupakan protein yang berasal dari hidrolisis kolagen jaringan ikat dan tulang dengan perlakuan asam dan basa. Gelatin memiliki sifat sebagai gelling agent, thickening agent, zat penstabil, dan emulsifier. Oleh karena itu, gelatin banyak digunakan dalam produk makanan seperti marshmellow, permen gummy, daging olahan, dan es krim. Selain itu, gelatin juga digunakan dalam industri farmasi sebagai bahan untuk membuat kapsul keras dan kapsul lunak, tablet, salep untuk mukosa membran mulut (Hui 2011). Gelatin yang beredar di pasaran sebagian besar didapatkan dari bahan baku mamalia seperti kulit babi dengan persentase 46% dari produksi gelatin dunia, diikuti dengan kulit sapi sebanyak 29.4%, dari tulang sapi sebesar 23.1%, dan dari sumber lain sebesar 1.5% yang berasal dari produk perikanan (Karim dan Bath 2009). Adanya kandungan babi khususnya pada produk pangan menjadi suatu masalah dikarenakan adanya konsumen yang beragama Islam yang tidak diperbolehkan untuk mengkonsumsi babi dan turunannya berdasarkan hukum halal. Suatu metode deteksi diperlukan untuk mengetahui keberadaan gelatin babi pada suatu sampel pangan yang menggunakan gelatin sebagai bahan baku.

Gelatin berasal dari kata “gelatus” yang berarti pekat. Gelatin adalah produk alami yang diperoleh dari hidrolisis parsial kolagen. Gelatin merupakan protein larut yang bisa bersifat sebagai gelling agent (bahan pembuat gel) atau sebagai non gelling agent. Sumber bahan baku gelatin dapat berasal dari sapi (tulang dan kulit jangat), babi

(hanya kulit), dan ikan (kulit). Gelatin merupakan produk alami, maka diklasifikasikan sebagai bahan pangan bukan bahan tambahan pangan (Hafidz 2011). Senyawa gelatin merupakan suatu polimer linier yang tersusun oleh satuan terulang asam amino glisin-prolin-prolin dan glisin-prolin-hidroksiprolin yang bergabung membentuk rangkaian polipeptida (Suryani et al. 2009). Gelatin yang berasal dari prekursor yang diasamkan dan berasal dari kulit babi dikenal dengan gelatin tipe A, sedangkan yang berasal dari prekursor yang dibasakan dan berasal dari kulit sapi dikenal sebagai gelatin tipe B (Farmakope IV 1995).

Gelatin berbentuk serbuk kasar berwarna kuning samar, tidak berbau, dan tidak berasa yang dapat dilihat pada Gambar 2. Tidak larut dalam aseton, kloroform, etanol (95%), eter, dan methanol. Larut dalam gliserin, larutan asam, larutan basa, dan air pada suhu di atas 40 oC. gelatin kering lebih stabil dibandingkan gelatin dalam bentuk larutan dengan penyimpanan lebih lama pada kondisi dingin.

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara in vitro, yang mana setiap fragmen DNA dapat diamplifikasi dengan cepat tanpa menggunakan sel. Metode ini berjalan secara enzimatik melalui mekanisme perubahan suhu. Secara umum, PCR banyak digunakan untuk kegiatan analisis genetika dalam biologi molekuler seperti penentuan gen virus pada percobaan Essaawi et al. (2013). DNA diinkubasi dalam tabung reaksi bersama DNA polimerase khusus, pasokan nukleotida, dan potongan pendek DNA untai tunggal sintetik yang berfungsi sebagai primer (Campbell et al. 2002).



Teknik pengerjaan pada proses PCR membutuhkan DNA untai ganda yang berfungsi sebagai cetakan (templat) yang mengandung DNA-target (yang akan di amplifikasi) untuk pembentukan molekul DNA baru, enzim DNA polimerase, deoksinukleotida trifosfat (dNTP), dan sepasang primer oligonukleotida (Ghaffar 2007).

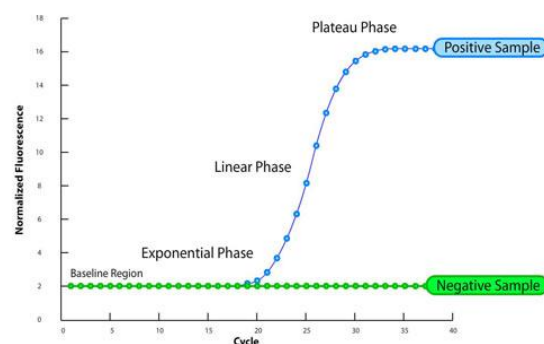
Pada kondisi tertentu, kedua primer saling mengenali dan berikatan dengan untaian DNA komplemennya yang terletak pada awal dan akhir fragmen DNA target, sehingga kedua primer tersebut akan menyediakan gugus hidroksil bebas pada karbon 3'. Setelah kedua primer menempel pada DNA templat, DNA polimerase akan mengkatalisis proses pemanjangan kedua primer dengan menambahkan nukleotida yang komplemen dengan urutan nukleotida templat. DNA polimerase mengkatalisis pembentukan ikatan fosfodiester antara OH pada karbon 3' dengan gugus 5' fosfat dNTP yang ditambahkan. Sehingga proses penambahan dNTP yang dikatalisis oleh enzim DNA polimerase ini berlangsung dengan arah 5' ke 3' dan disebut reaksi polimerisasi. Enzim DNA polimerase hanya akan menambahkan dNTP yang komplemen dengan nukleotida yang terdapat pada rantai DNA templat (Ghaffar 2007). PCR melibatkan banyak siklus yang masing-masing terdiri dari tiga tahap berurutan, yaitu pemisahan (denaturasi) rantai DNA templat pada kisaran suhu 90-98 oC, penempelan (annealing) pasangan primer pada DNA target pada suhu 50-70 oC, dan pemanjangan (extension) primer atau reaksi polimerisasi yang dikatalisis oleh DNA polimerase rentang suhu 70-80 oC. Setiap tahapan reaksi yang terjadi secara berulang-ulang (siklus), masing-masing ulangan akan terjadi proses duplikasi pada setiap DNA yang dihasilkan (Ghaffar 2007).

Metode PCR kemudian berkembang menjadi real-time PCR. Metode ini telah diaplikasikan dalam berbagai aplikasi seperti diagnostik 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 (Fraga et al. 2008). Prinsip real-time PCR yaitu pendeteksian amplikon yang terbentuk dengan mengukur peningkatan sinyal fluoresensi yang berpendar saat terikat dengan untai DNA ganda. Fluoresensi yang dihasilkan akan sebanding dengan jumlah DNA baru yang terbentuk (Reece 2004).

Alat real-time PCR memiliki dua jenis komponen bahan kimia untuk mendeteksi sampel selama siklus PCR yaitu pewarna fluoresensi SYBR green dan probe DNA. Pewarna berfluoresensi menginterkalasi DNA beruntai ganda, sedangkan

probe DNA terdiri dari oligonukleotida yang dihubungkan dengan pewarna fluoresensi dan quencher (peredam pewarna). Proses pendegradasian akan melepaskan pewarna fluoresensi dari komponen yang berfungsi untuk pendegradasi sehingga menghasilkan emisi fluoresensi yang sebanding dengan jumlah templat DNA. Sinyal fluoresensi yang terbentuk diukur dan digunakan untuk kuantitasi DNA (Hui Chai et al. 2011).

Produk hasil duplikasi DNA disebut amplikon. Amplikon akan di deteksi berdasarkan peningkatan fluoresensi yang dihasilkan dari sintesis DNA. Fluoresensi ini dihasilkan ketika terjadi peningkatan ikatan double strand DNA dengan pewarna atau probe fluorogenic pada pencampuran amplifikasi. Peningkatan fluoresensi digambarkan dengan kurva yang terdiri dari 3 buah fasa yaitu fasa awal atau fasa inisiasi yaitu fase terjadi pada siklus pertama PCR dimana pancaran fluoresensi belum dapat dibedakan dari baseline, fasa eksponensial atau fasa puncak merupakan fase peningkatan eksponensial dalam fluoresensi sebelum fase stabil tercapai, dan fase stabil atau fasa plateau yaitu fase saat tidak ada lagi peningkatan fluoresensi (Rodrigues 2013). Berikut Gambar 4 yang merupakan bentuk kurva real-time PCR.



**Gambar 1.** Kurva Proses Amplifikasi

Gambar di atas menunjukkan proses amplifikasi untai DNA, terlihat dari kenaikan kurva yang menandakan adanya amplifikasi DNA (Pratami 2011). Sumbu pada gambar menunjukkan jumlah siklus ke berapa amplifikasi mulai terdeteksi atau biasa disebut cycle threshold (Ct) atau crossing point (Cp) dan sumbu Y yang merupakan absorbansi fluoresensi. Amplifikasi terjadi ketika primer menempel pada DNA target. Sementara itu, garis horizontal merupakan kontrol negatif yang diberi perlakuan sama seperti sampel untuk memastikan jaminan mutu proses pengujian yang berjalan baik. Sifat gelatin tergantung pada sumber dan jenis kolagen, biasanya kolagen diproduksi dari kulit dan tulang sapi, babi, maupun ikan (Wangtueai dan Noomhorm 2009). Cara

pembuatan gelatin secara umum adalah kulit atau tulang hewan yang kaya akan kolagen direndam dalam asam atau basa, kemudian diekstraksi dengan pemanasan bertingkat yang dilakukan menggunakan evaporator atau tangki biasa pada suhu 60, 70, 80, 90, dan 100 oC untuk menghasilkan mutu gelatin yang berbeda-beda. Hasil ekstrak yang mengandung gelatin dibersihkan dari kotoran halus dan mineral dengan cara penyaringan, sentrifugasi, demineralisasi dengan ion exchanger. Filtrat disterilisasi UHT (Ultra High Temperature), dikeringkan, digiling, dikemas, dan siap dipasarkan. MBM yang merupakan bahan campuran dari beberapa limbah ternak ini rawan dioplos dengan bahan-bahan yang beresiko menyebabkan penyakit, kanibalisme dan membutuhkan penanganan khusus. Contohnya produsen pakan yang nakal mencampur pakan dengan babi. Bagi masyarakat muslim tentu pakan dengan kandungan babi akan membutuhkan penanganan khusus seperti penggunaan sarung tangan atau yang lainnya untuk menghindari kontak dengan kandungan babi tersebut. Selain itu, adanya kandungan babi pada produk pakan menjadi suatu masalah dikarenakan adanya konsumen yang beragama Islam yang tidak diperbolehkan untuk mengkonsumsi babi dan turunannya berdasarkan hukum halal. Dilain sisi, jika pakan ini diberikan kepada sesama jenisnya (misal: pakan mengandung babi diberikan kepada babi) maka akan menciptakan sifat kanibalisme. Maka dari itu, diperlukan suatu metode deteksi untuk mengetahui kandungan babi pada suatu sampel pakan.

Beberapa metode yang dapat dilakukan untuk mendeteksi babi pada produk pangan asal hewan, diantaranya uji cepat (rapid test), uji berbasis protein menggunakan Enzim Linked Imuno Assay (ELISA), dan berbasis DNA menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR). Salah satu jenis metode pendeteksian yang paling akurat dalam mendeteksi komponen babi dan turunannya adalah metode berbasis DNA yaitu PCR (Polymerase Chain Reaction). Metode berbasis amplifikasi DNA memiliki sensitifitas dan spesifisitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode lain (Che Man 2007). Pengembangan metoda PCR yang dapat mengkuantifikasi salinan produk amplifikasi DNA dikenal dengan real-time PCR atau quantitative PCR (qPCR). Metode real-time ini memungkinkan analisis dengan persen kemungkinan kontaminan sebesar 1%. Prinsip real-time PCR yaitu pendeteksian ampikon yang terbentuk dengan mengukur peningkatan sinyal fluoresens yang berpendar saat terikat dengan untai DNA ganda. Fluoresens yang dihasilkan akan sebanding dengan jumlah DNA baru yang terbentuk (Reece 2004). Tujuan dari pengujian ini adalah identifikasi DNA babi sebagai kontaminan dalam produk pakan dengan menggunakan Real-

time PCR metode SYBR-Green dan Taqman probe.

## **MATERI DAN METODE**

### **Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan ialah neraca analitik, sudip disposable, thermomixer, minisentrifuse, vortex mixer, rak tube, micro smash, micro smash beads, bleaching agent, mikropipet volume 10-100  $\mu$ L dan 100-1000  $\mu$ L, serta instrument Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) (Rotor Gen-Q).

Bahan-bahan yang digunakan ialah sampel gelatin, komponen KIT ekstraksi dengan merek Mericon Pig KIT meliputi; lysis buffer, ; proteinase K, binding buffer, pre-wash buffer, wash buffer, elusion buffer, serta KIT PCR dengan merek Surefood® Animal ID Pork Sens Plus (100 React.) meliputi, PCR grade H<sub>2</sub>O, received tubes, spin filter, dan etanol 99,8%.

### **Metode**

Sebanyak sepuluh sampel gelatin yang telah dihogankan, kemudian ditimbang seberat 50 mg di dalam tube reaksi. Tambahkan 400  $\mu$ L lysis buffer dan 20  $\mu$ L proteinase K, lalu homogenkan. Selanjutnya sentrifuse menggunakan minicentrifuge highspeed dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Setelah itu, inkubasi dalam thermomixer pada suhu 65 oC selama 30 menit. Sampel yang terlisiskan akan menunjukkan fase bening setelah lisis, fase bening tersebut langsung dipindahkan ke dalam spin filter berwarna hijau. Tempatkan spin filter pada receiver tube berwarna kuning dengan volume 2,0 mL. Kemudian receiver tube dengan spin filter disentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit, lalu cairan supernatan dipindahkan ke dalam spin filter baru dan tambahkan 200  $\mu$ L Binding Buffer kemudian vortex hingga homogen.

Tempatkan spin filter baru pada receiver tube yang baru (2.0 mL berwarna kuning). Selanjutnya, inkubasi sampel pada suhu ruangan selama 1 menit. Kemudian, sentrifuse pada 12.000 rpm selama 2 menit. Buang filtrat dan letakkan kembali spin filter dalam receiver tube. Setelah itu, tambahkan 550  $\mu$ L pre-wash buffer pada spin filter dan sentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Buang filtrat dan tambahkan 550  $\mu$ L wash buffer pada spin filter. Sentrifuse pada 12.000 rpm selama 1 menit dan buang filtratnya. Setelah itu, tambahkan kembali 550  $\mu$ L wash buffer pada spin filter dan sentrifuse kembali pada 12.000 rpm selama 2 menit. Buang filtrat dan sentrifuse kembali pada kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit.

Letakkan spin filter pada receiver tube yang baru (1,5 mL tidak berwarna) dan tambahkan 100  $\mu$ L elution buffer yang sebelumnya sudah dipanaskan. Inkubasi pada suhu ruangan selama 3 menit. Kemudian, sentrifuse selama 2 menit pada 10.000 rpm. DNA yang telah di elusi disimpan pada

suhu -20 oC untuk waktu penyimpanan lebih dari 24 jam. Selanjutnya preparasi PCR-mix dilakukan dengan mengacu pada KIT PCR

	Blockcycler	Rotorcycler
<b>Initial denaturation (HOLD)</b>	5 menit, 95 °C	1 menit, 95 °C
<b>Siklus</b>	30	30
<b>Denaturasi</b>	15 detik, 95 °C	10 detik, 95 °C
<b>Annealing/Extension (CYCLE)</b>	30 detik, 95 °C	15 detik, °C
<b>Temperature Transition Rate/ Ramp Rate</b>	Maksimum	Maksimum
	Detection: End of Extension Phase	
	<u>Detection System pork:</u>	
	Various devices	
	Rotor-Gene Q	
	LightCycler® 2.0*	
	LC480 I	
	LC480 II	
<b>Fluorescence detection setup</b>	<u>Internal</u>	<u>Amplification</u>
	<u>Control:</u>	
	Various devices	
	Rotor-Gene Q	
	LC480 I	
	LC480 II	
	Passive Reference: None	

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Gelatin merupakan salah satu jenis produk olahan pangan asal hewan yang beresiko tinggi untuk di oplos dengan bahan baku lain seperti babi. Adanya kandungan babi pada produk pangan menjadi suatu masalah dikarenakan adanya konsumen yang beragama Islam yang tidak diperbolehkan untuk mengkonsumsi babi dan turunannya berdasarkan hukum halal. Suatu metode deteksi diperlukan untuk mengetahui keberadaan gelatin babi pada suatu sampel pangan yang menggunakan gelatin sebagai bahan baku, salah satunya ialah menggunakan Real-time PCR. Prinsip real-time PCR yaitu pendeteksian amplikon yang terbentuk dengan mengukur peningkatan sinyal fluoresens yang berpendar saat terikat dengan untai DNA ganda. Fluoresens yang dihasilkan akan sebanding dengan jumlah DNA baru yang terbentuk (Reece 2004). Besaran sampel yang digunakan adalah 10 sampel gelatin yang telah dihomogenkan dan ditimbang seberat 50 mg, selanjutnya disimpan dalam wadah tube dan dilanjutkan pada proses ekstraksi DNA.

### Ekstraksi DNA

Proses ekstraksi DNA merupakan tahap awal dilakukannya analisis sumber DNA pada sampel gelatin. Ekstraksi DNA dilakukan untuk mendapatkan DNA genom dari gelatin yang dapat diperoleh melalui cara mekanik maupun enzimatis. Ekstraksi pada pengujian kali ini dilakukan melalui

cara enzimatis. Ada tiga tahap umum dalam proses ekstraksi DNA yaitu merusak dinding sel (lisis), pemisahan DNA dari bahan padar seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Ardiana 2009). Pada pengujian ini, isolasi DNA dilakukan dengan metode ekstraksi menggunakan matriks dari kit komersial Mericon Pig KIT. alasan pemilihan metode ekstraksi dengan kit komersial ini dibandingkan dengan metode konvensional dikarenakan metode konvensional membutuhkan proses yang lama, jumlah sampel yang cukup banyak dalam mengekstraksi, serta jumlah reagen yang begitu besar. Kit komersial yang digunakan pada pengujian ini menggunakan teknologi filter matriks untuk mengisolasi DNA dari sampel. Prinsipnya yaitu asam nukleat akan teradsorpsi oleh matriks pada kit, yang kekuatannya bergantung pada ion dan pH lingkungan. Asam nukleat akan teradsorpsi oleh matriks dan akan mudah dibersihkan dari pengotor lainnya dibawah tekanan sentrifugal. Asam nukleat yang teradsorpsi pada matriks tersebut dapat dielusi dengan menambahkan larutan rendah garam (Tan dan Yiap 2009, chacon dan Griffiths 2014). Pada pengujian ini dilakukan beberapa modifikasi diantaranya pada lama inkubasi dan urutan langkah kerja.

Langkah selanjutnya dalam isolasi DNA ini sampel dilisiskan terlebih dahulu dengan lysis buffer sebanyak 400 µL. larutan lysis buffer mengandung EDTA yang merupakan zar yang mengikat ion magnesium pada dinding sel sehingga memudahkan proses pelisisan dinding sel (Sudjadi 2008). Urea 4M merupakan zat kaotropik yang mendenaturasi protein pada sel. Tris 200 mM sebagai buffer yang menjaga kestabilan pH DNA efektif pada pH 7-9 (Tan 2014). Langkah selanjutnya sampel ditambahkan proteinase K lalu diinkubasi pada alat thermoshaker bersuhu 60 oC pada kecepatan 8.000 rpm selama 30 menit. Setelah itu, sampel di sentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Fase bening yang terbentuk menunjukkan bahwa sampel telah terlisiskan.

Filtrat dipindahkan ke dalam spin filter (berwarna hijau) dan disimpan dalam receiver tube (berwarna kuning). Sampel di sentrifuse kembali pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Filtrat yang diperoleh, lalu ditambahkan binding buffer sebanyak 200 µL yang berfungsi untuk mengikat DNA yang sudah lepas dari sel. Selanjutnya sampel dihomogenkan dan larutan dipindahkan ke spin filter yang baru (berwarna kuning). Inkubasi sampel pada suhu ruang selama 1 menit dan sentrifuse pada kecepatan 12,000 rpm selama 2 menit. Buang filtrat dan letakkan spin filter dalam receiver tube yang baru. Selanjutnya, ekstrak ditambahkan sebanyak 550 µL pre- wash buffer dan disentrifuse kembali pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Pencucian dengan pre-

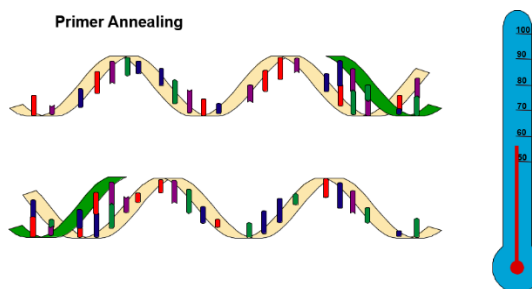
wash buffer dilakukan sebanyak 2 kali. Selain menggunakan pre- wash buffer, pencucian dilakukan pula menggunakan wash buffer sebanyak 550  $\mu$ L dan disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Pencucian dilakukan untuk menghilangkan debris membran sel, protein, dan garam kaotropik yang terikat pada DNA. Pengeringan ekstrak dilakukan dengan mensentrifuse ekstrak pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit.

Ekstrak yang diperoleh kemudian dilarutkan dengan 100  $\mu$ L elution buffer yang sudah dipanaskan sebelumnya. Selanjutnya, larutan diinkubasi pada suhu 65 oC selama 3 menit dan disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. Tujuan pemanasan elution buffer ialah untuk pengelusan isolate DNA agar bekerja lebih optimal (Roche 2012, Kennedy 2010).

### **Amplifikasi DNA Sampel Gelatin dengan Real-time PCR**

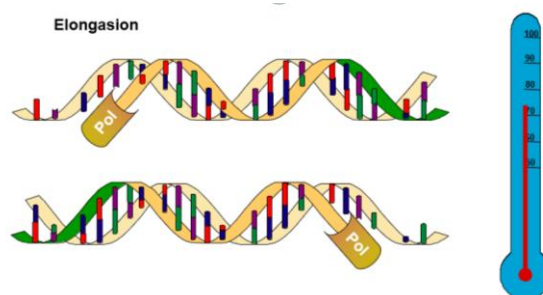
DNA yang berhasil diekstraksi, kemudian diamplifikasi dengan menggunakan alat Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR). Prinsip real-time PCR yaitu pendeteksian ampikon yang terbentuk dengan mengukur peningkatan sinyal fluoresens yang berpadar saat terikat dengan untai DNA ganda. Fluoresens yang dihasilkan akan sebanding dengan jumlah DNA baru yang terbentuk (Reece 2004). Komponen yang digunakan pada proses amplifikasi Real-time PCR ini berada dalam satu kit konvensional Surefood® Animal ID Pork Sens Plus (100 React.). Proses dalam real-time PCR ialah amplifikasi template (DNA atau cDNA) yang memiliki tiga tahap yaitu denaturasi, annealing, elongasi. Proses amplifikasi dilakukan sebanyak 30 siklus yang dimulai dari tahap pertama yaitu denaturasi yang terlebih dahulu diaktivasi pada suhu 95°C selama 5 menit.

Tahap denaturasi ialah pemisahan untai ganda menjadi untai tunggal. Suhu 95 oC akan memutus ikatan hidrogen antara basa yang saling berkomplementer. Semakin tinggi suhu yang digunakan akan menyebabkan aktivitas enzim berkurang (Yusriah dan Kuswyasari 2013). Kemudian, tahap annealing yaitu proses penempelan primer (oligonukleotida yang terdiri dari 18 hingga 25 basa). Proses penempelan primer pada DNA target terjadi di suhu 60°C, yang dapat dilihat pada gambar.



**Gambar 2.** Ilustrasi tahap annealing

Basa nitrogen primer akan berpasangan dengan basa nitrogen pada untai DNA dan probe akan menempel pada DNA target. Primer dan probe akan membentuk ikatan hidrogen dengan untai DNA (Sulistyaningsih 2007). Lalu, dilanjutkan dengan tahap elongasi yaitu proses pemanjangan yang dilakukan oleh enzim polimerase. Enzim polimerase berfungsi untuk melekatkan dNTP pada template menjadi untai DNA pada tahap annealing dalam polimerisasi DNA, ilustrasi dapat dilihat pada gambar.

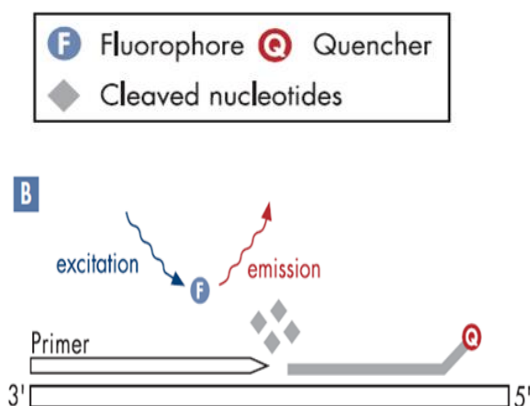


**Gambar 3.** Ilustrasi tahap elongasi

Enzim tersebut diisolasi dari bakteri *Thermophilus aquaticus* yang merupakan bakteri termofilik dan bersifat termostabil sampai suhu 95 oC (Nurwati dan Nafwa 2015), pemanjangan terjadi pada suhu optimum enzim dapat bekerja yaitu 72 oC dan akan terjadi dari sisi 5' ke 3' dengan penambahan dNTP, waktu yang dibutuhkan adalah 1 menit dan diperpanjang sampai 10 menit, hal tersebut bertujuan memastikan agar semua produk PCR telah membentuk untai ganda. Nukleotida yang membentuk ikatan hidrogen dengan basa komplementernya akan terhubung dengan nukleotida sebelumnya melalui ikatan fosfodiester.

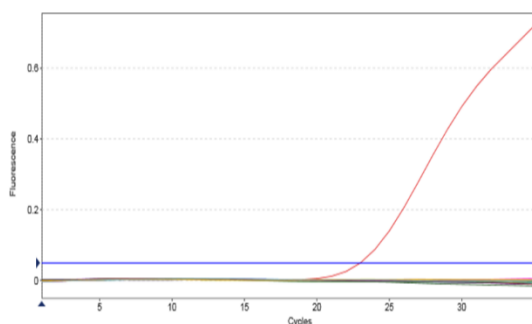
Proses deteksi dengan alat Real-time PCR membutuhkan sepasang primer spesifik dengan spesies DNA babi yang telah diidentifikasi serta pewarna fluoresensi probe. Probe yang digunakan pada pengujian ini ialah jenis taq man. Taq man probe termasuk jenis hydrolysis probe yaitu oligonukleotida probe yang telah dilabel dengan pemancar atau reporter dye pada bagian '5' eksonuklease dan peredam atau quencher dye pada bagian '3' eksonuklease. Probe pada Real-time

PCR digunakan sebagai pewarna pendeteksi adanya sinar fluoresen yang ditangkap. Pada proses annealing setiap siklus, reporter probe akan dipisah dari quencher probe melalui hibridisasi atau aktifitas nuklease Taq Polimerase yang menghasilkan emisi. Emisi tersebut dapat dideteksi dengan detektor sinar UV pada panjang gelombang 522 nm dan 553 nm pada saat bersamaan (Johansson 2006).



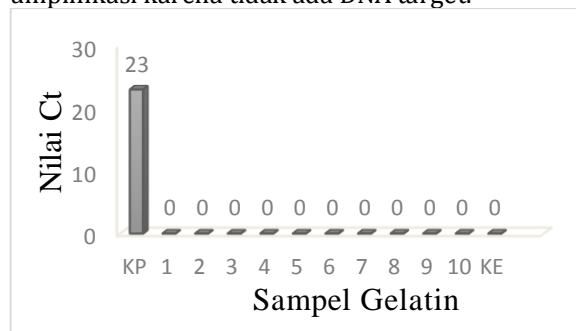
**Gambar 4.** Ilustrasi aktifitas nuklease Taq Polimerase yang menghasilkan emisi

Campuran reaksi total PCR dibuat dalam volume 20  $\mu$ L dengan konsentrasi tiap primer yang tidak dapat disebutkan karena rahasia perusahaan. Konsentrasi primer yang optimal adalah konsentrasi terendah yang dapat menghasilkan nilai Ct (cycle threshold) awal dan kurva fluoresensi yang baik, yaitu berbentuk sigmoid. Analisa kurva amplifikasi pada Real-time PCR dapat dilihat pada kenaikan kurva amplifikasi dan nilai Ct. Nilai Ct yaitu siklus dimana fluoresensi mencapai ambang batas atau threshold sehingga terjadi peningkatan signifikan saat pertama kali terdeteksi (Rodriguez 2013). Hasil amplifikasi sampel gelatin dapat dilihat pada Gambar. Menurut Pranawaty et al. (2012), hasil positif ditandai dengan adanya akumulasi pada sinyal fluoresens dan melintasi base line threshold. Pada Gambar hanya menghasilkan satu kurva yaitu kontrol positif saja, sedangkan sampel gelatin tidak menunjukkan adanya aktivitas amplifikasi yaitu terlihat dari kurva yang tidak terbentuk.



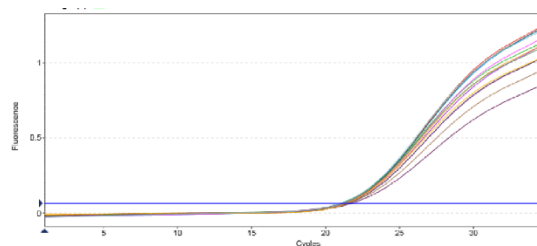
**Gambar 5.** Proses Amplifikasi

Hasil pengujian di atas terlihat pada Gambar menunjukkan hasil negatif pada seluruh sampel gelatin, adapun primer dan probe hanya mengamplifikasi DNA babi pada control positif dengan nilai Ct 23.00. Sampel yang tidak memberikan nilai Ct menandakan tidak terjadinya amplifikasi karena tidak ada DNA target.



**Gambar 6.** Nilai Ct pada sampel gelatin

Disamping itu, pada proses pengujian menggunakan Real-time PCR didukung dengan kontrol internal (inhibitor control, IAC) yang berfungsi memeriksa proses amplifikasi DNA dari zat penghambat yang mengganggu campuran dalam sekuensing dengan PCR. Kontrol internal atau internal control berisi campuran reaksi yang mengandung semua reagen yang diperlukan untuk PCR serta target buatan selain target yang digunakan untuk pengujian (babi). Apabila DNA mengandung zat penghambat, amplifikasi target akan ditekan dan sinyal akan terpengaruh sehingga menunjukkan kurva yang tidak sigmoid.



**Gambar 7.** Kurva Internal Standar

Beberapa contoh zat penghambat PCR adalah alkohol (etanol, isopropanol), surfaktan (CTAB, SDS, Triton X100), dan garam (natrium klorida). juga rempah-rempah, ganggang, kakao, dan matriks sampel lebih lanjut yang mungkin memiliki efek menghambat PCR.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil pengujian dapat disimpulkan bahwa seluruh sampel gelatin negatif atau tidak mengandung DNA babi.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Ardiana DW. 2009. Teknik isolasi DNA genom tanaman pepaya dan jeruk dengan menggunakan modifikasi buffer CTAB. *Buletin Teknik Pertanian*. 14(1): 12-16.
2. Cahyaningsari D, Latif H, Sudarnika E. 2018. Identifikasi spesies babi ternak dan babi hutan pada pangan berbahan dasar daging sapi menggunakan uji cepat dan *real-time* PCR. *Jurnal Ilmiah Kesehatan Masyarakat Veteriner*. Hal:31-36.
3. Campbell NA, Reece JB, Mitchell LG. 2002. *Biologi Edisi Kelima Jilid 1*. Lestari R, penerjemah. Jakarta (ID): Erlangga.
4. Chacon, Griffiths. 2014. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspective. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*. 2014(2).
5. Che Man YB, Aida AA, Raha AR, and Son R. 2007. Identification of Pork Derivates in Food Products by SpeciesSpecific Polymerase Chain Reaction (PCR) For Halal Verification. *Journal of Food Control*. Vol 18:885-889.
6. Essaawi T, Hammoudeh W, Sabri I, Sweidan W, Farraj MA. 2013. Determination of *Helicobacter pylori* virulence genes in gastric biopsies by PCR. *Gastroenterology*. doi.org/10.1155/2013/606258.
7. Dirjen POM Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta (ID): Kemenkes RI.
8. Fraga D, Meulia T, Fenster S. 2008. Real-time PCR. *Current Protocols*. doi.org/10.1002/2019/9780470089941.et1003s00.
9. Ghaffar S. 2007. *Buku Ajar Bioteknologi Molekul*. Bandung (ID): Universitas Padjajaran Press.
10. Hafidz RN, Yaakob CM, Amin I, Noorfaizan A. 2011. Chemical and functional properties of bovine and porcine skin gelatin. *Journal of International Food and Reseach*. 18: 813-817.
11. Hui YH. 2011. *Handbook of Food Science Technology and Engineering Third Editiom*. China: Crc Pr I Llc.
12. Johansson MK. 2006. Choosing reporter-quencher pairs for efficient quenching through formation of intramolecular dimers. *Journal of Molecular Biology*. Vo.335.
13. Karim AA, Bhat R. 2009. Ulasan gelatin ikan: property, tantangan, dan prospek sebagai sebuah alternatif untuk mamalia gelatin. *Jurnal Ilmu Pangan dan Teknologi*. 19: 644-656.
14. Nurwati L, Nawfa R. 2016. Identifikasi spesies isolate bakteri galur d dengan metoda Analisa sekuen fragmen gen 16s rdna. *JSS*. 4(2): 126-128.
15. Pranawaty RN, Buwono ID, Liviawaty E. 2012. Aplikasi *polymerase chain reaction* (PCR) konvensional dan *real-time* PCR untuk deteksi *white spot syndrome* pada kepiting. *J Perik Kel*. 3(4): 70-71.
16. Reece RJ. 2004. *Analysis of Genes and Genomes*. Inggris (EN): Jhon Wiley and Sons Lid.
17. Rodriguez D, Lazaro. 2013. *Real-time PCR in Food Science Current Technology and Applications*. Spanyol: Caister Academia Press.
18. Sue MJ, Yeap SK, Omar AR, Tan SW. 2014. Application of PCR-ELISA in molecular diagnosis. *Journal of Biomed Research International*. Hal: 1-2. doi.org/10.1155/2014/653014.
19. Sudjadi. 2008. *Bioteknologi Kesehatan*. Yogyakarta (ID): Kanisius.
20. Sulistyaningsih E. 2007. *Polymerase chain reaction*: era baru diagnosis dan manajemen penyakit infeksi. *Journal of Biomedis*. 1: 17-25.
21. Suryani N, Sulistiawati F, Fajriani A. 2009. Kekuatan Gel Gelatin Tipe B Dalam Formulasi Granul Terhadap Kemampuan Mukoadhesif. *Jurnal Kesehatan*. 13(1): 1-4.
22. Tan CS, Yiap BC. 2009. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Hal 10. doi.org/10.1155/2009/574398.
23. Wangtueai S, Noomhorm A. 2009. Processing optimization and characterization of gelatin from lizardfish (saurida spp.) scales. *Journal of Food Science and Technology*. 42(1): 825-834.
24. Yusriah, Kuswytasari ND. 2013. Pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas protease *Penicillum* sp. *JSSP*. 2(1): 49-50.



## Penentuan Kadar Residu Hormon Trenbolon Asetat Pada Daging Sapi Menggunakan Metode *Enzyme Link Immuno Sorbent Assay* (ELISA)

Firsti Isya Helfalia<sup>1</sup>, Ahmad Sjahriza<sup>1</sup>, Dini Tri Mardiani<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor

<sup>2</sup>Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

\*e-mail korespondensi penulis: dinimardiani@pertanian.go.id

### ABSTRAK

Trenbolon asetat adalah hormon androgen sintetik yang digunakan sebagai penggertak pertumbuhan. Pada ruminansia, hormon ini digunakan untuk meningkatkan produksi peternakan (daging) secara maksimal. Hormon TBA dapat meningkatkan pertumbuhan bobot badan sebanyak 10% dan menurunkan konversi kebutuhan pakan dari 11% menjadi 9%. Residu trenbolon asetat di dalam tubuh ternak sapi ditemukan dalam bentuk metabolitnya yaitu 17- $\beta$ -trenbolon dan 17- $\alpha$ -trenbolon. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan kadar residu trenbolon asetat pada daging sapi. Ukuran sampel ditentukan sesuai dengan syarat pengambilan sampel. Sampel dipilih secara acak yaitu sebanyak 30 sampel. Sampel dianalisis menggunakan *enzim-linked immunosorbent assay* (ELISA). Hasil pengujian menunjukkan pada semua sampel daging sapi terdeteksi standar TBA dengan rentang 0,039-0,217 ppb. Dari 30 sampel yang diuji, hasil menunjukkan bahwa nilai 0,039 ppb merupakan konsentrasi terkecil sedangkan nilai 0,217 merupakan konsentrasi terbesar yang terdeteksi pada sampel.

**Kata kunci:** Trenbolone asetat, ELISA

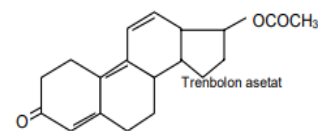
### PENDAHULUAN

Indonesia memiliki jumlah penduduk yang setiap tahunnya meningkat. Hal ini memengaruhi jumlah konsumsi makanan yang juga meningkat. Kesadaran penduduk akan kebutuhan makanan yang mengandung protein yang tinggi seperti daging sapi juga meningkat setiap tahunnya. Menurut Ditjen Peternakan dan Kesehatan Hewan (2015), konsumsi daging sapi di Indonesia pada lima tahun terakhir (2010-2014) meningkat dengan rerata sebesar 503,79 ribu ton daging sapi.

Permintaan terhadap daging sapi yang meningkat seharusnya juga diimbangi dengan penambahan produksi daging sapi. Menurut Ditjen Peternakan dan Kesehatan Hewan (2015), jumlah ketersediaan daging sapi di Indonesia dari produk lokal terus mengalami peningkatan dari tahun ke tahun (2009-2013) dengan rerata produksi sebesar 382,55 ribu ton. Peningkatan produksi daging sapi belum bisa menutupi permintaan konsumsi daging sapi nasional sehingga pemerintah mengimpor daging sapi untuk memenuhi permintaan konsumsi daging sapi di Indonesia. Peternak sapi terkadang mengaplikasikan hormon pada sapi dengan tujuan untuk menambah bobot sapi sehingga keuntungan penjualan daging sapi meningkat. Namun, residu hormon sering

kali terakumulasi dalam daging sapi. Oleh karena itu, perlu dilakukan uji residu hormon berkala terhadap daging sapi sebelum diedarkan ke masyarakat.

Daging sapi lokal dan impor perlu diperiksa sebelum diedarkan ke masyarakat agar tidak ada residu hormon di dalam daging sapi. Produk peternakan seperti daging sapi yang mengandung cemaran residu bahan kimia toksik (mikotoksin, pestisida, obat hewan, dan hormon) dapat mengganggu dan membahayakan kesehatan konsumen. Salah satu residu yang membahayakan manusia adalah hormon trenbolon asetat (TBA) (Danial *et al.*, 2015).

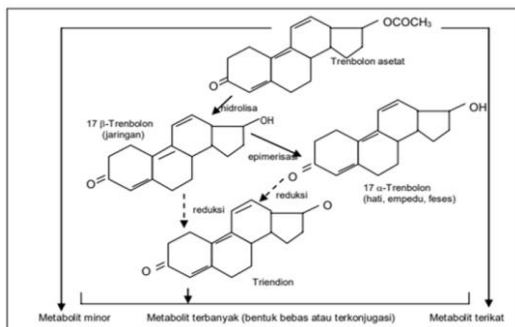


**Gambar 1.** Struktur Trenbolon Asetat (Revalor, 1986)

Trenbolon asetat (TBA, 17 $\beta$ -hydroxy-estra-4,9,11-trien-3-one-17-acetate) (Gambar 1) adalah hormon androgen sintetik yang digunakan sebagai penggertak pertumbuhan, khususnya pada ruminansia untuk meningkatkan produksi peternakan (daging) secara maksimal (Heitzman 1979). Hormon TBA dapat meningkatkan pertumbuhan bobot badan sebanyak 10% dan menurunkan

konversi kebutuhan pakan dari 11% menjadi 9% (Danial *et al.*, 2015). Residu trenbolon asetat di dalam tubuh ternak sapi ditemukan dalam bentuk metabolitnya yaitu 17- $\beta$ -trenbolon dan 17- $\alpha$ -trenbolon.

Residu trenbolon bersifat stabil dalam kotoran hewan maupun lingkungan sehingga limbah peternakan sapi yang mengandung residu tersebut akan membahayakan biota (Schiffer *et al.*, 2001). Berdasarkan analisis ilmiah, daging dari hewan yang diimplantasi hormon akan mengandung estrogen dengan kadar yang cukup tinggi, dan terbukti berpengaruh terhadap seksualitas manusia, reproduksi dan dapat memicu terjadinya kanker (Widiastuti *et al.*, 2007). Efek samping dari residu TBA dalam konsentrasi tinggi (diatas 4 ppb) sangat merugikan bagi kesehatan masyarakat antara lain peningkatan sel kanker, penurunan fertilitas, reaksi hipersensitif, gangguan kardiovaskuler, gangguan fungsi hati, penurunan produksi testosteron, spermatogenesis, oligospermia, serta atrofi testis (Maravelias *et al.*, 2005).



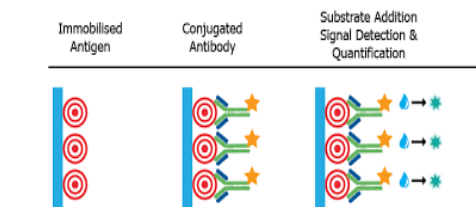
Gambar 2. Rute Utama Metabolisme Trenbolon Asetat (Revalor, 1986)

Beberapa negara maju menempatkan aturan yang ketat mengenai batas maksimum residu (BMR) dalam produk ternak yang dikonsumsi manusia. Negara-negara di Eropa yang tergabung dalam EEC (*European Economic Community*) yang melarang penggunaan dari anabolik steroid dan tidak memperbolehkan ada residu hormon pada produk *Mated* sampel. Menurut FDA (*Food and Drugs Association*) di Amerika Serikat menerapkan BMR terhadap hormon TBA sebesar 50 ppb, sedangkan di negara Jepang sebesar 25 ppb (Widiastuti *et al.*, 2000). Menurut Standar CODEX untuk obat hewan atau hormon umumnya mengacu pada persyaratan *acceptable daily intake* (ADI) dan atau *maximum residue limit* (MRL). Standar CODEX menetapkan bahwa ADI trenbolon asetat adalah 0-0,02  $\mu\text{g/kg}$  berat badan dan

MRL trenbolon pada daging sapi dan hati sapi masing-masing 2  $\mu\text{g/kg}$  (2 ppb) dan 10  $\mu\text{g/kg}$  (10 ppb) (CAC 2012). Batas maksimum residu TBA pada daging, hati maupun pada urin di Indonesia sampai saat ini belum ditetapkan dalam SNI (Standar Nasional Indonesia).

Surat Edaran Direktur Kesehatan Hewan No. 329/XII-C tanggal 4 Oktober 1983 maupun berdasarkan hasil rapat Komisi Obat Hewan tanggal 12 Agustus 1998 juga tidak mengizinkan penggunaan hormon termasuk hormon TBA sebagai penggertak pertumbuhan pada sapi (Widiastuti *et al.*, 2000). Negara-negara tertentu telah melarang penggunaan hormon ini sebagai penggertak pertumbuhan, namun penggunaan hormon ini merupakan cara umum dalam usaha penggemukan sapi. Monitoring rutin terhadap adanya residu TBA sebagai salah satu kontrol dalam keamanan pangan sangat diperlukan. Konsumen perlu dilindungi dari bahaya residu hormon yang ada di dalam daging sapi, maka perlu diketahui tingkat residu hormon TBA pada produk daging dan hati sapi yang beredar di Indonesia.

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) merupakan tes serologis dalam biokimia yang digunakan untuk mendeteksi kehadiran antibodi atau antigen dalam suatu sampel. Prinsip kerja dari teknik ELISA berdasarkan ikatan spesifik antara antibodi dan antigen dengan menggunakan enzim sebagai marker. Enzim tersebut akan mendeteksi adanya antigen di dalam sampel setelah antigen tersebut bereaksi dengan antibodi. ELISA memiliki dua teknik metode, yaitu teknik kualitatif yang menyatakan bahwa setiap antibodi akan berikatan spesifik dengan antigen dan teknik kuantitatif berdasarkan jumlah ikatan-antibodi yang ditentukan dengan nilai absorbansi (Nugroho dan Rahayu, 2006).



Gambar 3. Mekanisme Kerja ELISA (Byron, 2017)

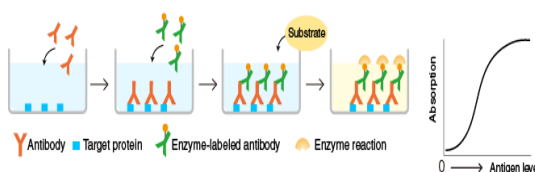
Secara umum, prinsip ELISA yaitu memasukkan antibodi yang terdapat di dalam serum ke dalam antigen yang sudah difiksasi pada penyangga padat (mikrotiter). Setelah itu, diinkubasi pada waktu tertentu,

lalu dicuci untuk menghilangkan kelebihan antibodi. Selanjutnya ditambahkan antibodi anti-spesies yang telah dikonjugasikan dengan enzim. Penentuan aktifitas enzim akan ditentukan setelah ditambahkan *substrate chromogenic* spesifik. Jumlah substrat yang didegradasi akan menentukan intensitas reaksi warna yang terjadi, dan sebanding dengan jumlah antibodi dari sampel (Gambar 3) (Setiawan, 2007).

ELISA dibedakan menjadi dua jenis yaitu teknik ELISA kompetitif dan teknik ELISA non-kompetitif. Teknik ELISA kompetitif adalah teknik deteksi dengan menggunakan konjugat antigen-enzim atau konjugat antibodi-enzim. Teknik ELISA non-kompetitif merupakan teknik ELISA yang menggunakan antibodi yang akan dikonjugasikan dengan enzim yang berperan sebagai sinyal dalam proses analisis. Teknik ELISA non-kompetitif dikenal juga dengan teknik ELISA *sandwich*. Teknik ELISA non-kompetitif atau ELISA *sandwich* merupakan teknik deteksi yang memanfaatkan antibodi primer spesifik untuk mengikat antigen, kemudian antibodi sekunder akan bertautan dengan enzim untuk mendeteksi keberadaan antigen dalam sampel uji (Indiati, 2007).

Teknik ELISA lainnya adalah ELISA *direct* dan ELISA *indirect*. Teknik ELISA *direct* merupakan teknik deteksi dengan memanfaatkan antibodi yang spesifik. ELISA *direct* digunakan secara sederhana untuk mengukur konsentrasi antigen yang terdapat dalam sampel uji. Teknik ELISA *indirect* merupakan teknik deteksi dengan memanfaatkan antigen yang spesifik. ELISA *indirect* digunakan untuk mengukur kadar antibodi tertentu yang terkandung di dalam suatu sampel (Indiati, 2007).

ELISA *direct* bekerja dengan protein target (atau antibodi target) yang diimobilisasikan di permukaan sumur lempeng (mikrotiter) dan diinkubasi dengan antibodi berlabel enzim ke protein target (atau antigen spesifik untuk antibodi target). Setelah pencucian, aktivitas *microplate* (mikrotiter) yang terikat dengan enzim dan dapat diukur (Gambar 4) (Martin, 2017).



Gambar 4. Cara Kerja ELISA *Direct* Pada Sampel  
(Martin, 2017)

ELISA memerlukan peralatan dan reagen yang sudah tersedia dan dijual secara komersial. Tes ELISA dapat digunakan untuk mendeteksi antigen atau maupun antibodi yang berada di dalam tubuh manusia maupun hewan (Setiawan 2007). Mulanya teknik ELISA sebatas digunakan dalam bidang imunologi untuk mendeteksi keberadaan antigen maupun antibodi dalam suatu sampel seperti pendeteksian antibodi IgM, IgG dan IgA pada saat terjadi infeksi (khususnya pada tubuh manusia). Seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan, teknik ELISA dapat diaplikasikan dalam bentuk lain termasuk menganalisis kadar hormon yang ada pada organisme (Haussmann *et al.*, 2007).

Teknik ELISA memiliki beberapa kelebihan dan kekurangan dalam deteksi suatu antibodi atau antigen dalam suatu sampel. Kelebihan metode ELISA adalah proses pengerjaan sederhana, relatif ekonomis, dapat digunakan untuk banyak macam pengujian imunologis dan memiliki tingkat sensitivitas yang cukup tinggi untuk mendeteksi keberadaan antigen meskipun sangat sedikit. Kekurangan metode ELISA adalah hanya dapat menggunakan jenis antibodi monoklonal yang hanya mampu mengenali satu antigen saja, biaya operasional relatif mahal daripada antibodi poliklonal dan proses pembacaan harus dilakukan dengan cepat karena reaksi enzim signal substrat berlangsung relatif cepat (Herniawati, 2017).

## MATERI DAN METODE

### Bahan Penelitian

Sampel penelitian berupa daging sapi yang beredar di pasar tradisional. Sampel disimpan dalam keadaan beku sebelum dilakukan pengujian. Pengambilan sampel dilakukan secara acak sederhana.

### Alat dan Metode

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah Ridascreen® ELISA kit, mikrotiter, ELISA reader, komputer, mini kolom (silika C18), vortex, shaker bath, sentrifugasi, tabung sentrifugasi, homogenizer, rotary evaporator, neraca dua desimal, alat-alat kaca, gunting, pinset, parafilm, micropipette, sudip dan aluminium foil.

### Prosedur Preparasi Sampel

Preparasi sampel daging sapi dipotong berukuran kecil dan dihomogenisasi sampai halus dalam tabung sentrifugasi. Sampel ditimbang 10 gram dan ditambahkan PBS 67 mM pH 7,22 sebanyak 10 mL. Sampel diaduk dengan *vortex* selama 5 menit dan diambil 2 gram sampel ke dalam tabung sentrifugasi yang baru. Selanjutnya ditambahkan tert-butyl-metil eter sebanyak 5 mL dan diaduk dengan *vortex* selama 10 detik. Selanjutnya sampel dimasukkan ke dalam *shaker bath* selama 1 jam dengan suhu konstan 25°C. Sentrifugasi dilakukan selama 10 menit dengan kecepatan rotasi 3000 rcf dengan suhu 10°-15°C. Setelah sentrifugasi, lapisan bening (supernatan) dimasukkan di dalam labu bulat 100 mL. Selanjutnya residu ditambahkan lagi tert-butyl-metil eter sebanyak 5 mL dan diaduk dengan *vortex* selama 10 detik. Kemudian sampel dimasukkan ke dalam *shaker bath* selama 30 menit dengan suhu konstan 25°C. Sentrifugasi dilakukan selama 10 menit dengan kecepatan rotasi 3000 rcf dengan suhu 10°-15°C. Setelah sentrifugasi selesai, supernatan dimasukkan ke labu bulat 100 mL dan dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Kemudian ditambahkan 1 ml metanol 80% dan 2 ml 20 mM PBS buffer.

Proses purifikasi sampel mini kolom silika C18 diaktivasi dengan metanol PA sebanyak 3 mL dan larutan PBS 20 mM pH 7.22 sebanyak 2 mL. Kemudian sampel dimasukkan ke dalam mini kolom silika C18. Setelah tetesan habis, ditambahkan 2 mL metanol 40%. Kemudian dilakukan elusi sampel dengan metanol 80% sebanyak 1 ml yang ditampung dalam tabung reaksi yang sudah berisi akuades 1 mL. Proses elusi dilakukan dengan laju 15 tetes per menit. Setelah elusi selesai, larutan dalam tabung reaksi dikocok dengan *vortex* selama 10 detik dan ditutup dengan parafilm.

#### **Pengujian Sampel dengan Metode ELISA**

Sebanyak enam larutan standar yang terdapat dalam ELISA Kit) dengan konsentrasi berbeda-beda dipipet ke dalam mikrotiter sebanyak 20 µL secara duplo. Kemudian sampel dimasukkan ke dalam mikrotiter sebanyak 20 µL, ditambahkan 50 µL enzim konjugat dan 50 µL *antitrenbolone antibody*. Mikrotiter digoyang secara perlahan selama 1 menit dan ditutup dengan aluminium foil. Sampel dan standar diinkubasi dalam ruang tanpa cahaya selama 2 jam pada suhu 20°-25°C. Selanjutnya sampel dan standar dibuang serta ditambahkan 250 µL akuades selama 1 menit

ke dalam mikrotiter. Selanjutnya akuades dibuang dan permukaan mikrotiter diseka dengan tisu (pencucian dilakukan tiga kali). Kemudian ditambahkan 50 µL *substrate* dan 50 µL *chromogen*. Larutan diaduk perlahan selama 1 menit dan ditutup dengan aluminium foil untuk diinkubasi selama 30 menit pada suhu 20°-25°C. Larutan ditambah 100 µL *stop solution* kemudian diaduk perlahan selama 1 menit dan didiamkan selama 1 menit. Penambahan *stop solution* dilakukan secara hati-hati karena mengandung asam sulfat. Selanjutnya dilakukan pembacaan sampel oleh ELISA reader.

Pembacaan ELISA reader Software *Rev-quick* diaktifkan dan diisi konsentrasi standar. Sampel dalam mikrotiter dimasukkan ke dalam alat ELISA Reader maksimal 30 menit dan dilakukan pembacaan. Hasil data mentah muncul dan tersimpan dalam komputer. Software *Rida®Soft Win Reader* (Art No.Z9999) diaktifkan pada panjang gelombang 450 nm dan dimasukkan data mentah sampel. Hasil data dalam bentuk grafik dan tabel konsentrasi TBA dinyatakan dalam *part per trillion* (ppt) kemudian hasil ELISA reader dicetak.

#### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Daging sapi merupakan sampel yang digunakan dalam pengujian residu hormon TBA dengan metode ELISA. Sampel daging yang digunakan sebanyak 30 sampel. Sampel didapatkan dari berbagai macam perusahaan atau rumah potong hewan yang ada di Indonesia. Kondisi sampel yang diuji dalam keadaan layak uji serta terkemas rapi tanpa ada kerusakan pada kemasan. Pengujian terhadap sampel dilakukan sesuai dengan prosedur pengujian TBA menggunakan metode *Enzim-linked immunosorbent assay* (ELISA) kompetitif.

ELISA kompetitif dipilih karena metode ELISA kompetitif lebih tepat dan memiliki sensitivitas yang baik dalam menganalisis senyawa. Hormon TBA yang terdapat pada sampel akan berkompetisi dengan antibodi yang berada dalam mikrotiter. Pereaksi yang tidak berikatan akan terbuang setelah mengalami proses pencucian. Kemudian substrat dan chromogen ditambahkan pada mikrotiter dan diinkubasi. Enzim konjugat yang terikat mengubah chromogen menjadi warna biru. Prinsip pembacaan ELISA reader dipengaruhi

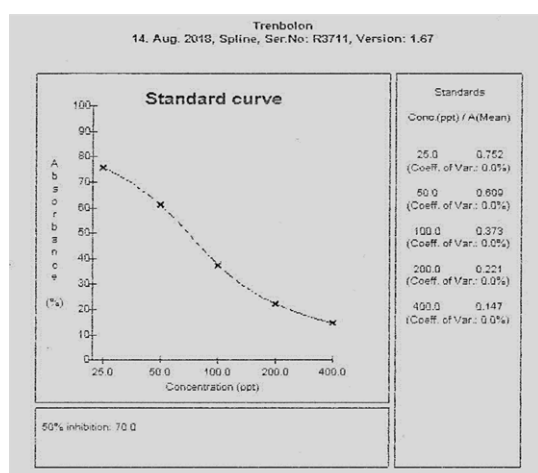
oleh tingkat kepekatan atau perubahan warna yang terjadi pada sampel. Perubahan warna terjadi akibat antigen pada hormon TBA berikatan dengan antibodi dalam mikrotiter pengujian ELISA, semakin banyak antigen yang berikatan dengan antibodi, maka warna semakin pudar sehingga nilai absorbansi semakin kecil pada standar TBA yang memiliki konsentrasi tinggi.

Penentuan hasil analisis dilakukan dengan *software Rev-quick* dan *software Rida®Soft Win Reader* (Art No.Z9999) pada panjang gelombang 450 nm sehingga diperoleh hasil konsentrasi hormon TBA dalam satuan *part per trillion* (ppt). Larutan standar pada enam konsentrasi berbeda dilakukan pengujian dengan *ELISA reader* dan diperoleh konsentrasi larutan standar terukur dan nilai absorbansi pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Konsentrasi Larutan Standar Terukur Hasil Pembacaan ELISA

Standar	[Standar] (ppt)	[Standar] Terukur (ppt)	Absorbansi	Deviasi (%)
1	0		0,992	
2	25	25,08	0,752	0,3
3	50	49,73	0,609	0,5
4	100	100,42	0,373	0,4
5	200	200,16	0,221	0,1
6	400	398,54	0,147	0,4

Hubungan antara konsentrasi standar dengan absorbansi dapat dilihat dalam gambar kurva standar dibawah ini.



**Gambar 6** Kurva Standar TBA Hasil Pembacaan ELISA reader

Sampel daging sebanyak 30 sampel yang telah diuji dengan ELISA menghasilkan konsentrasi TBA dalam satuan *part per trillion* (ppt) pada Tabel 2.

Menurut Standar CODEX untuk obat hewan atau hormon umumnya mengacu pada persyaratan *acceptable daily intake* (ADI) dan atau *maximum residue limit* (MRL). Standar Codex menetapkan bahwa ADI trenbolon asetat adalah 0-0,02 µg/kg berat badan dan MRL trenbolon pada daging sapi dan hati sapi masing-masing 2 µg/kg (2 ppb) dan 10 µg/kg (10 ppb) (CAC 2012). Batas maksimum residu TBA pada daging, hati maupun pada urin di Indonesia sampai saat ini belum ditetapkan dalam SNI (Standar Nasional Indonesia).

Analisis hasil konsentrasi TBA pada 30 sampel daging sapi terdeteksi standar TBA dengan rentang 0,039-0,217 ppb. Nilai 0,039 ppb merupakan konsentrasi terkecil dari 30 sampel yang diuji dan nilai 0,217 merupakan konsentrasi terbesar yang terdeteksi pada sampel ke 29 daging sapi. Batas maksimum residu TBA pada daging, hati maupun pada urin di Indonesia sampai saat ini belum ditetapkan dalam SNI (Standar Nasional Indonesia) sehingga Kementerian Pertanian menggunakan standar CODEX dalam menentukan batas maksimum residu hormon TBA dalam daging sapi. Hal ini menandakan bahwa semua sampel memiliki konsentrasi TBA yang jauh di bawah standar 2 ppb yang ditetapkan oleh CODEX sehingga semua sampel dapat dikonsumsi dengan aman dan layak diedarkan ke masyarakat.

**Tabel 2** Konsentrasi TBA pada Daging Sapi Hasil Pembacaan ELISA

Sampel	Absorbansi	[TBA] (ppt)	FP	[TBA] terukur (ppt)	[TBA] (ppb)
1	0,469	75,50	2,00	150,99	0,150
2	0,671	38,96	2,00	77,91	0,077
3	0,500	69,17	2,00	138,34	0,138
4	0,664	40,19	2,00	80,37	0,080
5	0,439	82,23	2,00	164,46	0,164
6	0,420	86,90	2,00	173,80	0,173
7	0,478	73,60	2,00	147,21	0,147
8	0,368	102,09	2,00	204,17	0,204
9	0,437	82,70	2,00	165,41	0,165
10	0,566	57,10	2,00	114,19	0,114
11	0,369	101,75	2,00	203,50	0,203
12	0,420	86,90	2,00	173,80	0,173
13	0,421	86,64	2,00	173,29	0,173
14	0,510	67,24	2,00	134,48	0,134
15	0,588	53,31	2,00	106,62	0,106
16	0,668	39,48	2,00	78,97	0,078
17	0,431	84,15	2,00	168,30	0,168
18	0,571	56,23	2,00	112,46	0,112
19	0,392	94,55	2,00	189,10	0,189
20	0,468	75,71	2,00	151,42	0,151
21	0,462	77,01	2,00	154,01	0,154
22	0,441	81,76	2,00	163,52	0,163
23	0,522	64,98	2,00	129,96	0,129
24	0,570	56,40	2,00	112,81	0,112
25	0,374	100,10	2,00	200,20	0,200
26	0,630	46,11	2,00	92,22	0,092
27	0,745	26,19	2,00	52,39	0,052
28	0,720	30,38	2,00	60,76	0,060
29	0,350	108,54	2,00	217,09	0,217
30	0,788	19,85	2,00	39,69	0,039

## KESIMPULAN

Penentuan kadar residu hormon TBA pada 30 sampel daging sapi dilakukan dengan metode ELISA kompetitif. Hasil analisis yang didapatkan dengan metode ELISA bersifat semi-kuantitatif. Sampel sebanyak 30 sampel menghasilkan data residu hormon TBA pada rentang konsentrasi 0,039-0,217 ppb. Menurut standar CODEX, konsentrasi rentang 0,039-0,217 ppb termasuk konsentrasi dibawah standar CODEX yaitu 2 ppb sehingga daging sapi masih diperbolehkan untuk dikonsumsi dan layak diedarkan ke masyarakat.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Byron. 2018. <https://rockland-inc.com/elisa.aspx>. Diakses Tanggal 27 September 2018.
2. [CAC] Codex Alimentarius Commission Maximum residue limits for veterinary drugs in foods. [http://ftp.fao.org/codex/weblinksMRL2e\\_2012.pdf](http://ftp.fao.org/codex/weblinksMRL2e_2012.pdf). Diakses Tanggal 29 September 2018.
3. Danial R, Latif H, Indrawati A. 2015. Deteksi residu hormon trenbolon asetat pada sapi siap potong impor asal Australia. *J Acta Veterinaria Indonesiana*. 3(2):70-76. ISSN:2337-3202.
4. Haussmann MF, Vleck CM, Farrar ES. 2007. A laboratory exercise to illustrate increased salivary cortisol in response to three stressful conditions using competitive ELISA. *Adv Physiol Educ*. 31(1):110-115.
5. Herniawati CN. 2017. Titer HBsAg dengan perbedaan waktu pembacaan absorbansi pada ELISA reader [Skripsi]. Semarang (ID): Universitas Muhammadiyah Semarang.
6. Indiati IR. 2017. Sensitivitas dan spesifitas metode ELISA terhadap metode ELFA pada pemeriksaan hepatitis B [Skripsi]. Semarang (ID): Universitas Muhammadiyah Semarang.
7. Maravelias C, Dona, A, Stefanidou M, Spiliopoulou. 2005. Adverse effect of anabolic steroids in athlete a constant threat. *Toxicology Letter* 158:167-175.
8. Martin. 2017. <http://ruo.mbl.co.jp/bio/g/support/method/elisa.html>. Diakses Tanggal 27 September 2018.
9. Nugroho ED, Rahayu DA. 2006. *Penuntun Praktikum Bioteknologi*. Yogyakarta (ID): Deepublish Publisher
10. Revalor, 1986. *Trenbolone Acetate Metabolism and Residues in Revalor anabolics*. Boson (US): Roussel Uclaf Division of Agro-Veterinaire.
11. Schiffer B, Daxenberger A, Meyer K, Meyer HH. 2001. The fate of trenbolone acetate and melengestrol acetate after application as growth promoters in cattle: Environmental studies. *J Environ. Health Perspect*. 109: 1145-1151.
12. Setiawan IM. 2007. Pemeriksaan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) untuk diagnosis leptospirosis. *Ebers Papyrus*. 13(3): 125-136.
13. Widiastuti R, Murdianti TB, Yuningsih. 2000. Residu hormon 17-b-trenbolon pada daging dan hati sapi impor yang beredar di DKI Jakarta. *Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner*. 1(1):578-581.
14. Widiastuti R, Firmansyah R, Indraningsih. 2007. Residu trenbolon pada jaringan dan urine dari sapi jantan muda Peranakan ongole yang diimplantasi trenbolon asetat. *JITV*. 12(1):60-67.



## **Validasi Metode Analisis Penentuan Kandungan Logam Berat As, Cd, Hg dan Pb dalam Telur Asin Dengan Menggunakan Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS)**

Puji Rahayu<sup>1</sup>, Nida Pridananti<sup>2</sup>, Elok Kania<sup>1</sup>, Sani Susanty<sup>1</sup>, Dini Tri Mardiani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

<sup>2</sup>Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Dioinegoro

\*email korespondensi penulis: pujirahayu@pertanian.go.id

### **ABSTRACT**

*From the validation results obtained linearity of the As, Cd, Hg and Pb metals is good with linear regression values obtained sequentially of 0.9979; 0.9996; 0.9991 and 0.9792. Precision in As, Cd and Hg is good with % RSD values obtained sequentially of 3.33%; 1.79% and 3.35%, while the Pb precision is not good with a % RSD value of 5.58%. The accuracy of As, Cd, Hg and Pb metals is good with % R values obtained in sequence of 96.7%; 95.6%; 84.5% and 95.7%. LOD and LOQ values obtained on As metals were 0.70 and 2.33; metal Cd of 0.10 and 0.34; Hg metals are 0.03 and 0.09 and Pb metals are 1.00 and 3.35. Test methods for the determination of As, Cd and Hg metals in salted eggs are valid test methods, whereas for Pb metals the test methods are invalid or need to be calibrated*

**Keywords:** Validation, Heavy Metal, Atomic Absorption Spectrophotometer

### **PENDAHULUAN**

Validasi adalah konfirmasi melalui pengujian dan pengadaan bukti objektif bahwa persyaratan tertentu untuk suatu maksud khusus dipenuhi, dimana bukti objektif berupa data pendukung eksistensi sesuatu atau kebenaran sesuatu (Anonimous, 2005). Sedangkan validasi metode analitik adalah evaluasi sistematis dari suatu prosedur analitik untuk menunjukkan bahwa metode analitik yang dipakai secara scientific baik (Anonim, 2000).

Laboratorium penguji wajib melakukan validasi metode uji bila menggunakan metode tidak baku, metode yang didesain atau dikembangkan oleh laboratorium, metode baku yang digunakan diluar ruang lingkup yang dimaksudkan, metode baku yang dimodifikasi dan metode baku untuk menegaskan dan mengkonfirmasi bahwa metode itu sesuai untuk penggunaan yang dimaksudkan (Anonimous, 1998).

#### **Parameter Validasi**

##### **Linearitas**

Linearitas adalah suatu kemampuan metode analisis untuk mendapatkan hasil percobaan yang berbanding lurus dengan konsentrasi analit pada sampel. Linearitas dapat diukur dengan pengukuran tunggal pada konsentrasi yang berbeda dan selanjutnya ditentukan dengan nilai kemiringan (slope) dan

intersep serta koefisien korelasi yang dihasilkan (Harmita, 2004).

##### **Presisi**

Presisi adalah suatu ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual yang diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur dilakukan secara berulang-ulang (Harmita, 2004). Pengujian presisi dilakukan untuk mengukur simpangan baku relatif (%RSD). Simpangan baku relatif adalah persamaan yang digunakan untuk membandingkan variasi relatif antara jumlah data. Selain itu, simpangan baku relatif juga digunakan sebagai parameter presisi untuk mengetahui besar variasi antar data yang dihasilkan. Nilai RSD yang dapat diterima tergantung dari konsentrasi analit yang menunjukkan ketelitian yang semakin tinggi. Nilai RSD yang didapatkan dibandingkan dengan CV Horwitz.

CV Horwitz adalah suatu tetapan atau rumus untuk menentukan bahwa koefisien variasi dari data yang diperoleh dapat diterima. Pada metode keterulangan (repeatability) nilai CV Horwitz dikali dengan 2/3 (0,67). Maka apabila nilai RSD hasil analisis lebih kecil dari 2/3 CV Horwitz, maka hasil analisis tersebut dapat diterima.

##### **Akurasi**

Akurasi adalah kedekatan antara nilai

hasil uji suatu metode analisis dengan nilai sebenarnya. Uji akurasi dilakukan untuk mengetahui adanya gangguan matriks di dalam contoh uji terhadap pereaksi yang digunakan atau untuk mengetahui ketepatan metode yang digunakan.

#### **Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitas (LOQ)**

Batas deteksi (LOD) merupakan jumlah atau konsentrasi terkecil analit dalam contoh yang dapat dideteksi, namun tidak selalu kuantitatif sesuai dengan nilai sebenarnya. Sehingga dapat dikatakan bahwa batas deteksi merupakan parameter uji batas yang dinyatakan dalam persen bagian permilyar sampel (ppm). Nilai LOD dapat ditentukan melalui ratio Standar Deviation of Response and Slope. Sedangkan batas kuantitasi atau Limit of Quantitation (LOQ) merupakan jumlah analit terkecil dalam sampel yang masih dapat dikuantifikasi dengan akurasi dan presisi yang baik (ICH, 2005).

#### **Telur Asin**

Telur merupakan salah satu sumber protein hewani yang sering dikonsumsi oleh masyarakat. Hampir semua zat gizi yang diperlukan tubuh untuk hidup sehat ada didalam telur (Hidayah dan Mardiyono, 2009), selain kandungan proteinnya yang tinggi yaitu 12,8%-13,1%, telur juga mengandung air 70,8%-74%; lemak 11,5%-14,3%; komponen lain yaitu karbohidrat, kalori, kalsium, dan fosfor (Dirjen Gizi Departemen Kesehatan RI., 1989).

Telur asin adalah telur segar yang diolah dalam keadaan utuh dan diawetkan, sekaligus diasinkan dengan menggunakan bahan utama garam (Supriyadi, 2010). Telur asin adalah salah satu produk olahan telur yang pembuatannya sangat mudah dikerjakan. Pada prinsipnya proses pembuatan telur asin adalah penggaraman atau terjadinya proses ionisasi garam NaCl (Mayasari, 2007). Menurut Astawan (2003) rasa asin pada telur dikarenakan adanya proses osmosis pada telur yaitu garam NaCl mulamula akan diubah menjadi ion natrium ( $\text{Na}^+$ ) dan ion chlor ( $\text{Cl}^-$ ). Larutan garam (NaCl) akan masuk ke dalam telur melalui pori-pori kulit, menuju ke bagian putih, dan akhirnya ke kuning telur. Tujuan dari pembuatan telur asin adalah sebagai upaya untuk pengawetan dan untuk meningkatkan cita rasa dari telur.

Metode pengasinan telur yang selama ini dikenal adalah dengan pengasinan tradisional, yaitu perendaman dalam larutan garam dan pembalutan telur dalam adonan garam dengan bubuk bata merah atau dengan abu gosok. Penetrasi garam secara difusi pada pengasinan tradisional berlangsung secara lambat. Kecepatan penetrasi garam ini dapat dilakukan dengan meningkatkan kadar NaCl dalam larutan

perendam. Selain hal tersebut, agar penetrasi garam ke dalam telur dapat berlangsung lebih cepat, maka pengasinan telur juga bisa dilakukan dengan metode tekanan (Sujinem 2006). Pembuatan telur asin dibutuhkan larutan garam pekat dengan konsentrasi antara 25%-40% (Sarwono, 1994). Makin tinggi kadar garam dalam telur asin akan semakin meningkatkan daya simpan produk. Namun, di sisi lain akan menjadi tidak disukai oleh konsumen, karena rasanya yang terlalu asin. Oleh karena itu, harus di cari konsentrasi atau kadar garam yang tepat yang dapat memberikan daya simpan yang optimal dengan rasa yang masih dapat diterima (Suprpti, 2002). Standar mutu telur asin (SNI 01-4277-1996) menyatakan bahwa kadar garam telur asin minimal 2%.

#### **Spektrometri Serapan Atom (SSA)**

Spektrometri merupakan suatu metode analisis kuantitatif yang pengukurannya berdasarkan banyaknya radiasi yang dihasilkan atau yang diserap oleh spesi atom atau molekul analit. Salah satu bagian dari spektrometri ialah Spektrometri Serapan Atom (SSA), merupakan metode analisis unsur secara kuantitatif yang pengukurannya berdasarkan penyerapan cahaya dengan panjang gelombang tertentu oleh atom logam dalam keadaan bebas (Skoog et. al., 2000).

Sejarah SSA berkaitan erat dengan observasi sinar matahari. Pada tahun 1802 Wollaston menemukan garis hitam pada spektrum cahaya matahari yang kemudian diselidiki lebih lanjut oleh Fraunhofer pada tahun 1820. Brewster mengemukakan pandangan bahwa garis Fraunhofer ini diakibatkan oleh proses absorpsi pada atmosfer matahari. Prinsip absorpsi ini kemudian mendasari Kirchhoff dan Bunsen untuk melakukan penelitian yang sistematis mengenai spektrum dari logam alkali dan alkali tanah. Kemudian Planck mengemukakan hukum kuantum dari absorpsi dan emisi suatu cahaya. Menurutnya, suatu atom hanya akan menyerap cahaya dengan panjang gelombang tertentu (frekwensi), atau dengan kata lain ia hanya akan mengambil dan melepas suatu jumlah energi tertentu, ( $\epsilon = h\nu = hc/\lambda$ ). Kelahiran SSA sendiri pada tahun 1955, ketika publikasi yang ditulis oleh Walsh dan Alkemade & Milatz muncul. Dalam publikasi ini SSA direkomendasikan sebagai metode analisis yang dapat diaplikasikan secara umum (Weltz, 1976). Apabila cahaya dengan panjang gelombang tertentu dilewatkan pada suatu sel yang mengandung atom-atom bebas yang bersangkutan maka sebagian cahaya tersebut akan diserap dan intensitas penyerapan akan berbanding lurus dengan banyaknya atom bebas logam yang berada dalam sel. Hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi diturunkan dari (a) Hukum Lambert : Bila suatu sumber sinar monokromatik melewati

medium transparan, maka intensitas sinar yang diteruskan berkurang dengan bertambahnya ketebalan medium yang mengabsorpsi. (b) Hukum Beer : Intensitas sinar yang diteruskan berkurang secara eksponensial dengan bertambahnya konsentrasi spesi yang menyerap sinar tersebut. Dari kedua hukum tersebut diperoleh suatu persamaan:

$$I_t = I_0 \cdot e^{-(\epsilon bc)}, \text{ atau} \\ A = -\log I_t/I_0 = \epsilon bc$$

Keterangan :

$I_0$  = Intensitas sumber sinar

$I_t$  = Intensitas sinar yang diteruskan

$\epsilon$  = Absorptivitas molar

$b$  = Panjang medium

$c$  = Konsentrasi atom-atom yang menyerap sinar

$A$  = Absorbans

Dari persamaan di atas, dapat disimpulkan bahwa absorbansi cahaya berbanding lurus dengan konsentrasi atom (Day & Underwood, 1989).

Dalam metode SSA, sebagaimana dalam metode spektrometri atomik yang lain, contoh harus diubah ke dalam bentuk uap atom. Proses pengubahan ini dikenal dengan istilah atomisasi, pada proses ini contoh diuapkan dan didekomposisi untuk membentuk atom dalam bentuk uap. Secara umum pembentukan atom bebas dalam keadaan gas melalui tahapan-tahapan sebagai berikut (1) Pengisatan pelarut, pada tahap ini pelarut akan teruapkan dan meninggalkan residu padat. (2) Penguapan zat padat, zat padat ini terdisosiasi menjadi atom-atom penyusunnya yang mulamula akan berada dalam keadaan dasar. (3) Beberapa atom akan mengalami eksitasi ke tingkatan energi yang lebih tinggi dan akan mencapai kondisi dimana atom-atom tersebut mampu memancarkan energi.

### **Sel Atom**

Terdapat dua tahap utama yang terjadi dalam sel atom pada alat SSA dengan sistem atomisasi nyala. Pertama, tahap nebulisasi untuk menghasilkan suatu bentuk aerosol yang halus dari larutan contoh. Kedua, disosiasi analit menjadi atom-atom bebas dalam keadaan gas. Berdasarkan sumber panas yang digunakan maka terdapat dua metode atomisasi yang dapat digunakan dalam spektrometri serapan atom yaitu atomisasi menggunakan nyala dan atomisasi tanpa nyala (flameless atomization). Pada atomisasi menggunakan nyala, digunakan gas pembakar untuk memperoleh energi kalor sehingga didapatkan atom bebas dalam keadaan gas. Sedangkan pada atomisasi tanpa nyala digunakan energi listrik seperti pada atomisasi tungku grafit

(grafit furnace atomization). Diperlukan nyala dengan suhu tinggi yang akan menghasilkan atom bebas. Untuk alat SSA dengan sistem atomisasi nyala digunakan campuran gas asetilen-udara atau campuran asetilen-N<sub>2</sub>O. Pemilihan oksidan bergantung kepada suhu nyala dan komposisi yang diperlukan untuk pembentukan atom bebas.

### **Sumber Cahaya**

Sumber cahaya yang digunakan dalam alat AAS ialah lampu katoda berongga (hollow cathode lamp). Lampu ini terdiri dari suatu katoda dan anoda yang terletak dalam suatu silinder gelas berongga yang terbuat dari kwarsa. Katoda terbuat dari logam yang akan dianalisis. Silinder gelas berisi suatu gas lembam pada tekanan rendah. Ketika diberikan potensial listrik maka muatan positif ion gas akan menumbuk katoda sehingga terjadi pemancaran spektrum garis logam yang bersangkutan.

### **Monokromator dan Sistem Optik**

Berkas cahaya dari lampu katoda berongga akan dilewatkan melalui celah sempit dan difokuskan menggunakan cermin menuju monokromator. Monokromator dalam alat SSA akan memisahkan, mengisolasi dan mengontrol intensitas energi yang diteruskan ke detektor. Monokromator yang biasa digunakan ialah monokromator difraksi grating.

### **Detektor dan Sistem Elektronik**

Energi yang diteruskan dari sel atom harus diubah ke dalam bentuk sinyal listrik untuk kemudian diperkuat dan diukur oleh suatu sistem pemroses data. Proses pengubahan ini dalam alat SSA dilakukan oleh detektor. Detektor yang biasa digunakan ialah tabung pengganda foton (photomultiplier tube), terdiri dari katoda yang dilapisi senyawa yang bersifat peka cahaya dan suatu anoda yang mampu mengumpulkan elektron. Ketika foton menumbuk katoda maka elektron akan dipancarkan, dan bergerak menuju anoda. Antara katoda dan anoda terdapat dinoda-dinoda yang mampu menggandakan elektron. Sehingga intensitas elektron yang sampai menuju anoda besar dan akhirnya dapat dibaca sebagai sinyal listrik. Untuk menambah kinerja alat maka digunakan suatu mikroprosesor, baik pada instrumen utama maupun pada alat bantu lain seperti autosampler.

## **BAHAN DAN METODE**

### **Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Corong, Neraca Analitik, Labu Ukur 50 mL, Mikropipet, Pipet Volumetrik, Bulb, SSA (flame dan

furnace) "Agilent Technologies 200 Series AA", Microwave Digestor "Milestone Pro-24", Vessel Teflon, Shield Guard, Rotor, Thermo Well, Lampu katoda As, Cd, Hg dan Pb. Sedangkan bahan yang diperlukan adalah Telur Bebek, HNO<sub>3</sub> 0,1 N, HNO<sub>3</sub> 65%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, Larutan standar As, Cd, Hg dan Pb 1000 ppm, Matrix modifier 1000 ppm, Air Demineralisasi.

### **Cara Kerja**

#### **Pembuatan larutan standar As, Cd, Hg dan Pb**

Pembuatan larutan standar As, Cd dan Pb dilakukan menggunakan larutan induk dari masing-masing logam sebesar 1000 mg/L (ppm). Larutan tersebut lalu diencerkan menjadi 100 mg/L, 10 mg/L, 1 mg/L dan 100 µg/L. Untuk As dibuat menjadi 50 µg/L dan Pb 30 µg/L. Untuk Cd diencerkan kembali menjadi 10 µg/L, lalu dibuat menjadi 2 µg/L. Hasil pengenceran ini disebut dengan stock solution.

Sedangkan untuk Hg dilakukan pengenceran dari larutan induk sebesar 1000 mg/L menjadi 100 mg/L, 10 mg/L dan 100 µg/L. Kemudian dibuat deret standar dari 100 µg/L ke 1 µg/L, 2,5 µg/L, 5 µg/L, 7,5 µg/L dan 10 µg/L.

#### **Preparasi sampel telur bebek**

Preparasi sampel dilakukan sebanyak 10 cuplikan telur bebek, kemudian masing-masing timbang sebesar 0,2 hingga 0,3 gram dengan neraca analitik. Lalu masukkan ke dalam vessel teflon yang telah diberi label sesuai dengan nomor sampel.

#### **Pembuatan sampel recovery**

Sampel recovery dilakukan sebanyak 2 cuplikan telur bebek. Sampel ditimbang sebanyak 0,2 – 0,3 gram pada vessel teflon. Larutan standar As, Cd, Hg dan Pb dimasukkan ke masing-masing vessel.

#### **Proses destruksi sampel**

Destruksi sampel telur bebek dilakukan dengan proses destruksi basah menggunakan microwave digestor. Sampel uji dan sampel recovery di dalam vessel ditambah dengan HNO<sub>3</sub> 65% sebanyak 8 mL dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% sebanyak 2 mL. Vessel berisi sampel kemudian dipasang dengan tutup vessel, dimasukkan ke dalam shield guard, dan diberi nomor urut. Pada vessel nomor 1 dimasukkan thermo well. Selanjutnya masing-masing vessel dimasukkan ke dalam rotor sesuai dengan nomor urutannya dan untuk vessel nomor urut 1 dilakukan pemasangan thermocouple. Proses destruksi dilakukan dengan suhu 180°C. Setelah itu, alat ini akan melakukan destruksi selama 45 menit. Setelah proses destruksi selesai, vessel dapat diambil setelah suhu alat turun menjadi 40°C. Sampel uji dan sampel recovery yang telah didestruksi dipindahkan ke dalam labu

takar 50 mL dan ditera menggunakan air demineralisasi.

#### **Pengujian Logam Berat As, Cd, Hg dan Pb**

Bahan bakar berupa gas asetilena di dalam tabung gas dan udara melalui kompresor dibuka secara perlahan. Alat SSA dan komputer dinyalakan dan dipilih lampu katoda untuk logam As, Cd, Hg dan Pb. Untuk logam As, Cd dan Pb digunakan SSA furnace, sedangkan untuk logam Hg digunakan SSA cold vapour. Selanjutnya pastikan panjang gelombang untuk masing-masing lampu katoda telah sesuai. Panjang gelombang untuk lampu katoda As, Cd, Hg dan Pb secara berturut-turut yaitu . Setelah itu dilakukan optimasi lampu katoda serta sinyal. Setelah proses optimasi selesai, tungku pembakar (burner) dihidupkan sehingga api pembakaran siap digunakan. Lalu selang aspirator dimasukkan ke dalam tabung akuades untuk mencuci alat. Setelah itu, selang aspirator dimasukkan ke dalam stock solution dan secara otomatis dapat dibuat larutan deret standar dengan proses autodiluter. Kurva standar diplot antara konsentrasi deret standar terhadap absorbansi dan diperoleh nilai regresi linear berdasarkan persamaan  $y = a + bx$ .

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Pada bidang Kimia Analisis seringkali seorang analis kimia melakukan pengujian atau penelitian dimana hasil pengujiannya sulit untuk analisis unsur yang jumlahnya sangat sedikit. Hasil pengujian yang dilakukan berulang-ulang sering tidak sama sehingga sulit untuk dinyatakan hasil manakah yang sama atau mendekati harga sesungguhnya. Umumnya akan diambil nilai rata-rata, tetapi nilai rata-rata itu kurang cukup untuk mewakili harga yang sesungguhnya. Sehingga persoalan tersebut dibantu dengan pengolahan data secara statistik.

Telur asin adalah telur segar yang diolah dalam keadaan utuh dan diawetkan, sekaligus diasinkan dengan menggunakan bahan utama garam (Supriyadi, 2010). Telur asin adalah salah satu produk olahan telur yang pembuatannya sangat mudah dikerjakan. Pada prinsipnya proses pembuatan telur asin adalah penggaraman (Mayasari, 2007). Pembuatan telur asin dibutuhkan larutan garam pekat dengan konsentrasi antara 25% - 40% (Sarwono, 1994). Makin tinggi kadar garam dalam telur asin akan semakin meningkatkan daya simpan produk. Telur asin yang telah melalui proses penggaraman dimungkinkan mengalami penambahan kandungan tertentu, seperti mineral atau logam yang berasal dari lumpur atau sekam yang digunakan.

Dalam pengujian kandungan logam pada

telur asin digunakan metode yang ada di BPMSPH dengan alat SSA. Metode ini harus divalidasi dalam jangka waktu tertentu, hal ini bertujuan untuk mengetahui berapa banyak kandungan logam pada sampel serta mampu menunjukkan bahwa metode yang digunakan memberikan hasil yang dapat dipercaya. Validasi metode analitik adalah evaluasi sistematis dari suatu prosedur analitik untuk menunjukkan bahwa metode analitik yang dipakai secara ilmiah baik (Anonim, 2000). Manfaat dari validasi metode antara lain, 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, presisi, akurasi dan batas deteksi serta batas kuantifikasi.

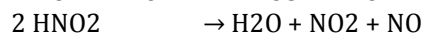
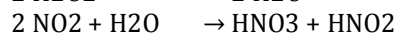
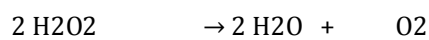
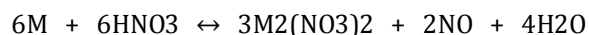
Pada pembuatan larutan standar logam digunakan larutan induk dari masing-masing logam sebesar 1.000 mg/L. Pelarut yang digunakan adalah HNO<sub>3</sub> 0,1 N, hal ini dikarenakan larutan standar tersebut berupa larutan dalam pelarut HNO<sub>3</sub>. Larutan tersebut diencerkan secara bertahap menjadi 100 mg/L, 10 mg/L, 1 mg/L dan 100 µg/L. Untuk As dibuat menjadi 50 µg/L dan Pb 30 µg/L. Untuk Cd diencerkan kembali menjadi 10 µg/L, lalu dibuat menjadi 2 µg/L. Larutan hasil pengenceran disebut dengan stock solution dan dapat langsung dimasukkan ke instrumen SSA furnace. Pada instrumen SSA furnace digunakan energi listrik yang berasal dari atomisasi tungku grafit (grafit furnace atomization), sehingga diperlukan nyala dengan suhu tinggi yang akan menghasilkan atom bebas. Selain itu pada SSA furnace tidak diperlukan pembuatan larutan deret standar, hal ini dikarenakan instrumen bersifat "automix" dan "autodelution". Dapat dikatakan bahwa instrumen akan membuat larutan deret standar secara otomatis untuk menghasilkan kurva linearitas. Pada analisis menggunakan SSA furnace dibutuhkan larutan matriks modifier yang bertujuan untuk mengurangi hilangnya kandungan logam yang ada pada sampel akibat pemanasan. Matriks modifier tersebut akan tereduksi terlebih dahulu dibanding dengan logam yang ada pada sampel. Sehingga jumlah logam dapat dianalisis secara optimal. Larutan matriks modifier dibuat dari larutan stok matriks modifier 10.000 mg/L menjadi 1.000 mg/L dengan pelarut HNO<sub>3</sub> 0,1 N.

Sedangkan untuk Hg dilakukan pembuatan deret standar dari 100 µg/L ke 1 µg/L, 2,5 µg/L, 5 µg/L, 7,5 µg/L dan 10 µg/L. Pembuatan larutan deret standar diperlukan karena digunakan instrumen SSA flame yang tidak bersifat "automix" dan "autodelution". Logam Hg dianalisis dengan SSA cold vapour karena sifatnya yang mudah menguap. Jika menggunakan SSA furnace

dikhawatirkan logam Hg yang terkandung dalam sampel hilang atau habis karena pemanasan.

Pada preparasi sampel, telur yang digunakan telah dilapisi dengan sekam hitam dan digarami. Bagian telur bebek yang digunakan adalah putih dan kuning telur. Tumbuk sampel hingga menjadi lebih lembut dan homogen. Timbang cuplikan telur asin sebesar 0,2 – 0,3 gram sebanyak 12 buah dan masukkan ke dalam vessel teflon yang telah diberi urutan nomor sampel. Sampel 12 buah tersebut dibagi menjadi 10 sampel uji dan 2 sampel recovery.

Sampel uji dan sampel recovery dibawa ke lemari asam untuk dilakukan penambahan HNO<sub>3</sub> 65% sebanyak 8 mL dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% sebanyak 2 mL. Penambahan HNO<sub>3</sub> bertujuan sebagai oksidator yang kuat sehingga mampu melarutkan hampir semua logam (Skoog, 2000). Sedangkan penambahan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bertujuan untuk menyempurnakan reaksi yang terjadi ditandai dengan terbentuknya larutan jernih (Afrianti dan Syahriar, 2011). Selain itu HNO<sub>3</sub> dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mendekomposisi sampel dengan sempurna. Reaksi yang terjadi yaitu:



(Svehla, 1990)

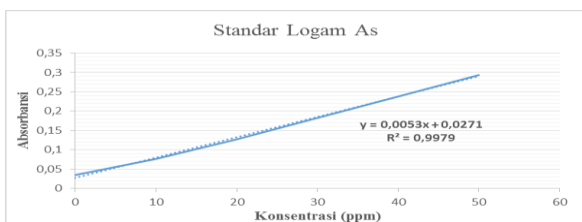
Seluruh vessel dimasukkan berdasarkan nomor urut ke alat microwave digestion system yang bertujuan untuk mendestruksi atau menghilangkan kandungan selain logam pada sampel. Destruksi yang digunakan adalah destruksi basah, yaitu pemanasan sampel (organik atau biologis) dengan pengoksidasi kuat seperti asam-asam mineral baik tunggal maupun campuran (Muchtadi, 2009). Jika sampel ditambahkan zat pengoksidasi, kemudian dipanaskan pada temperatur tertentu secara kontinu selama waktu yang cukup lama, maka sampel akan teroksidasi sempurna dan meninggalkan berbagai elemen-elemen pada larutan asam dalam bentuk senyawa anorganik (Anderson, 1987). Kesempurnaan destruksi ditandai dengan diperolehnya larutan jernih pada larutan destruksi, yang menunjukkan bahwa semua konstituen yang ada telah larut sempurna atau perombakan senyawa-senyawa organik telah berjalan dengan baik. Senyawa-senyawa garam yang terbentuk setelah destruksi merupakan senyawa garam yang stabil (Raimon, 1993). Selain itu, dihasilkan gas berwarna coklat dimana gas tersebut merupakan gas NO (hasil samping proses destruksi). Gas ini mengindikasikan bahwa bahan organik telah teroksidasi secara sempurna oleh

asam nitrat (Wulandari dan Sukaesih, 2013).

Penambahan air demineralisasi bertujuan untuk melarutkan sampel setelah destruksi. Air demineralisasi adalah air yang tidak terdapat kandungan logam atau mineral, sehingga sampel yang terdestruksi tidak terkontaminasi logam atau mineral lain. Sampel dimasukkan ke dalam tabung kecil untuk dianalisis dengan alat SSA dan diletakkan sesuai urutan pada alat SSA serta diatur dengan komputer untuk proses analisis.

### Uji Linearitas

Linearitas adalah suatu kemampuan metode analisis untuk mendapatkan hasil percobaan yang berbanding lurus dengan konsentrasi analit pada sampel. Parameter ini merupakan taraf ukur kurva kalibrasi antara respon (y) dan konsentrasi (x). Semakin tinggi konsentrasi suatu larutan standar, maka semakin besar absorbansi yang dihasilkan. Suatu metode dapat dikatakan linear apabila menghasilkan nilai regresi linear > 0,95 (FDA, 1987).

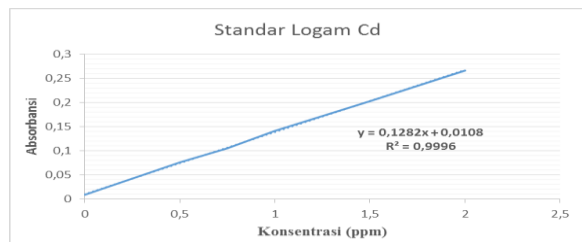


**Gambar 1.** Kurva Kalibrasi Logam As

**Tabel 1.** Parameter dan Nilai Pengujian Linearitas Logam As

Parameter	Nilai
Linearitas (Rentang (ppm))	0 – 50
Regresi Linear (R2)	0,9979
Intersep (a)	0,0271
Kemiringan (b)	0,0053

Persamaan linear yang diperoleh dari pengujian logam As adalah  $y = 0,0053x + 0,0271$  dengan regresi linear sebesar 0,9979. Nilai regresi linear yang didapatkan memiliki nilai yang lebih besar dari 0,95, sehingga hasil dikatakan linear. Pengujian logam As dengan metode SSA memiliki linearitas yang baik dikarenakan memenuhi syarat regresi linear.

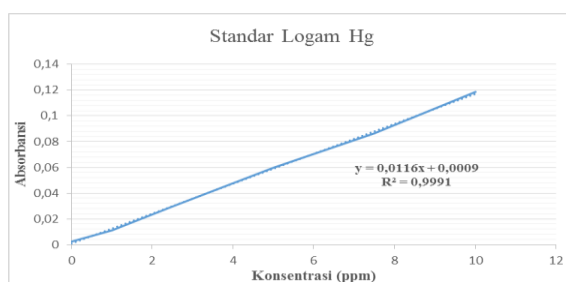


**Gambar 2.** Kurva Kalibrasi Logam Cd

**Tabel 2.** Parameter dan Nilai Pengujian Linearitas Logam Cd

Parameter	Nilai
Linearitas (Rentang (ppm))	0 – 2
Regresi Linear (R2)	0,9996
Intersep (a)	0,0108
Kemiringan (b)	0,1282

Persamaan linear yang diperoleh dari pengujian logam Cd adalah  $y = 0,1282x + 0,0108$  dengan regresi linear sebesar 0,9996. Nilai regresi linear yang didapatkan memiliki nilai yang lebih besar dari 0,95, sehingga hasil dikatakan linear. Pengujian logam Cd dengan metode SSA memiliki linearitas yang baik dikarenakan memenuhi syarat regresi linear.

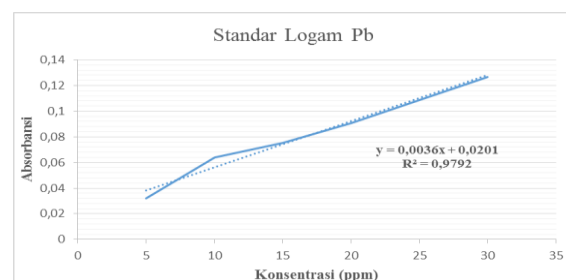


**Gambar 3.** Kurva Kalibrasi Logam Hg

**Tabel 3.** Parameter dan Nilai Pengujian Linearitas Logam Hg

Parameter	Nilai
Linearitas (Rentang (ppm))	0 – 10
Regresi Linear (R2)	0,9991
Intersep (a)	0,0009
Kemiringan (b)	0,0116

Persamaan linear yang diperoleh dari pengujian logam Hg adalah  $y = 0,0116x + 0,0009$  dengan regresi linear sebesar 0,9991. Nilai regresi linear yang didapatkan memiliki nilai yang lebih besar dari 0,95, sehingga hasil dikatakan linear. Pengujian logam Hg dengan metode SSA memiliki linearitas yang baik dikarenakan memenuhi syarat regresi linear.



**Gambar 4.** Kurva Kalibrasi Logam Pb



**Tabel 4.** Parameter dan Nilai Pengujian Linearitas Logam Pb

Parameter	Nilai
Linearitas (Rentang (ppm))	5 – 30
Regresi Linear (R <sup>2</sup> )	0,9792
Intersep (a)	0,0201
Kemiringan (b)	0,0036

Persamaan linear yang diperoleh dari pengujian logam Pb adalah  $y = 0,0036x + 0,0201$  dengan regresi linear sebesar 0,9792. Nilai regresi linear yang didapatkan memiliki nilai yang lebih besar dari 0,95, sehingga hasil dikatakan linear. Pengujian logam Pb dengan metode SSA memiliki linearitas yang baik dikarenakan memenuhi syarat regresi linear.

#### Uji Presisi

Presisi adalah suatu ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual yang diukur melalui penyebaran hasil individual. Pengujian presisi dilakukan untuk mengukur simpangan baku relatif (%RSD). Simpangan baku relatif adalah persamaan yang digunakan untuk membandingkan variasi relatif antara jumlah data. Nilai RSD yang didapatkan dibandingkan dengan CV Horwitz. CV Horwitz adalah suatu tetapan atau rumus untuk menentukan bahwa koefisien variasi dari data yang diperoleh dapat diterima, dimana nilai RSD harus lebih kecil dari 2/3 nilai CV Horwitz.

**Tabel 6.** Data hasil uji presisi logam As

No.	Sampel (X)	(Xi - X rata-rata) <sup>2</sup>
1	8,9671	0,024537029
2	8,805	2,98E-05
3	8,6434	0,027908041
4	8,7139	0,009323254
5	8,6414	0,028580269
6	9,3914	0,337494769
7	8,511	0,089674495
Jumlah	61,6732	0,517547637
Rata-Rata	8,810457	0,073935377
Standar Deviasi	0,29369702	
%RSD	3,333504893	
CV Horwitz	1,441430001	
2/3 CV Horwitz	0,965758101	

Berdasarkan data hasil pengujian presisi dari logam As, %RSD yang didapatkan adalah 3,333504893 %. Nilai tersebut tidak memenuhi persyaratan  $\%RSD < 2/3$  CV Horwitz (0,965758101 %), sehingga dapat dikatakan bahwa pengujian logam As dengan metode SSA memiliki ketelitian yang kurang baik dan tidak dapat diterima. Hal ini menyatakan bahwa

instrumen SSA yang digunakan perlu dikalibrasi ulang, sehingga analisis sampel dapat berlangsung lebih optimal.

**Tabel 5.** Data hasil uji presisi logam Cd

No.	Sampel (X)	(Xi - X rata-rata) <sup>2</sup>
1	1,0565	6,35E-05
2	1,0111	0,00140093
3	1,0478	5,31E-07
4	1,0504	3,50E-06
5	1,0624	0,000192405
6	1,0689	0,000414978
7	1,0426	3,52E-05
Jumlah	7,3397	3,52E-05
Rata-rata	1,048529	0,000301576
Standar Deviasi	0,01875737	
%RSD	1,78892342	
CV Horwitz	1,9857856	
2/3 CV Horwitz	1,33047635	

Berdasarkan data hasil pengujian presisi dari logam Cd, %RSD yang didapatkan adalah 1,78892342 %. Nilai tersebut tidak memenuhi persyaratan  $\%RSD < 2/3$  CV Horwitz (1,33047635 %), sehingga dapat dikatakan bahwa pengujian logam Cd dengan metode SSA memiliki ketelitian yang kurang baik dan tidak dapat diterima.

**Tabel 7.** Data hasil uji presisi logam Hg

No.	Sampel (X)	(Xi - X rata-rata) <sup>2</sup>
1	8,6246	0,023391561
2	8,5608	0,007946474
3	8,0515	0,176531905
4	8,4942	0,000508187
5	8,3047	0,02787464
6	8,3212	0,022637309
7	8,9446	0,223675081
Jumlah	59,3016	0,482565157
Rata-rata	8,4171657	0,06893788
Standar Deviasi	0,28359747	
%RSD	3,34760328	
CV Horwitz	1,44996273	
2/3 CV Horwitz	0,96664182	

Berdasarkan data hasil pengujian presisi dari logam Hg, %RSD yang didapatkan adalah 3,34760328 %. Nilai tersebut tidak memenuhi persyaratan  $\%RSD < 2/3$  CV Horwitz (0,96664182 %), sehingga dapat dikatakan bahwa pengujian logam Hg dengan metode SSA memiliki ketelitian yang kurang baik dan tidak dapat diterima.

**Tabel 8.** Data hasil uji presisi logam Pb

No.	Sampel (X)	$(X_i - \bar{X})^2$
1	9,5685	0,118375219
2	9,6282	0,163019715
3	9,2912	0,004456497
4	8,7582	0,217382535
5	8,3593	0,74847241
6	9,162	0,003899128
7	9,8037	0,335538672
Jumlah	64,5711	1,591144177
Rata-rata	9,224443	0,227306311
Standar Deviasi	0,514966694	
%RSD	5,582631951	
CV Horwitz	1,43150224	
2/3 CV Horwitz	0,959106501	

Berdasarkan data hasil pengujian presisi dari logam Pb, %RSD yang didapatkan adalah 5,582631951 %. Nilai tersebut tidak memenuhi persyaratan  $\%RSD < 2/3$  CV Horwitz (0,959106501 %), sehingga dapat dikatakan bahwa pengujian logam Pb dengan metode SSA memiliki ketelitian yang kurang baik dan tidak dapat diterima.

#### Uji Akurasi

Akurasi adalah kedekatan antara nilai hasil uji suatu metode analisis dengan nilai sebenarnya. Pengujian akurasi menggunakan recovery test atau uji perolehan kembali, dimana pengujian dilakukan dengan menggunakan 7 sampel pada kondisi yang sama dan dengan menambahkan standar logam hingga didapatkan konsentrasi sampel dalam jumlah tertentu sebelum dilakukan pengujian. Rentang nilai penerimaan akurasi suatu metode akan bervariasi sesuai kebutuhannya. Menurut AOAC (2002), rentang recovery yang dapat diterima berdasarkan jumlah analit sampel sebagai berikut.

**Tabel 9.** Rentang recovery berdasarkan jumlah analit dalam sampel

% Analit	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
0,00000001	1 ppb	40 – 120

Logam As dengan konsentrasi sampel kosong sebesar -0,8598  $\mu\text{g/L}$  memiliki nilai % recovery sebesar 96,70257 %. Hasil tersebut dibandingkan dengan rentang % recovery yang dapat diterima pada tabel (diatasnya), uji akurasi dengan penambahan spike 10 ppb maka nilai recovery berada dalam kisaran 60 – 115 %. Sehingga dapat dikatakan bahwa metode penentuan logam As secara SSA memiliki nilai akurasi yang baik karena memenuhi syarat penerimaan dari uji akurasi.

**Tabel 10.** Data hasil uji akurasi logam As

No.	Sampel ( $\mu\text{g/L}$ )	Sampel- Sampel Kosong ( $\mu\text{g/L}$ )	% R
1	8,9671	9,8269	98,269
2	8,805	9,6648	96,648
3	8,6434	9,5032	95,032
4	8,7139	9,5737	95,737
5	8,6414	9,5012	95,012
6	9,3914	10,2512	102,512
7	8,511	9,3708	93,708
jumlah	61,6732	67,6918	676,918
rata-rata	8,810457	9,670257	96,70257

Logam Cd dengan konsentrasi sampel kosong sebesar 0,0923  $\mu\text{g/L}$  memiliki nilai % recovery sebesar 95,62286 %. Hasil tersebut dibandingkan dengan rentang % recovery yang dapat diterima pada tabel (diatasnya), uji akurasi dengan penambahan spike 1 ppb maka nilai recovery berada dalam kisaran 40 – 120 %. Sehingga dapat dikatakan bahwa metode penentuan logam Cd secara SSA memiliki nilai akurasi yang baik karena memenuhi syarat penerimaan dari uji akurasi.

**Tabel 11.** Data hasil uji akurasi logam Cd

No.	Sampel ( $\mu\text{g/L}$ )	Sampel- Sampel Kosong ( $\mu\text{g/L}$ )	% R
1	1,0565	0,9642	96,42
2	1,0111	0,9188	91,88
3	1,0478	0,9555	95,55
4	1,0504	0,9581	95,81
5	1,0624	0,9701	97,01
6	1,0689	0,9766	97,66
7	1,0426	0,9503	95,03
jumlah	7,3397	6,6936	669,36
rata-rata	1,048529	0,956229	95,62286

Logam Hg dengan konsentrasi sampel kosong sebesar 0,0213  $\mu\text{g/L}$  memiliki nilai % recovery sebesar 84,50357 %. Hasil tersebut dibandingkan dengan rentang % recovery yang dapat diterima pada tabel (diatasnya), uji akurasi dengan penambahan spike 10 ppb maka nilai recovery berada dalam kisaran 60 – 115 %.

Sehingga dapat dikatakan bahwa metode penentuan logam Hg secara SSA memiliki nilai akurasi yang baik karena memenuhi syarat penerimaan dari uji akurasi.

**Tabel 12.** Data hasil uji akurasi logam Hg

No.	Sampel (µg/L)	Sampel- Sampel Kosong (µg/L)	% R
1	8,6246	8,6033	86,033
2	8,5608	8,5395	85,395
3	8,0515	8,0302	80,302
4	8,4942	8,4729	84,729
5	8,3047	8,2834	82,834
6	8,3212	8,2999	82,999
7	8,9446	8,9233	89,233
jumlah	59,3016	59,1525	591,525
rata-rata	8,471657	8,450357143	84,50357

Logam Pb dengan konsentrasi sampel kosong sebesar -0,3346 µg/L memiliki nilai % recovery sebesar 95,69043 %. Hasil tersebut dibandingkan dengan rentang % recovery yang dapat diterima pada tabel (diatasnya), uji akurasi dengan penambahan spike 10 ppb maka nilai recovery berada dalam kisaran 60 – 115 %. Sehingga dapat dikatakan bahwa metode penentuan logam Pb secara SSA memiliki nilai akurasi yang baik karena memenuhi syarat penerimaan dari uji akurasi.

**Tabel 13.** Data hasil uji akurasi logam Pb

No.	Sampel (µg/L)	Sampel- Sampel Kosong (µg/L)	% R
1	9,5685	9,9131	99,131
2	9,6282	9,9728	99,728
3	9,2912	9,6358	96,358
4	8,7582	9,1028	91,028
5	8,3593	8,7039	87,039
6	9,162	9,5066	95,066
7	9,8037	10,1483	101,483
jumlah	64,5711	66,9833	669,833
rata-rata	9,224443	9,569043	95,69043

#### **Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitas (LOQ)**

LOD adalah konsentrasi analit terkecil dalam sampel yang masih dapat diukur, dimana nilai tersebut dapat ditentukan melalui ratio Standar Deviation of Response and Slope. Sedangkan LOQ adalah konsentrasi terendah analit dalam sampel yang dapat dianalisis dengan presisi dan akurasi di bawah kondisi percobaan tertentu. Hasil pengujian LOD dan LOQ yang didapatkan dari logam As sebagai berikut :

**Tabel 14.** Limit deteksi dan kuantisasi logam As

Blanko	Konsentrasi (ppb) X	(X - )2
1	3,3775	0,04066
2	3,8769	0,088659
3	3,3879	0,036574
4	3,3154	0,06956
5	3,6531	0,00547
6	3,8705	0,084889
7	3,5727	4,15E-05
Jumlah	25,054	0,325853
Rata-rata	3,579143	0,04655
SD	0,233043	
LOD (ppb)	0,699128	
LOQ (ppb)	2,330427	

Hasil pengujian LOD dan LOQ yang didapatkan dari logam Cd sebagai berikut:

**Tabel 15.** Limit deteksi dan kuantisasi logam Cd

Blanko	Konsentrasi (ppb) X	(X - )2
1	0,177	0,00216
2	0,1147	0,000251
3	0,1778	0,002235
4	0,1272	1,11E-05
5	0,1147	0,000251
6	0,1115	0,000362
7	0,0908	0,001578
Jumlah	0,9137	0,006847
Rata-rata	0,130529	0,000978
SD	0,033781	
LOD (ppb)	0,101342	
LOQ (ppb)	0,337807	

Hasil pengujian LOD dan LOQ yang didapatkan dari logam Hg sebagai berikut:

**Tabel 15.** Limit deteksi dan kuantisasi logam Hg

Blanko	Konsentrasi (ppb) X	(X - )2
1	-0,1716	1,41E-05
2	-0,1633	0,000145
3	-0,1809	3,07E-05
4	-0,1838	7,12E-05
5	-0,174	1,85E-06
6	-0,1863	0,00012
7	-0,1676	6,02E-05
Jumlah	-1,2275	0,000443
Rata-rata	-0,17536	6,33E-05
SD	0,008595	
LOD (ppb)	0,025785	
LOQ (ppb)	0,085951	

Hasil pengujian LOD dan LOQ yang didapatkan dari logam Pb sebagai berikut:

**Tabel 16.** Limit deteksi dan kuantisasi logam Pb

Blanko	Konsentrasi (ppb) X	(X - )2
1	-2,7146	0,004696
2	-2,4989	0,021659
3	-2,4067	0,057298
4	-2,6337	0,000153
5	-2,1966	0,202023
6	-3,2391	0,351685
7	-2,8329	0,034905
Jumlah	-18,5225	0,67242
Rata- rata	-2,64607	0,09606
SD	0,334769	
LOD (ppb)	1,004306	
LOQ (ppb)	3,347685	

## KESIMPULAN

Metode uji untuk penentuan logam As, Cd dan Hg pada telur asin merupakan metode uji yang valid, sedangkan untuk logam Pb metode uji tidak valid atau perlu dikalibrasi

## DAFTAR PUSTAKA

1. AAS System Preventive Maintenance Checklist-Standard of Agilent Technologies. Manual Book of Agilent Technologies. 55 240 280 Series. 2016.
2. Anderson, R. 1987. Sample Pretreatment and Separation. Chicster: John Wiley and Sons. 94-95.
3. Anonymous. 2000. Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrometry. Singapore: Perkin Elmer Inc. 03030152E page 36
4. Anonymous. 2005. Persyaratan Umum Kompetensi Laboratorium Pengujian dan Laboratorium Kalibrasi: SNI 19-17025-2005 klausul 5.4.5. Edisi kedua: 16-17. Jakarta: BSN
5. Anonymous. 1998. The Fitness for Purposes of Analytical Method. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topic 1st. Page 1-40. United Kingdom: Eurachem Working Group
6. AOAC. 2005. Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists. Washington: Benjamin Franklin Station
7. Astawan, M. 2004. Bersahabat dengan Kolesterol. Solo: Tiga Serangkai
8. Chan, Chung Chow. 2004. "Potency Method Validation." In Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification,.
9. Day, Jr, R.A., and Underwood, A.L. 1989. Quantitative Analysis. Jakarta: Erlangga
10. Dirjen Gizi Departemen Kesehatan RI. 1989. Daftar Komposisi Bahan Makanan. Jakarta: Bharata
11. Food and Drug Administration (FDA). 2001. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. USA Rockville: Center for Drug Evaluation and Research. Pp 16
12. Gandjar, I.G, dan Rohman, A. 2014. Kimia Farmasi Analisis. Yogyakarta: Pustaka Pelajar
13. Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. Majalah Ilmu Kefarmasian. 1(3). Halaman 117-135
14. Harvey, David. 2000. The McGraw-Hill Companies Modern Analytic Chemistry.
15. Haswell, S., J. 1991. Atomic Absorption Spectrometry Theory, Design and Application. New York: Elsevier Science Publishing Company Inc
16. Hidayah, N, dan Mardiyono. 2009. Pengaruh waktu pengasinan terhadap kadar protein putih telur. Jurnal Biomedika. 2 (1) : 81-86
17. ICH. 2005. "ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)."
18. Mayasari, N. 2007. Memilih Makanan yang Halal. Tangerang: Quantum Media
19. Muchtadi, D. 2010. Teknik Evaluasi Nilai Gizi Protein. Bandung: Alfabeta
20. Perring & Andrey. 2001. Optimization and Validation of Total Mercury Determination in Food Products by Cold Vapour AAS: Comparison of Digestion Methods and with ICP-MS Analysis. Atomic Spectroscopy. 22. 371-378
21. Raimon. 1993. Perbandingan Metoda Destruksi Basah dan Kering Secara Spektrofotometri Serapan Atom. Lokakarya Nasional Jaringan Kerjasama Kimia Analitik Indonesia. Yogyakarta.
22. Riyanto. 2014. Validasi & Verifikasi Metode Uji. Edisi 1. Yogyakarta: deepublish
23. Sarwono. 1994. Pengawetan dan Pemanfaatan Telur. Jakarta: Penebar Swadaya
24. Skoog, D. A., Donald, M.W., James, H., Stanley, R.C. 2000. Fundamentals of Analytical Chemistry. Page 992. Brooks Cole
25. Sujinem. 2006. Percepatan penetrasi garam ke dalam telur itik (*Anas platyrhynchos*) dengan metode tekanan dalam proses pembuatan telur asin. Skripsi. Program Studi Teknologi Hasil Ternak. Fakultas Peternakan. Institut Pertanian Bogor, Bogor
26. Suprpti, M., L. 2002. Pengawetan Telur Asin, Tepung Telur dan Telur Beku. Yogyakarta: Kanisius
27. Supriyadi. 2009. Panduan Lengkap Itik.

- Jakarta: Swadaya Anggota IKAPI
29. Svehla, G. 1990. Vogel: Buku Teks Analisis Anorganik Kualitatif Makro dan Semimikro. Jakarta: Kalman Media Pustaka
  30. Weltz. 1976. Organic Spectroscopy. London: The Mamilan Press LTD
  31. Wulandari, E.A. dan Sukesu. 2013. Preparasi Penentuan Kadar Logam Pb, Cd dan Cu dalam Nugget Ayam Rumput Laut Merah (*Euclima cottonii*). Jurnal Sains dan Seni Pomits. 2(2),15-17

## Pengujian Residu Quinolon Kuantitatif Pada Daging Ayam Tahun 2017 Sampai Dengan Mei 2019 Dengan Metode Elisa Menggunakan Kit Ridascreen *Chinolone/Quinolones*

Riska Desitania<sup>1</sup>, Oli Susanti<sup>1</sup>, Attya Asuh Insani<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan Bogor

\*e-mail korespondensi penulis: attya@pertanian.go.id

### ABSTRAK

Selama 19 bulan, antara bulan September 2017 hingga Mei 2019, Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan telah menguji residu quinolon pada 31 sampel daging ayam dengan metode ELISA menggunakan Kit *Ridascreen Chinolones* dari R-biopharm. Dari pengujian tersebut didapatkan 11 sampel (35%) tidak terdeteksi residu quinolon, dan 20 (65%) sampel terdeteksi residu quinolon. Dari sampel yang terdeteksi, 10% sampel diatas 10 ppb, dan 90% kurang dari 10 ppb. 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 10 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

Larangan penggunaan antibiotik sebagai pemacu pertumbuhan berlaku efektif mulai Januari 2018. Seiring dengan itu, Kementerian Pertanian memperkuat 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.

RIDASCREEN® *Chinolone* adalah immunoassay enzim kompetitif untuk analisis kuantitatif *chinolones* dalam telur, daging sapi, babi, domba, ayam, kalkun, ikan dan udang. Inhibitor Gyrase dibagi menjadi empat subkelompok. Mayoritas *chinolones* termasuk dalam subkelompok fluorchinolones, yang memiliki gugus fluoro yang melekat pada sistem cincin pusat, biasanya di posisi ke-6. *Fluorchinolones* disebut *chinolones* generasi kedua.. *Fluorchinolones* adalah antibiotik spektrum luas terhadap banyak spesies bakteri. Antibiotik tersebut sering digunakan dalam kedokteran hewan terutama untuk hewan ternak seperti sapi, babi dan ayam. Penggunaan fluorchinolone telah meningkat dalam beberapa tahun terakhir karena sejumlah besar fluorchinolone diterapkan untuk mencegah penyakit menular, terutama pada peternakan ayam, babi dan ikan / udang.

### BAHAN 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*. Ke dalamnya ditambahkan larutan standar atau sampel, *ciprofloxacin enzym conjugate*, dan *anti-quinolone antibody*. Quinolone bebas dan *ciprofloxacin enzym conjugate* berkompetisi untuk menempel pada bagian quinolone antibody (*competitive enzyme immunoassay*). Pada saat yang bersamaan, anti-quinolone antibody juga menempel pada ikatan antibody yang telah ditempelkan di dalamnya. Setiap enzim konjugat yang tidak berikatan kemudian akan dibuang melalui proses pencucian/*washing*.

Substrat/*chromogen* ditambahkan ke dalam *wells* tersebut dan diinkubasi. Enzim konjugat yang terikat akan merubah *chromogen* yang menyebabkan larutan menjadi berwarna biru. Dengan penambahan *stop solution* kemudian merubah larutan menjadi berwarna kuning. Intensitas warna yang terbentuk kemudian diukur secara photometric pada panjang gelombang 450 nm; absorbansi yang diperoleh dalam perbandingan terbalik setara dengan proporsi konsentrasi quinolone dalam sampel.

#### Bahan dan Alat

Sediaan Reagent yang terdapat dalam Kit meliputi: *Microtiter*, 6 x Larutan Standar ciprofloxacin dalam methanol (volume masing-masing 1,3 mL): 0 ppb, 0,5 ppb, 1,5 ppb, 3 ppb, 6 ppb, dan 18 ppb, *Conjugate* (tutup merah), *Anti-quinolone antibody* (tutup hitam), *Red Chromogen Pro/Substrate* (tutup cokelat), *Stop solution* (tutup kuning), *Washing buffer*.

Kebutuhan alat: *Microtiter plate spectrophotometer* (450 nm), *Centrifuge*, *Shaker/vortex*, *Micropipettes* (20 – 200 µL dan 200 -1000 µL). Bahan yang dibutuhkan meliputi Methanol, dan *Destilate Water* (DW).

#### Prosedur Pengujian

**Preparasi sampel.** Sampel di homogenisasi. Sebanyak 1 g sampel daging ayam homogen ditambahkan dengan 4 mL methanol/air (70:30 v/v). Sentrifus selama 10 menit/ 4000 g/ pada suhu ruang dan supernatant diencerkan 1:2 (1+1) dengan *washing buffer*.

**Washing buffer.** encerkan *washing buffer* (dalam bentuk garam) dengan 100 mL DW (dapat digunakan selama 8 – 12 minggu dalam suhu ruang). Untuk setiap pengujian gunakan satu bagian ini, dan encerkan dengan DW (1:9). Gunakan 50 µL larutan untuk setiap well dalam pengujian

**Alur pengujian.** Siapkan jumlah well yang diperlukan dalam pengujian. Masukkan masing-masing sebanyak 50 µL larutan standar dalam berbagai konsentrasi. Masukkan masing-masing sebanyak 50 µL larutan conjugate (tutup merah) pada bagian dasar well. Masukkan masing-masing sebanyak 50 µL larutan antibody (tutup hitam), *mix* secara manual dengan hati-hati, inkubasi dalam *refrigerator* selama 1 jam. Buang larutan dalam *well* (tapping dengan kertas saring), cuci dengan menambahkan 250 µL *washing buffer* (lakukan 3 kali ulangan). Masukkan masing-masing sebanyak 100 µL larutan substrate (tutup cokelat), *mix* secara manual dengan hati-hati, inkubasi dalam suhu ruang selama 15 menit dengan keadaan gelap. Tambahkan 100 µL *stop solution* (tutup kuning) pada masing-masing *well*, *mix* secara manual dengan hati-hati dan ukur absorbansinya pada 450 nm (baca hasil pengujian dalam 30 menit setelah penambahan *stop solution*), kemudian dilakukan perhitungan hasil.

#### Perhitungan Hasil Uji

Perhitungan hasil uji dapat dilakukan dengan dua cara yaitu: *Rida®soft Win* (Art. No. Z9999) Manual:

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

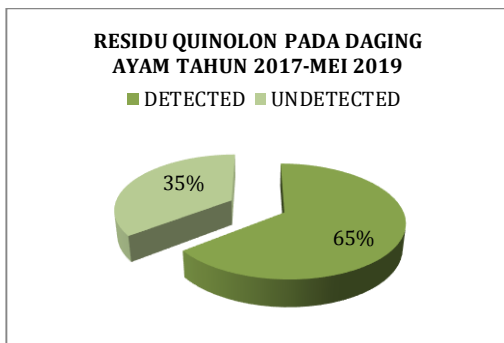
Standar nol yang dibuat setara dengan 100% dan nilai absorbansi dihitung dengan persentase. Nilai perhitungan untuk standar yang digunakan, dimasukkan ke dalam suatu sistem koordinat dari kertas grafik semilogaritma terhadap konsentrasi quinolone (µg/kg).

Untuk mendapatkan nilai aktual konsentrasi quinolone dalam µg/kg (ppb) yang terkandung dalam sampel, nilai konsentrasi dibaca dari kurva kalibrasi yang kemudian dikalikan dengan faktor pengenceran. Berdasarkan regulasi yang berlaku, faktor koreksi pengenceran Daging ( $\times 10$ ).

Selama 19 bulan, antara bulan September 2017 hingga Mei 2019, Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan telah menguji residu quinolon pada 31 sampel daging ayam dengan metode ELISA menggunakan Kit Ridascreen Chinolones dari R-biopharm.

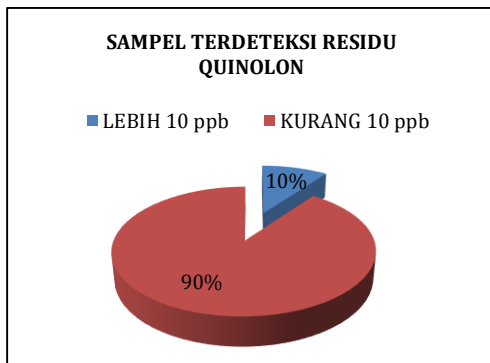
Dari pengujian tersebut didapatkan 11 sampel (35%) tidak terdeteksi residu quinolon, dan 20 (65%) sampel terdeteksi residu quinolon.





Gambar 1. Perbandingan residu quinolon pada daging ayam tahun 2017- Mei 2019

Dari sampel terdeteksi, 10% diatas 10 ppb, dan 90% kurang dari 10 ppb.



Gambar 2. Prosentase perbandingan sampel terdeteksi dibawah dan diatas LOD

Sebanyak 65% 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 (*withdrawaltime*) suatu obat hewan sehingga mengakibatkan munculnya residu pada produk ternak.

Waktu henti adalah kurun waktu dari saat pemberian obat terakhir hingga ternak boleh dipotong atau produknya dapat dikonsumsi. Walaupun peternak mengetahui adanya waktu henti obat, sebagian dari

mereka tidak mematuhi. Sekitar 50% penyimpangan residu obat pada produk ternak disebabkan tidak dipatuhi waktu henti pemberian obat.

Hasil ini menunjukkan bahwa metode pengujian saat ini cukup memadai digunakan untuk mengendalikan residu quinolon pada daging ayam. LOD yang cukup rendah, yaitu 10 ppb untuk sampel daging, kit ELISA yang digunakan cukup sensitif untuk deteksi residu quinolon.

## KESIMPULAN

Metode pengujian Quinolon saat ini cukup memadai digunakan untuk mengendalikan residu quinolon pada daging ayam dengan LOD yang cukup rendah, yaitu 10 ppb untuk sampel daging. Kit ELISA yang digunakan juga cukup sensitif untuk deteksi residu Quinolon.

Untuk melindungi konsumen dari paparan antibiotik, khususnya golongan quinolon pada daging ayam, perlu dilakukan monitoring agar didapatkan data yang mewakili di setiap daerah. Selain itu juga disarankan mengembangkan metode pengujian baik untuk skrining (kualitatif) maupun kuantitatif yang lebih ekonomis dan efisien untuk skrining residu quinolon pada daging ayam.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Farmakologi dan Terapi, edisi 5, Departemen Farmakologi Terapeutik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, 2007.
2. Permentan 14/2017 tentang Klasifikasi Obat Hewan. Kementerian Pertanian RI.
3. R-Biopharm kit ELISA Chinolones prosedur.

## **Validasi Metode Pengujian Logam Berat Menggunakan Instrument *Induced Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS)* pada Sampel Daging Unggas**

**Puji Rahayu, Ervina Anggraini Wijaya, Elok Kania, Sani Susanti, Dini Tri Mardiani**

<sup>1</sup>Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

<sup>2</sup>Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor

\*Email korespondensi penulis: pujirahayu@pertanian.go.id

### **ABSTRACT**

*Turkey is a high source of protein, so the need for animal protein in turkey is increasing. Turkey in its processing has the potential to be contaminated by foreign substances such as heavy metals which can be sourced from distribution, processing or packaging. Heavy metals such as cadmium (Cd), mercury (Hg), lead (Pb) and arsenic (As) can become contaminants in turkey meat. Determination of Cd, Hg, Pb, and As levels can be determined using Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS). According to ISO / IEC 17025 International Standards a test method must be validated in order to produce accurate and reliable data. The parameters used to get good results in validating the test methods include accuracy, precision, detection limits and quantity limits.*

*Turkey meat was added with the standard Cd, Hg, Pb and As 5 µg / L then it was destructed using microwave digestion with HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution then measured using ICP-MS. Based on the results of experiments conducted, the method used to determine the metal content of Cd, Hg, Pb and As using ICP-MS r<sup>2</sup> values respectively 0.9997, 0.9850, 0.9912, 0.9992. This method has a detection limit value of 0.0010, 0.0006, 0.0001, 0.0046 and the quantity limit 0.0034, 0.0020, 0.0002, 0.0155. The accuracy value obtained was 98.75%, 63.56%, 77.83%, 109.33%. The precision values obtained from this method are 3.70%, 7.33%, 39.48%, 6.38%. Pb metal precision values need to be re-tested precision. Based on the validation parameters that have been tested in the method of determining the metals Pb, Cd, Hg and As have met the acceptance requirements and the method can be used for routine analysis.*

**Keywords:** *poultry meat, heavy metals, ICP-MS*

### **PENDAHULUAN**

Logam digolongkan menjadi dua, yaitu logam ringan dan logam berat. Logam ringan memiliki densitas di bawah 5 g/cm<sup>3</sup> dan logam berat memiliki densitas di atas 5 g/cm<sup>3</sup> (Agustina 2010). Menurut Agen Lingkungan Amerika Serikat (EPA) terdapat 13 elemen logam berat yang diketahui berbahaya bagi lingkungan. Empat diantaranya yang berbahaya yaitu kadmium (Cd), merkuri (Hg), timbal (Pb), dan arsen (As). Beberapa logam berat sebenarnya unsur esensial yang sangat dibutuhkan setiap makhluk hidup namun beberapa diantaranya dalam kadar tertentu dapat bersifat racun. Keberadaan logam berat di lingkungan dapat berasal dari dua sumber yaitu dari alam dengan kadar yang relatif kecil dan dari antropogenik yang disebabkan oleh aktivitas manusia (Fernanda 2012). Menurut SNI 7387:2009 produk pangan yang diproduksi, di impor dan diedarkan di wilayah Indonesia harus memenuhi persyaratan keamanan, mutu dan gizi pangan termasuk persyaratan batasan maksimum cemaran logam berat. Produk daging termasuk

daging unggas, dan hasil olahannya memiliki nilai ambang batas cemaran logam kadmium 0.3 mg/kg, merkuri 0.03 mg/kg, timbal 1.0 mg/kg, dan arsen 0.5 mg/kg.

Kalkun merupakan hewan unggas, berasal dari Amerika Utara yang telah dikonsumsi sejak lama oleh suku indian. Daging kalkun memiliki kandungan protein 30.5% dan kandungan lemak 11.6%. Apabila dibandingkan dengan daging sapi, kandungan protein daging kalkun lebih tinggi 3.5% dan kandungan lemak lebih rendah 5.5%. Daging kalkun mengandung asam amino yang lengkap sehingga kalkun dapat digunakan sebagai makanan pengganti daging sapi untuk memenuhi gizi masyarakat (Prayitno dan Murad 2009). Daging kalkun masih jarang dikonsumsi oleh masyarakat di Indonesia karena kalkun masih jarang ditemukan di pasar tradisional maupun modern untuk kebutuhan konsumsi. Menurut Badan Pusat Statistik, jumlah usaha peternakan kalkun yang sedikit membuat daging kalkun jarang ditemukan di pasaran. Masalah lingkungan yang serius dapat menyebabkan kalkun terkontaminasi logam berat. Sumber utama logam dalam daging

kalkun muncul dari kontaminasi pakan unggas, sumber air minum dan pengolahan (Iwegbue et al. 2008).

Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) merupakan teknik analitik yang digunakan untuk analisis berbagai jenis unsur. 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, quardpole, spektrofotometer massa dan detektor. Prinsip kerja dari alat 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. Aerosol masuk ke plasma torch, plasma suhu tinggi ini akan memisahkan pelarut yang tersisa yang akan menyebabkan sampel mengalami atomisasi dan ionisasi. Gas argon digunakan sebagai sumber nyala plasma. Terdapat ion positif dan elektron di dalam plasma, wujud plasma dilihat sebagai nyala untuk media ionisasi. Suhu nyala plasma dapat mencapai 10.000K.

Unsur yang telah mengalami ionisasi akan memasuki spektrofotometer massa. Penganalisis yang digunakan adalah quadrupole yang terdiri dari empat buah batang serbentuk silinder yang memisahkan unsur berdasarkan rasio massa dan muatan ( $m/z$ ). Dasar pemisahan ini berdasarkan gerakan ion dalam medan magnet. Quadrupole beroperasi menggunakan arus AC/DC yang akan dialirkan secara berlawanan pada keempat batang silinder. Hanya ion dengan massa tertentu saja yang dapat melewati quadrupole 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).

Metode yang digunakan di dalam laboratorium kimia harus di uji dan dievaluasi untuk memastikan metode tersebut mampu menghasilkan data yang valid sesuai dengan tujuan maka harus dilakukan validasi (Riyanto 2014). Validasi adalah sebuah proses yang memakan waktu dan harus dilakukan hanya setelah metode telah dioptimalkan dan stabil, karena perubahan berikutnya akan memerlukan validasi ulang. Stabilitas validasi juga harus diverifikasi oleh pemeriksaan berkala dari bahan referensi yang stabil (AOAC 2002). Tujuan validasi metode untuk mengetahui sejauh mana penyimpangan suatu metode tidak dapat dihindari pada kondisi normal ketika seluruh elemen terkait telah dilaksanakan dengan baik dan benar, maka dengan memvalidasi metode tingkat kepercayaan

yang akan dihasilkan oleh suatu metode pengujian dan kalibrasi dapat diperkirakan dengan pasti (Hadi 2007). Validasi metode penting dilakukan untuk memperoleh data yang konsisten, dapat dipercaya, dan akurat. Pelaksanaan validasi meliputi prosedur analitis yang lengkap, seperti pencuplikan contoh, preparasi, analisis dan pelaporan data hasil evaluasi (Harmita 2004). Validasi terhadap metode analisis menjadi faktor penting karena hanya metode analisis yang telah dibuktikan validasinya, sehingga hasil pengukurannya dapat dipertanggungjawabkan dan digunakan sebagai landasan dalam perhitungan berikutnya. Beberapa parameter yang digunakan dalam melakukan validasi meliputi akurasi, presisi, linieritas, batas deteksi, batas kuantitasi (Sugihartini et al. 2014).

## BAHAN DAN METODE

### Metode Analisis

#### *Pembuatan larutan standar*

Larutan standar kadmium (Cd), merkuri (Hg), timbal (Pb) dan arsen (As) dengan konsentrasi 1000 ppm diencerkan menjadi 1000 ppb dalam labu takar 20 mL. Deret standar dibuat dengan konsentrasi 1.0; 2.5; 5.0; 7.5; 10.0; 15.0 dan 20 ppb dalam labu takar 20 mL lalu ditera menggunakan HNO<sub>3</sub> 5%. Perhitungan pembuatan larutan dapat dilihat pada Lampiran 9.

#### *Preparasi sampel daging kalkun*

Daging kalkun dihaluskan menggunakan alat homogenizer. Sampel daging kalkun yang sudah halus, ditimbang sekitar 0.3 g ke dalam tabung microwave digestion kemudian masing-masing dispiki dengan standar logam Cd, Hg, Pb dan As dengan konsentrasi 5 ( $\mu\text{g/L}$ ). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% b/b ditambahkan sebanyak 2 mL kedalam masing-masing tabung selanjutnya HNO<sub>3</sub> 65% ditambahkan sebanyak 8 mL, dimasukkan ke vessel lalu dilakukan digesti menggunakan microwave digestion Ethos One selama 4 jam. Setelah proses digesti selesai, sampel didinginkan, dipindahkan ke dalam labu takar 50 mL secara kuantitatif kemudian ditera menggunakan aquabides.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

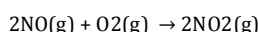
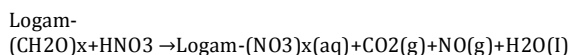
Sampel yang dianalisis adalah daging kalkun. Apabila kandungan logam berat yang terdapat dalam daging kalkun melebihi nilai ambang batas menyebabkan daging tersebut tidak layak untuk dikonsumsi karena logam yang terkandung akan terakumulasi di dalam tubuh. Logam berat yang telah terakumulasi dalam tubuh kalkun, tidak hanya membahayakan kalkun saja namun dapat membahayakan konsumen yang memakan daging tersebut jika terakumulasi pada

jumlah yang besar. Adanya cemaran logam berat dalam produk-produk olahan tersebut menjadi faktor penting dilakukannya analisis kandungan logam berat. Salah satu cara dalam menganalisis kandungan logam berat adalah menggunakan ICP-MS.

Analisis kadar logam berat kadmium (Cd), merkuri (Hg), timbal (Pb) dan arsen (As) pada daging kalkun menggunakan ICP-MS melalui beberapa tahapan penting yaitu, pembuatan deret standar, preparasi sampel, dan analisa menggunakan instrumen. Validasi metode analisis dilakukan agar hasil yang diperoleh dengan metode tersebut sesuai dengan hasil sebenarnya dan dapat dipercaya. Terdapat delapan parameter validasi metode analisis yaitu spesifitas, presisi, akurasi, linearitas, kisaran limit deteksi, limit kuantitasi dan ketangguhan (AOAC 2015). Pada praktik kerja lapangan dilakukan validasi metode yang meliputi parameter akurasi, presisi, linearitas, limit deteksi dan limit kuantitasi.

### Proses Preparasi sampel

Tahapan proses preparasi sampel, daging kalkun ditimbang sebanyak 0.3g dan di destruksi menggunakan microwave digestion untuk memutuskan ikatan logam dengan matriks sampel agar diperoleh unsur logam dalam bentuk yang bebas. Metode destruksi basah dipilih karena unsur yang akan dianalisis memiliki konsentrasi yang rendah dan lebih efektif digunakan untuk menganalisis unsur yang mudah menguap seperti merkuri. Kadar logam ditentukan menggunakan campuran  $\text{HNO}_3$  -  $\text{H}_2\text{O}_2$  sebagai pelarut karena dapat menghasilkan recovery yang baik. Destruksi sampel menggunakan larutan  $\text{HNO}_3$  pekat yang bertindak sebagai oksidator kuat, adanya pemanasan pada proses destruksi, akan mempercepat pemutusan ikatan organologam menjadi anorganik. Ketika proses destruksi berlangsung, akan menimbulkan gelembung gas berwarna coklat tipis, yaitu gas  $\text{NO}_2$  (hasil samping proses destruksi menggunakan asam nitrat). Adanya gas tersebut mengindikasikan bahwa bahan organik telah dioksidasi secara sempurna oleh asam nitrat. Berikut ini reaksi yang terjadi antara asam nitrat dan bahan organik :



(Wulandari dan Sukei 2013)

Sampel ditambahkan dengan  $\text{H}_2\text{O}_2$  untuk mengurangi kandungan karbon pada hasil digesti. Penambahan  $\text{H}_2\text{O}_2$  juga berfungsi sebagai agen pengoksidasi yang dapat menyempurnakan reaksi. Campuran  $\text{HNO}_3$  dan  $\text{H}_2\text{O}_2$  dapat bereaksi dengan baik sehingga mampu mendekomposisi sampel

dengan sempurna (Eka dan Sukei 2013). Hasil destruksi larutan kemudian di tera dalam labu takar 50 mL dengan menggunakan aquabides.

### Validasi Metode

#### Akurasi dan Presisi

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (%recovery) analit yang ditambahkan. Akurasi dapat ditentukan dengan metode penambahan baku standar atau metode adisi standar. Uji akurasi dilakukan pengukuran pada sampel yang sudah diketahui konsentrasi Cd, Hg, Pb, dan As sebagai pembanding dan sebelas sampel yang ditambahkan larutan standar dengan konsentrasi 5  $\mu\text{g/L}$ . Data hasil pengukuran uji akurasi dapat dilihat pada Lampiran 1. Hasil pengukuran uji akurasi dapat dilihat pada Tabel 1

**Tabel 1.** Hasil uji akurasi dan presisi logam Cd, Hg, Pb dan As

Ulangan	[Cd] [ $\mu\text{g/L}$ ]	[Hg] [ $\mu\text{g/L}$ ]	[Pb] [ $\mu\text{g/L}$ ]	[As] [ $\mu\text{g/L}$ ]
1	4.707	3.635	2.941	4.822
2	4.869	3.572	3.610	5.159
3	4.705	3.311	2.412	5.082
4	4.801	3.187	3.785	5.343
5	4.921	3.231	3.085	5.344
6	5.012	3.332	5.014	5.591
7	5.348	3.082	7.135	5.523
8	4.792	2.829	3.242	5.721
9	4.934	3.145	3.557	5.836
10	4.964	3.020	5.940	5.810
11	5.029	3.072	2.085	5.901
Rata-rata	4.917	3.220	38.915	5.467
SD	0.182	0.236	15.365	0.349
% Recovery	98.75	63.56	77.83	109.33
% SBR	3.70	7.33	39.48	6.38
2/3CV Horwitz	35.61	37.95	24.59	35.05

Berdasarkan hasil percobaan uji akurasi pada Tabel 1 sampel uji yang di tambahkan standar dengan konsentrasi masing-masing logam 5  $\mu\text{g/L}$ , dapat dilihat bahwa % Perolehan Kembali yang diperoleh logam Cd, Hg, dan As sudah memenuhi syarat keberterimaan yaitu 60-125%. Menurut AOAC (2015), nilai persen recovery yang dapat diterima sebesar 60-125 %. Nilai %perolehan kembali yang ideal yaitu 100%, apabila nilai tersebut kurang atau lebih maka dapat terjadi kesalahan saat pengukuran sampel. Kesalahan yang terjadi dapat bersifat acak. Kesalahan acak tidak dapat dihilangkan namun dapat diminimalkan dengan melakukan penentuan berulang. Kesalahan acak dapat muncul karena ada perubahan terhadap kesalahan sistematik (Sasongko et al. 2017).

Pengujian presisi dilakukan untuk mengetahui kedekatan atau kesesuaian antara hasil uji yang satu dengan yang lainnya dalam serangkaian pengujian. Presisi hasil pengujian

digambarkan dalam bentuk persentase Relative Standar Deviation (%RSD) atau standar baku relative (%SBR). Jenis uji presisi yang dilakukan termasuk jenis keterulangan (repeatability). Kriteria seksama diberikan apabila metode menghasilkan nilai % RSD  $\leq 2\%$  namun kriteria ini fleksibel tergantung konsentrasi analit yang akan dianalisis, jumlah sampel serta kondisi dari laboratorium. Koefisien variasi atau nilai RSD akan meningkat dengan menurunnya kadar analit yang di analisis. Pada kadar 1% atau lebih, standar deviasi relatif antara laboratorium sekitar 2.5%. pada satu per seribu adalah 5%. Pada kadar satu persejuta (ppm) RSD nya adalah 16%, dan pada kadar part per billion (ppb) adalah 32%. Akan tetapi pada metode yang sangat kritis, secara umum diterima bahwa RSD harus lebih dari 2% (Harmita 2004). Berdasarkan hasil uji keterulangan Tabel 1 menghasilkan nilai (%RSD) yang pada logam Cd, Hg, dan As dibawah 32%, maka metode uji penentuan logam tersebut memiliki nilai presisi yang baik namun logam Pb mempunyai presisi yang tidak baik. Logam Pb menghasilkan nilai yang besar yaitu 39.48 %. Tingginya nilai tersebut disebabkan rendahnya kadar analit yang di analisis, beberapa hal yang mempengaruhi adalah kesalahan acak (random error), yaitu variasi suhu atau pereaksi, keragaman teknik, ketidakstabilan instrumen, serta operator yang berbeda (Riyanto 2014).

Presisi pengukuran kuantitatif dapat ditentukan dengan menganalisis contoh berulang dan menghitung nilai simpangan baku relatifn (SBR) kemudian dari nilai simpangan baku dapat dihitung nilai 2/3 coefisien variasi (CV) horwitz. Nilai 2/3 CV Horwitz yang diperoleh lalu akan dibandingkan dengan %SBR. CV Horwitz yang merupakan kurva berbentuk terompet yang menghubungkan reproduibilitas dan konsentrasi analit. Syarat keberterimaan, digunakan koefisien variasi Horwitz hal ini berlaku di Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan. Uji keterulangan yang dilakukan memiliki ketelitian yang baik apabila CV atau %SBR yang diperoleh lebih kecil dari 2/3 %CV Horwitz. Berdasarkan Tabel 1, hasil perhitungan %SBR yang diperoleh Cd, Hg, dan As lebih kecil dibandingkan nilai 2/3 %CV Horwitz artinya ketelitian analisis yang telah dilakukan baik dan telah memenuhi syarat keberterimaan. Namun hasil untuk logam Pb masih belum memenuhi syarat keberterimaan.

### Linearitas

Parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi pada analisis regresi linier  $y = a + bx$ . Hubungan linier yang  $r = +1$  atau  $-1$  akan bergantung pada arah garis. Nilai  $a$  menunjukkan kepekaan analisis instrumen yang dipakai. Uji linearitas dilakukan dengan membuat deret standar dengan tujuh titik konsentrasi

masing-masing logam Cd, Hg Pb dan As yaitu 1.0; 2.5; 5.0; 7.5; 10.0; 15.0 dan 20  $\mu\text{g/L}$ . Menurut AOAC (2015) nilai koefisien korelasi yang baik  $\geq 0.995$  sedangkan menurut Chan et al (2004) nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) yang baik  $\geq 0.997$ . Hasil pengukuran linearitas pada standar Cd, Hg, Pb dan As dapat dilihat pada Tabel 2

**Tabel 2.** Hasil uji linearitas standar Cd, Hg, Pb dan As

Parameter	Cd	Hg	Pb	As
Persamaan regresi	$y = -513.88 + 20543x$	$y = -38882 + 36475x$	$y = 1081853 + 301506x$	$y = 668.53 + 4459.6x$
Intersep	-513.88	-38882	1081853	668.53
Koefisien Determinasi ( $R^2$ )	0.9997	0.9850	0.9912	0.9992
Koefisien Korelasi ( $r$ )	0.9998	0.9925	0.9956	0.9996

Berdasarkan Tabel 2 didapatkan nilai koefisien korelasi  $> 0.995$  pada logam Cd, Pb dan As. Logam Cd dan As memiliki nilai koefisien determinasi ( $R^2$ )  $\geq 0.997$ . Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada kisaran konsentrasi 1.0 sampai dengan 20 ppb Cd dan As dapat menghasilkan hubungan linear yang baik antara konsentrasi dengan intensitas yang terbaca sehingga metode ini dikatakan memiliki sensitivitas yang baik pada pengukuran logam Cd dan As. Perubahan konsentrasi akan berpengaruh terhadap intensitas yang dihasilkan. Hasil uji linearitas tersebut menunjukkan bahwa pengujian deret Cd dan As yang dilakukan masih dapat memberikan respon yang linear dan memenuhi syarat keberterimaan.

### Batas deteksi dan Batas kuantitasi

Batas deteksi dan batas kuantitasi dilakukan dengan cara pengukuran tujuh kali ulangan konsentrasi standar dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linear dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai kemiringan garis atau slope ( $b$ ) pada persamaan garis regresi linear  $y = a + bx$ , sedangkan simpangan baku blangko sama dengan simpangan baku intersep (Chan et al. 2004). Data yang dihasilkan dapat dilihat pada Lampiran. Hasil penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dilihat pada Tabel 3.

Berdasarkan hasil pada Tabel 3 dapat diketahui bahwa kadar logam Pb, Hg, Cd, dan As yang terbaca oleh instrumen ICP-MS Qtegra merupakan sinyal analit masing-masing logam. Apabila konsentrasi analit yang diperoleh  $< \text{LOD}$ , sinyal tersebut tidak dapat dipercaya sebagai analit. Jumlah terkecil analit yang dapat dikuantitasi dengan tingkat akurasi dan presisi yang dapat diterima oleh instrument ICP-MS

Qtegra dapat dilihat pada Tabel 3, apabila kadar analit lebih kecil dari nilai LOQ yang diperoleh maka analit yang terbaca tidak dapat dikuantitasi dengan baik.

**Tabel 3.** Hasil penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi

Konsentrasi [µg/L]	[Cd] [µg/L]	[Hg] [µg/L]	[Pb] [µg/L]	[As] [µg/L]
1.0	1.016	0.638	3.786	0.943
2.5	2.472	1.238	6.333	2.374
5	4.975	2.237	9.700	4.789
7.5	7.306	6.104	11.047	7.135
10	9.764	8.853	12.787	9.486
15	15.042	14.507	18.126	15.084
20	20.092	19.662	24.082	19.945
Rata-rata	86.667	76.056	122.659	85.366
SD	68.893	72.424	69.451	68.989
LOD	0.0010	0.0006	0.0001	0.0046
LOQ	0.0034	0.0020	0.0002	0.0155

## KESIMPULAN

Berdasarkan parameter validasi yang telah diuji dalam metode penentuan logam Pb, Cd, Hg dan As telah memenuhi persyaratan penerimaan dan metode tersebut dapat digunakan untuk analisis rutin.

## DAFTAR PUSTAKA

- [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. 2002. Official Method of Analysis of AOAC International. Ed ke-18. Marland: AOAC International.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. 2015. Official Method of Analysis of Heavy Metal In Food (US): AOAC International
- Agustina T. Kontaminasi logam berat pada makanan dan dampaknya pada kesehatan. Jurnal TEKNUBUGA 2(2): 53-65.
- Anindhita MA, Siska R, Soeprapto H. 2014. Analisis Logam Berat Timbal (Pb) pada Ikan Lele (*Claria sp.*) yang di Budidayakan di Kota Pekalongan. Pekalongan: Hasil Penelitian Fakultas Pertanian Universitas Jendral Soedirman.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. Standar Nasional Indonesia. SNI 7387:2009. Batas Maksimum Cemar Logam Berat Pada Pangan. Jakarta (ID): Badan Standardisasi Nasional
- Chan CC, Herman L, Lee YC, Xue-Ming Z. 2004. Analytical method validation and Instrument Performance Verification . New Jersey (US): John Woley and Sons Inc
- Fernanda L. 2012. Studi Kandungan Logam Berat Timbal (Pb), Nikel (Ni), Kromium (Cr) Dan Kadmium (Cd) Pada Kerang Hijau (*Perna viridis*) Dan Sifat Fraksionasinya Pada Sedimen Laut [Skripsi]. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Depok.
- Hadi A. 2007. Pemahaman dan Penerapan ISO/IEC 17025:2005. Jakarta (ID): PT Gramedia Pustaka.
- Harmita. 2004. Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya. Majalah Ilmu Kefarmasian. 1(3): 117-135.
- Harvey D. 2000. Modern Analytical Chemistry. United States (US): Mc Graw Hill Companies.
- Istarani F, Ellina SP. 2007 Studi dampak arsen (As) dan kadmium (Cd) terhadap penurunan kualitas lingkungan. Jurnal Teknik Pomits 3(1): 53-57.
- Iwegbue CMA, Nwajei GE, Iyoha EH. 2008. Heavy metal residues of chicken meat and gizzard and turkey meat consumed in southern Nigeria. Burgarian Journal of Veterinary Medicine 11(4) : 275-280.
- Palar H. 2004. Pencemaran dan Toksikologi Logam Berat. Jakarta (ID): Rineka Cipta
- Prayitno DS, Murad BC. 2009. Manajemen Kalkun Berwawasan Animal Welfare. Semarang (ID): Badan Penerbit Universitas Diponegoro
- Riyanto. 2014. Validasi dan Verifikasi Metode Uji Sesuai dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi. Yogyakarta (ID): Deepublish.
- Sasongko A, Yulianto Y, Sarastri D. 2017. Verifikasi Metode Penentuan Logam Kadmium (Cd) dalam Air Limbah Domestik dengan Metode Spektrofotometri Serapan Atom. Jurnal Sains dan Teknologi. 6 (2): 228 – 237.
- Sugihartini N, Fudholi A, Pramono S, Sisminardi. 2014. Validasi metode analisa penetapan kadar epigallocatekin galat dengan kromatografi cair kinerja tinggi. Pharmacia. 4(2): 111-115.
- Sukaryono ID, Hadianoto S, Fasa LR. 2017. Verifikasi Metode Pengujian Cemar Logam Pada Air Minum Dalam Kemasan (Amdk) Dengan Metode Aas-Gfa. Majalah BIAM. 13 (1): 8-16.
- Syahfitri WYN, Damastuti E, Kurniawati S. 2011. Penentuan Logam Berat Cr, Co, Zn, dan Hg Pada Beras Dan Kedelai Dari Wilayah Kota Bandung. Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi Nuklir PTNBR. Batan Bandung.
- Thomas R. 2004. Practical Guide to ICP-MS. USA: Marcel Dekker Inc Wcas. 1993. Environmental Analysis Using ICP-MS. Environmental Laboratory. 8 : 44-49

21. Widayanti E, Widwiasuti H. 2018. Analisis Kandungan Logam Cadmium Pada Daging Di Daerah Dinoyo Kota Malang. Seminar Nasional Inovasi dan Aplikasi Teknologi di Industri (Tema A Penelitian ) ISSN 2085-4218. ITN Malang, 3 Februari 2018 hal: 361
22. Wulandari EA, Sukesi. 2013. Preparasi penentuan kadar logam Pb, Cd, dan Cu n dalam nugget ayam rumput laut merah (*Eucheuma cottoni*). Jurnal Sains dan Seni Pomits. 2(2): 2337- 3520.



## **Analisa Residu Hormon Trenbolon Asetat pada Hati Sapi dengan Metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)**

**Dini Tri Mardiani<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

e-mail korespondensi penulis : dinimardiani@pertanian.go.id

### **ABSTRAK**

Trenbolon asetat adalah hormon penggertak pertumbuhan pada ternak sapi yang berupa sintesis steroid yang bersifat androgenik. Pada ternak sapi, penggunaannya dengan cara mengimplantasi Trenbolon asetat secara subkutan pada daun telinga ternak. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui keberadaan residu trenbolon asetat pada hati sapi. Ukuran sampel ditentukan sesuai dengan syarat pengambilan sampel. Sampel dipilih secara acak yaitu sebanyak 90 sampel. Sampel dianalisis menggunakan *enzim-linked immunosorbent assay* (ELISA). Hasil pengujian menunjukkan adanya 2 sampel hati yang mengandung trenbolon asetat melebihi *MRL (Maximum Residue Limit)* Standar Codex yaitu dengan konsentrasi 11.7954 dan 13.596 ppb.

**Kata kunci:** *ELISA, Trenbolon asetat*

### **PENDAHULUAN**

Produk pangan hewani harus dijamin bebas dari cemaran residu bahan kimia toksik (mikotoksin, pestisida, obat hewan dan hormon), karena keberadaan residu bahan kimia ini dapat mengganggu dan membahayakan kesehatan konsumen, seiring dengan adanya peningkatan kesejahteraan dan kesadaran masyarakat Indonesia tentang pentingnya protein hewani ikut mendorong meningkatnya permintaan terhadap pangan hewani. Salah satu residu yang membahayakan manusia adalah hormon trenbolon asetat.

Trenbolon asetat adalah hormon penggertak pertumbuhan (HGP) pada ternak sapi yang berupa steroid sintesis yang bersifat androgenik. Penggunaannya pada ternak sapi dengan cara mengimplantasi trenbolon asetat secara subkutan pada daun telinga ternak. Dampak dari residu trenbolon asetat pada kesehatan manusia yaitu mutagenik (terjadi perubahan genetik), teratogenik (terjadi cacat bawaan), dan karsinogenik (terjadi pertumbuhan sel kanker). Hormon trenbolon asetat dapat meningkatkan pertumbuhan bobot badan sebanyak 10% dan menurunkan konversi kebutuhan pakan dari 11% menjadi 9%.

Hasil penelitian mengenai keberadaan residu trenbolon asetat di Indonesia pada daging dan hati sapi impor yang dijual di swalayan dan distributor di DKI Jakarta menunjukkan bahwa sebagian besar sampel

tersebut positif mengandung residu trenbolon asetat (Widiastuti *et al.* 2000).

### **BAHAN DAN METODE**

#### **Bahan Penelitian**

Sampel penelitian berupa hati sapi yang beredar di sejumlah provinsi di Indonesia. Pengambilan sampel dilakukan di pasar tradisional. Sampel disimpan dalam keadaan beku sebelum dilakukan pengujian.

#### **Pengambilan Sampel**

Pengambilan sampel dilakukan secara acak sederhana terhadap hati sapi yang beredar di pasar tradisional pada sejumlah kota di beberapa provinsi Indonesia hingga jumlah sampel terpenuhi yaitu sebanyak 90 sampel.

#### **Preparasi Sampel**

Sampel hati sebanyak 1 gram dihomogenisasi dengan 2 mL buffer sodium asetat 0,5 M kemudian ditambahkan kedalamnya 8  $\mu$ L glukoronidase. Larutan tersebut diinkubasi pada suhu kamar (20-25°C) semalaman untuk proses hidrolisa. Larutan hidrolisa tersebut dipurifikasi lebih lanjut melalui proses ekstraksi dengan menambahkan 5 mL Tert. Butilmetileter dalam tabung sentrifuse dan dikocok selama 30-60 menit, kemudian disentrifuse selama 10 menit pada 3000 g dengan suhu 10-15°C. Supernatan yang dihasilkan dari proses sentrifuse ini

diambil dan dimasukkan ke dalam labu evaporasi. Proses ekstraksi ini dilakukan sebanyak 2 kali. Supernatan dalam labu evaporasi kemudian diuapkan dan dilarutkan dengan 1 ml Metanol 80% dan 2 ml buffer PBS 20 mM. Larutan ini kemudian dipurifikasi dengan kolom Rida C18 yang sebelumnya kolom sudah diaktivasi menggunakan 3 ml metanol dan 2 mL PBS 20 mM. Seluruh sampel sebanyak 3 mL dilewatkan ke dalam kolom. Kolom dibilas kembali dengan 2 mL metanol 40%. Semua cairan yang berada di dalam kolom dikeluarkan dengan menggunakan tekanan *syringe* atau dengan melewati gas N<sub>2</sub>. Larutan diekstraksi perlahan dengan 1 mL methanol 80% dengan laju alir 15 tetes/menit. Larutan eluat ditampung dalam vial baru dan diencerkan menggunakan *distilled water* dengan perbandingan 1:2. Sebanyak 20 µL hasil pengenceran tersebut digunakan untuk pengujian dengan metode *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA).

#### **Pengujian Sampel dengan Metode ELISA**

Metode ELISA dipakai untuk mengetahui jumlah kandungan residu trenbolon asetat pada hati sapi yang beredar di pasar tradisional pada sejumlah provinsi di Indonesia dengan kit ELISA produksi Ridascreen®, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany Art. No. R2601. Setelah semua reagen disiapkan, tiap larutan standar dan sampel dipipet masing-masing sebanyak 20 µL ke dalam tiap *well*. Larutan standar dimasukkan dalam 2 *well* untuk tiap konsentrasi yang berbeda. Enzim konjugat kemudian ditambahkan sebanyak 50 µL ke tiap *well*, selanjutnya ditambahkan 50 µL anti-trenbolon antibodi ke tiap *well*. *Plate* lalu digoyang agar homogen. *Plate* diinkubasikan selama 2 jam pada suhu ruang (20-25 °C) pada ruang gelap. Setelah itu, cairan di dalam *well* dibuang dan dicuci dengan 250 µL *distilled water* untuk setiap *well*-nya. Cairan di dalam *well* dibuang dan *plate* diketukkan di atas kertas tisu agar semua cairan dapat terbuang secara sempurna. Tahap pencucian ini dilakukan sebanyak 3 kali. Substrat dan *chromogen* masing-masing sebanyak 50 µL ditambahkan ke dalam setiap *well*, *plate* digoyangkan agar homogen. *Plate* kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar (20-25 °C) di ruang gelap. *Stop solution* ditambahkan sebanyak 100 µL ke dalam setiap *well*, *plate* digoyangkan kembali agar homogen. Penambahan *stop solution* dilakukan dengan hati-hati, karena *reagent*

mengandung asam sulfat. Pembacaan nilai absorbansi atau *optical density* (OD) dilakukan maksimal 30 menit setelah penambahan *stop solution* dengan menggunakan ELISA reader *Dionex software* 2.5.1 pada panjang gelombang 450 nm, dan hasil konsentrasi trenbolon asetat dinyatakan dalam *part per trillion* (ppt), kemudian respon dari hasil ELISA reader dibaca dengan menggunakan *software* Rida®Soft Win (Art.No. Z9999).

#### **Analisis Data**

Data yang diperoleh menggambarkan keberadaan residu trenbolon asetat pada hati sapi yang beredar di pasar tradisional pada sejumlah provinsi di wilayah Indonesia. Hasil uji disajikan dalam bentuk tabel.

#### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Metode pengujian residu trenbolon asetat menggunakan ELISA merupakan pengujian awal untuk mengetahui keberadaan kandungan residu trenbolon asetat dalam sampel hati. Metode pengujian residu trenbolon asetat menggunakan ELISA merupakan metode uji residu hormon yang sensitif, akurat, relatif murah, dan mudah pengerjaannya untuk pengujian rutin (Mahgoub *et al.*, 2006). Limit deteksi ELISA yang digunakan untuk mendeteksi residu trenbolon asetat adalah 200 ppt. Limit deteksi adalah konsentrasi terendah yang dapat dideteksi.

Hasil penelitian ditunjukkan pada Tabel 1. Berdasarkan tabel tersebut dapat dilihat bahwa sebanyak 73 buah sampel atau 81,11 % dari total jumlah sampel mengandung residu trenbolon asetat. Dan terdapat 2 buah sampel diantaranya atau 2,22% dari total jumlah sampel mengandung residu trenbolon asetat dengan konsentrasi > 10 ppb. Hal ini sama halnya dengan laporan hasil penelitian Heitman (1983) yang menyatakan bahwa residu dengan konsentrasi lebih tinggi ditemukan di hati dan ginjal daripada di otot dan lemak, sementara konsentrasi tertinggi ditemukan di empedu, urin dan feses. Begitu pula pada penelitian terdahulu yang dilaporkan oleh Henricks *et al.*, (2001) bahwa kadar residu yang ditemukan di hati jauh lebih tinggi. Residu melebihi BMR di hati ditemukan apabila hormon (2000 mg TBA) pada ternak diternasi 8 minggu pasca implantasi, namun tidak ditemukan di daging (Lange *et al.*, 2001)

Menurut Standar Codex, obat hewan atau hormon umumnya mengacu pada persyaratan *acceptable daily intake* (ADI) dan atau *maximum residue limit* (MRL). Standar Codex menetapkan bahwa ADI Trenbolon Asetat adalah 0-0,02 µg/kg berat badan dan MRL trenbolon pada daging sapi dan hati sapi masing-masing 2 µg/kg (2 ppb) dan 10 µg/kg (10 ppb) (CAC, 2012). Trenbolon asetat diklasifikasikan sebagai obat keras yang tidak diijinkan untuk didaftar dan diedarkan. Untuk itu di SNI: 01-6366-2000, batas maksimum residu trenbolon asetat tidak ditetapkan.

**Tabel 1.** Hasil Analisis Data

No.	Asal Sampel	n = jumlah sampel pada interval konsentrasi			Konsentrasi (ppb)	
		< 0.2 ppb	0.2 ppb - 10 ppb	> 10 ppb	min	maks
1.	Kota Balikpapan	0	6	0	0.3149	43.978
2.	Kota Bengkulu	0	4	0	0.3538	0.7650
3.	Kota Mataram	3	7	0	0.1508	0.4011
4.	Kota Pontianak	0	10	0	0.9327	59.911
5.	Kota Ternate	0	10	0	0.3566	42.621
6.	Kab. Merauke	1	14	0	0.1866	41.824
7.	Kota Tasikmalaya	0	4	2	28.354	135.966
8.	Kota Tanjung Pinang	8	4	0	0.0806	0.5276
9.	Kab. Lampung Tengah	0	6	0	0.3705	15.951
10.	Kota Bogor	5	2	0	0.1388	0.4919
11.	Kab. Cianjur	0	4	0	0.3854	32.029
Jumlah Total Sampel		17	71	2		

Efek samping dari residu trenbolon asetat dalam konsentrasi tinggi (diatas 4 ppb) sangat merugikan bagi kesehatan masyarakat antara lain peningkatan sel kanker, penurunan fertilitas, reaksi hipersensitif, gangguan kardiovaskuler, gangguan fungsi hati, penurunan produksi testosteron, spermatogenesis, oligospermia, serta atrofi testis (Bahrke & Yesalis, 2004; Maravelias *et al.*, 2005). Potensi karsinogenik residu trenbolon asetat ini perlu diwaspadai untuk menjamin keamanan pangan. Residu hormon pada pangan segar asal hewan yang melampaui batas maksimal residu menjadi tidak aman dan tidak layak untuk dikonsumsi karena dapat merugikan, mengganggu, dan membahayakan kesehatan manusia.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa semua sampel hati

mengandung trenbolon asetat. Terdapat 2 buah sampel hati yang mengandung trenbolon asetat melebihi MRL Standar Codex untuk hati sapi yaitu 10 µg/kg atau 10 ppb. Konsentrasi residu trenbolon asetat dalam sampel tersebut adalah 11.7954 dan 13.5966 ppb.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Bahrke MS, Yesalis CE. 2004. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sports and exercise. *Current Opinion in Pharmacology* 4: 614-620.
2. [CAC] Codex Alimentarius Commission. 2012. Maximum residue limits for veterinary drugs in foods. [http://ftp.fao.org/codex/weblinks/MRL2\\_e\\_2012.pdf](http://ftp.fao.org/codex/weblinks/MRL2_e_2012.pdf). Download: November 14, 2014.
3. Heitzman, R.J. 1983. The absorption, distribution and excretion of anabolic agents. *J. Anim. Sci.* 57: 233-238.
4. Henricks, D.M., S.L. Gray, J.J. Owenbr and B.R. Lackey. 2001. Residues from anabolic preparations after good veterinary practice. *APMIS*. 109: 273-83.
5. Lange IG, Daxenberger A, Meyer HHD. 2000. Screening of trenbolone-17β in milk samples after application of trenbolone acetate to a cull cow. *Euroresidue IV. Conference of Residues of Veterinary Drugs in Food*. Veldhoven (ND):FECS 236: 713-717.
6. Lange IG, Daxenberger A, Schiffer B, Witters H, Ibaretta D, Meyer HHD. 2002. Sex hormones originating from different livestock production system: fate and potential disrupting activity in the environment. *Analytica Chimica Acta* 473: 23-27.
7. 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.
8. Maravelias C, Dona, A, Stefanidou M, Spiliopoulou. 2005. Adverse effect of anabolic steroids in athlete a constant threat. *Toxicology Letter* 158: 167-175.
9. Widiastuti R, Murdiati TB, Yuningsih. 2000. Residu hormon 17β trenbolon pada daging dan hati sapi impor yang beredar di DKI Jakarta. Seminar Nasional Peternakan dan

- Veteriner. Balai Penelitian Veteriner. p578-581.
10. Widiastuti R, Indraningsih, Murdiati TB, Firmansyah R. 2001. Residu trenbolon pada domba garut yang diimplantasi dengan trenbolon asetat. *Jurnal Ilmu Ternak Veteriner* 6: 198-201.
  11. Widiastuti R, Firmansyah R, Indraningsih. 2007. Residu trenbolon pada jaringan dan urin sapi jantan muda peranakan Ongole yang diimplantasi dengan trenbolon asetat. *Jurnal Ilmu Ternak Veteriner* 12: 60-67.

## **Penentuan Kadar Residu Cemaran Logam Berat Pada Susu Bubuk Dan Susu *Ultra High Temperature* (UHT) Menggunakan *Graphite Furnace Atomic Absorbtion Spectrophotometer* (GF-AAS)**

**Taufiq Gunawan<sup>1</sup>, Elok Kania Suryaningsih<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup>Departemen Kimia FMIPA Institut Pertanian Bogor,

<sup>2</sup>Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

\*e-mail korespondensi penulis: elokkania@pertanian.go.id

### **ABSTRACT**

*Determination of heavy metal residue in milk powder and UHT milk using Graphite Furnace Atomic Absorbtion Spectrophotometer (GF-AAS) held in National Laboratory of Quality Control and Animal Product Certification (BPMSPH) Bogor. The analysis result of UHT milk sampel SU 1 is 3,8407 mg/kg for Cd and 246,281 mg/kg for Sn, the milk powder sampel SB 5 is 1106,14 mg/kg for Sn and SB 8 is 0,45636 mg/kg for Cd and 744,731 mg/kg for Sn. The result from SU 1, SB 5 and SB 8 are above the Maximum Residue Limit based on the standard SNI 2970 : 2015 and SNI 3950 : 2014.*

**Keywords:** GF-AAS, AAS, heavy metal, milk powder, UHT milk

### **PENDAHULUAN**

Susu merupakan zat bioaktif yang kompleks yang mendorong pertumbuhan dengan baik. Susu dianggap sebagai makanan dengan nutrisi yang hampir lengkap karena merupakan sumber protein, lemak, vitamin dan mineral (Imam *et al.*, 2017). Susu termasuk jenis bahan pangan hewani, berupa cairan putih yang dihasilkan oleh hewan ternak mamalia dan diperoleh dengan cara pemerahan (Vina, 2007).

Selama proses produksi susu, banyak tahap yang berpotensi sebagai penyebab kontaminan pada susu. Kontaminan tersebut, 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).

Toksisitas 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 (Imam *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 (Durube *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).

Mengingat adanya bahaya yang dapat ditimbulkan oleh logam berat terhadap kesehatan, maka diperlukan pemeriksaan logam berat dalam susu. Ada beberapa metode yang dapat digunakan untuk analisis logam diantaranya AAS (*Atomic Absorbtion Spectrometry*) (Sowmya *et al.* 2015), *titrimetric* (Basak & Kundu, 2013), ICP-OES (*Inductively Couple Plasma Optical Emission Spectrometry*) (kumaravel & Alagusundaram, 2014), dan ICP-MS (*Inductively Couple Plasma Mass Spectrometry*) (Poirier *et al.*, 2016). Metode AAS dapat dipilih karena bersifat spesifik, memiliki limit deteksi yang rendah dan ketelitiannya yang tinggi serta tidak membutuhkan banyak sampel dan pengomplek (Lestari *et al.*, 2010).

Hasil pemeriksaan ini diharapkan dapat digunakan sebagai bahan tambahan informasi bagi yang berwenang dalam pengawasan terhadap kesehatan masyarakat. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui adanya kandungan logam Pb Sn dan, Zn pada produk susu. Diharapkan kadar logam dalam susu tidak melebihi batas maksimum yang telah ditetapkan oleh peraturan SNI 3950:2014 dan SNI 2970:2015 tentang syarat baku mutu susu *Ultra High Temperature* (UHT) dan susu bubuk. Yaitu 0,1 mg/kg untuk As,

0,2 mg/kg untuk Cd, 0,02 mg/kg untuk Pb dan 250,0 mg/kg untuk Sn.

## **METODE**

### **Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah tabung *vessel*, *hot plate*, *High Performance Microwave Digestion* (HPLD), GF-AAS (*Graphite Furnace Atomic Absorbtion Spectrometry*), timbangan, labu takar, pipet mikro, pipet volumetrik, *bulb*, dan corong. Bahan yang digunakan meliputi larutan  $H_2O_2$  30%, Larutan  $HNO_3$  65% dan 10,4%, *Deionized Water* (DW) dan larutan stok standar As, Cd, Pb dan Sn masing-masing dengan konsentrasi 1000 ppm. Sampel susu bubuk dan susu UHT diambil secara acak dari beberapa provinsi di Indonesia.

### **Pembuatan Larutan Standar As dan Sn.**

Larutan standar logam As dan Sn dengan konsentrasi 50 ppb sebanyak 50 mL, dibuat dari larutan stok standar 1000 ppm. Pengenceran dilakukan secara bertingkat yaitu dari konsentrasi 1000 hingga menjadi 100 ppb dengan menggunakan rumus pengenceran. Selanjutnya sebanyak 5 mL Larutan standar As dan Sn 1 ppm dipipet kedalam labu takar 10 mL, lalu ditambahkan  $HNO_3$  10,4% hingga tanda batas. Dihasilkan larutan standar As dan Sn 50 ppb.

### **Pembuatan Larutan Standar Cd**

Larutan standar logam Cd dengan konsentrasi 2 ppb sebanyak 10 mL, dibuat dari larutan stok standar 1000 ppm. Pengenceran dilakukan secara bertingkat yaitu dari konsentrasi 1000 hingga menjadi 10 ppb dengan menggunakan rumus pengenceran. Selanjutnya sebanyak 2 mL Larutan standar Cd 10 ppb dipipet kedalam labu takar 10 mL, lalu ditambahkan  $HNO_3$  10,4% hingga tanda batas. Dihasilkan larutan standar Cd 2 ppb.

### **Pembuatan Larutan Standar Pb**

Larutan standar logam Pb dengan konsentrasi 30 ppb sebanyak 10 mL, dibuat dari larutan stok standar 1000 ppm. Pengenceran dilakukan secara bertingkat yaitu dari konsentrasi 1000 hingga menjadi 100 ppb dengan menggunakan rumus pengenceran. Selanjutnya sebanyak 3 mL Larutan standar Pb 100 ppb dipipet

kedalam labu takar 10 mL, lalu ditambahkan HNO<sub>3</sub> 10,4% hingga tanda batas. Dihasilkan larutan standar Pb 2 30 ppb.

#### Prosedur Ekstraksi

Sebanyak 0,3-0.5 gram sampel ditimbang, lalu dimasukkan kedalam tabung sampel (*vessel*). Selanjutnya ditambahkan 8 mL asam nitrat (HNO<sub>3</sub>) 65% dan 2 mL hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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. Dalam microwave tabung 1 (*blanko*) dihubungkan dengan 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 kedalam labu takar 50 mL dan ditera hingga tanda garis.

#### Pengukuran Deret Standard dan Sampel Uji

Pengukuran deret standar dan contoh uji dilakukan dengan menggunakan AAS yang dilengkapi dengan *atomizer Graphite Furnace* dan dioptimalkan terlebih dahulu dengan mengatur sinyal dan lampu. Setelah dioptimalkan larutan standar dipipet sebanyak 1 mL kedalam *well autosampler* yang terdapat pada AAS. Larutan tersebut diencerkan oleh alat secara otomatis dengan konsentrasi yang telah ditentukan. Pengukuran sampel uji dilakukan dengan mengaspirasikan 1 mL sampel uji kedalam *well*. Pembacaan adsorban dilakukan sebanyak 3 kali ulangan pada masing-masing panjang gelombang.

#### Pengolahan dan Perhitungan Data

Data dikumpulkan dari semua uji coba dan disusun dalam tabel. Konsentrasi, dalam bagian per juta (ppb), sampel susu yang menghasilkan hasil positif untuk keberadaan logam berat diubah menjadi mg/kg berat badan, kemudian dibandingkan dengan batas maksimum yang dapat ditoleransi dari logam-logam berat ini sebagaimana ditetapkan oleh

Badan Standar Nasional Republik Indonesia (BSN RI).

Penghitungan kadar Sn menggunakan rumus berikut:

$$K(mg/kg) = \frac{(Cs - Cb)}{m} \times v$$

Keterangan:

K = Kandungan logam (mg/kg)

Cs = konsentrasi logam dalam sampel dari kurva kalibrasi,

dinyatakan dalam mikrogram per liter atau ppb (*part per billion*)

Cb = Konsentrasi Blanko dari kurva kalibrasi,

dinyatakan dalam mikrogram per liter atau ppb (*part per billion*)

V = Volume larutan sampel akhir (ml)

m = Bobot sampel awal

## 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 larutan seri standar metode GF-AAS menggunakan blanko dan logam arsen (As), kadmium (Cd), timbal (Pb) dan timah (Sn) dibuat dengan memvariasikan konsentrasi larutan seri standar dengan metode *least square* sehingga diperoleh persamaan garis linear untuk logam arsen (As)  $Y = 0.00795X + 0.01447$ , kadmium (Cd)  $Y = 0.11534X + 0.01697$ , timbal (Pb)  $Y = 0.01268X - 0.01742$ , dan timah (Sn)  $Y = 0.00447X + 0.00736$ .

Fungsi larutan blanko adalah sebagai pengoreksi absorbansi. Perhitungan regresi linier berguna untuk mengetahui hubungan antar variabel. Hasil pengukuran standar logam kromium, kadmium, dan merkuri dengan GF-AAS ditampilkan pada lampiran 1. Perhitungan regresi linier dimana y merupakan *ratio* dan x adalah konsentrasi standar masing-masing unsur. Kalibrasi dengan GF-AAS tergolong akurat dengan koefisien determinasi tinggi yakni untuk logam arsen (As) = 0.9992, kadmium (Cd) = 0.9991, timbal (Pb) = 0.9932 dan timah (Sn) = 0.9997. Hal ini menunjukkan adanya hubungan atau korelasi positif antara konsentrasi dan intensitas.



### Pemilihan Instrumen

Penentuan kadar logam berat dalam sampel susu bubuk dan susu UHT telah dilakukan dengan menggunakan *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometer* (GF-AAS) mengacu pada metode RSN12:2012 ICS.67.120.30 (BSN, 2012) tentang metode pengujian kadar logam berat dalam sampel daging, susu, telur, dan olahannya menggunakan AAS. AAS yang digunakan dilengkapi dengan *autosampler* yang memiliki kemampuan untuk mengencerkan larutan standar secara otomatis dengan konsentrasi sesuai yang sesuai dengan yang diinginkan melalui pemrograman pada komputer. *Graphite Furnace* (GF) sendiri merupakan pengatomisasi yang berbentuk tabung berongga dengan lubang di tengah yang merupakan tempat pemasukan sampel. AAS dengan Pengatomisasi GF memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan pengatomisasi *flame* atau yang biasa disebut sebagai *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrophotometer* (HG-AAS). Penggunaan HG-AAS biasanya menghabiskan lebih banyak bahan kimia dan sampel serta membutuhkan lebih banyak bahan dalam proses penyiapan standar dan sampel dibandingkan dengan GF-AAS (Sardans *et al.*, 2010). Hal ini akan berpengaruh terhadap presisi dan akurasi. GFA-AS juga memiliki limit deteksi yang lebih rendah sehingga lebih efisien untuk analisis sampel pada konsentrasi yang rendah. (khalid *et al.*, 2016)

**Tabel 1.** Parameter instrumen dalam penentuan kadar logam berat dalam sampel susu bubuk dan UHT dengan AAS

Logam	Panjang gelombang (nm)	Kuat arus lampu (mA)	Lebar celah (nm)	Konsentrasi standar ( $\mu\text{g/L}$ )	Volume sampel ( $\mu\text{L}$ )	Replikasi
As	193.7	10	0.5R	50	10	3
Cd	228.8	4	0.5	2	8	3
Pb	283.3	10	0.5	30	12	3
Sn	286.3	As	0.5R	50	10	3

### Preparasi Sampel

Analisis kandungan logam berat pada sampel menggunakan AAS mengharuskan sampel berbentuk larutan. Selain itu, proses destruksi sampel diperlukan untuk memutus ikatan logam dengan komponen lain dalam matriks

sampel (Rasyid *et al.*). Dua metode yang umum digunakan untuk mendestruksi bahan organik dalam sampel adalah oksidasi basah basa (*wet oxidation*) dan pengabuan kering (*dry ashing*), (Dewi, 2012). Pada penelitian ini, metode destruksi basah dipilih karena pada umumnya metode ini digunakan untuk analisis suatu unsur dengan konsentrasi yang sangat rendah. Proses destruksi juga bertujuan untuk menghilangkan matriks yang dapat mengganggu proses analisis. Destruksi basah dilakukan dengan cara menguraikan bahan organik yang terdapat dalam suatu larutan oleh asam pengoksidasi kuat seperti  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dan  $\text{HNO}_3$  dengan pemanasan sampai volume larutan berkurang sekitar setengahnya. Mineral anorganik berupa logam-logam akan tertinggal dan larut dalam larutan asam kuat. Pada penelitian ini digunakan  $\text{HNO}_3$  65% yang berfungsi untuk melarutkan logam-logam yang terdapat dalam sampel.  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% merupakan katalis yang akan mempercepat reaksi oksidasi bahan organik. Bahan-bahan organik yang terlarut diuapkan melalui proses pemanasan menggunakan *microwave*.

Keberhasilan proses destruksi ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi jernih karena hancurnya seluruh matriks sampel. Sedangkan timbulnya warna keruh setelah proses destruksi diakibatkan protein yang belum larut atau menggumpal karena zat pengoksidasi tidak cukup kuat untuk merusak matriks sampel. Selain itu pada proses destruksi, muncul gelembung-gelembung gas berwarna coklat tipis, gas ini adalah  $\text{NO}_2$  (hasil samping proses destruksi menggunakan asam nitrat). Banyaknya Gas yang dihasilkan dari proses penguapan mengindikasikan bahwa larutan sampel telah terdestruksi dengan baik sehingga terbebas dari bahan-bahan organik (Dako *et al.*, 2000)

### Kandungan Logam dalam Sampel

Penentuan kadar logam berat pada penelitian ini memeriksa kandungan logam As, Cd, Pb, dan Zn dalam sampel susu bubuk dan susu UHT. Hasil pengukuran ditunjukkan oleh Tabel 1

**Tabel 1** Hasil pengukuran kadar logam berat dalam sampel

Sampel	Kadar residu logam (mg/kg)			
	As	Cd	Pb	Sn
SU 1	Ttd	3.8407	Ttd	246.281
SU 2	Ttd	Ttd	Ttd	Ttd
SU 3	Ttd	Ttd	Ttd	Ttd
SU 4	Ttd	Ttd	Ttd	14.2563
SU 5	Ttd	Ttd	Ttd	Ttd
SB 1	Ttd	Ttd	Ttd	207.744
SB 2	Ttd	Ttd	Ttd	Ttd
SB 3	Ttd	Ttd	Ttd	Ttd
SB 4	Ttd	Ttd	Ttd	Ttd
SB 5	Ttd	Ttd	Ttd	1106.14
SB 6	Ttd	Ttd	Ttd	20.6052
SB 7	Ttd	Ttd	Ttd	Ttd
SB 8	Ttd	0.45636	Ttd	744.731
Baku mutu	0.1	0.2	0.02	250

Ttd : Tidak terdeteksi

Terlihat pada semua sampel tidak terdeteksi adanya logam As dan Pb. Hasil tersebut 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 sampel SU 1 dan SB 8 dengan berturut-turut 3.8407 (mg/kg) dan 0.4463 (mg/kg). Dilihat dari proses pembuatan susu bubuk dan susu UHT tidak terdapat keterlibatan bahan baku atau alat yang mengandung logam Cd. Akan tetapi, potensi cemaran logam Cd tidak hanya disebabkan oleh proses pembuatan susu seperti pengolahan dan pengemasan, cemaran logam Cd juga dapat terjadi pada terjadi pada pakan sapi melalui paparan polusi, tempat dan proses penyimpanannya. Mengacu pada Baku mutu SNI 2970:2015 (susu bubuk) dan SNI 3950:2014 (susu UHT), Sampel SU 1 dan SB 8 tidak dapat dikonsumsi karena kontaminan logam Cd melebihi ketentuan yaitu 0.2 (mg/kg).

Beberapa sampel menunjukkan hasil positif terhadap kontaminan logam Sn. Logam Sn dengan kadar yang berbeda terdeteksi pada sampel SU 1, SU 4, SB 1, SB 5, SB 6, dan SB 8. Berdasarkan peraturan baku mutu batas maksimum kandungan logam Sn dalam susu adalah Sampel SU 4 dan SB 6 menunjukkan kontaminan logam Sn yang relatif rendah yaitu 14.2563 (mg/kg) dan 20.6052 (mg/kg). Hasil ini menunjukkan bahwa kandungan logam Sn tidak melebihi batas maksimum yang telah ditetapkan. Sedangkan sampel SU 1 dan SB 1, positif tercemar logam Sn yang cukup tinggi, namun masih berada pada

angka yang dapat ditolerir, yaitu dengan konsentrasi berturut-turut 246.2813 (mg/kg), 207.7441 (mg/kg). Sampel SB 5 dan SB 8, kontaminan logam Sn terdeteksi dengan konsentrasi yang sangat tinggi yaitu, 1106.1400 (mg/kg), dan 744.731. Kedua sampel tersebut terkontaminasi logam Sn melebihi batas maksimum yang telah ditetapkan sehingga susu tersebut tidak dapat dipasarkan dan dikonsumsi. Kadungan timah yang sangat tinggi terlihat pada sampel SB 5 dan SB 8. Timah merupakan logam dengan keterlibatan yang intens pada proses pengolahan susu. Peralatan pada proses produksi seperti kontainer mungkin terbuat dari timah. Mengingat timah bukan merupakan logam yang *inert*, maka potensi cemaran timah sangat tinggi. Timah dapat terlarut dalam susu melalui korosi yang dapat terjadi apabila peralatan yang terbuat dari timah tidak memiliki lapisan pelindung atau terjadi cacat pada saat proses pembuatan.

## KESIMPULAN

Keberadaan logam berat dalam bahan pangan menjadi masalah penting yang perlu dievaluasi. Analisis kandungan logam berat dalam sampel susu UHT dan susu bubuk menunjukkan hasil negatif terhadap logam As dan Pb. Pada Beberapa sampel terdeteksi adanya logam Cd dan Sn. Sampel susu dengan kandungan logam berat di atas batas yang diperbolehkan menurut baku mutu SNI 2970:2015 (susu bubuk) dan SNI 3950:2014 (susu UHT) adalah sampel SU 1, SB 5, dan SB 8. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa susu tersebut tidak boleh dikonsumsi. Adanya kandungan logam berat yang melebihi ambang batas yang diperbolehkan memberi peringatan perlunya kewaspadaan dalam menjaga keamanan dan meningkatkan kualitas susu.

## DAFTAR PUSTAKA

- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. Standar Nasional Indonesia. SNI 2970:2015. *Susu UHT*. Jakarta (ID): Badan Standardisasi Nasional
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. Standar Nasional Indonesia. SNI

- 3950:2015. *Susu UHT*. Jakarta (ID): Badan Standardisasi Nasional
3. [BSN] Badan Standardisasi Nasional. Rancangan Standar Nasional Indonesia. RSNI 2: ICS. 67.120.30. 2012. Metode Pengujian Kadar Logam Berat dalam Sampel Daging, Susu, Telur, dan Olahannya. Jakarta (ID): Badan Standardisasi Nasional
4. 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.
5. 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.
6. Basak, S., & Kundu, D. (2013). Evaluation of measurement uncertainty components associated with the results of complexometric determination of calcium in ceramic raw materials using EDTA. *Accreditation and Quality Assurance*, 18(3), 235-241
7. Darmono. 2001. *Lingkungan hidup dan pencemaran*. Jakarta (ID) : Penerbit Universitas Indonesia.
8. Duruibe, J., Ogwuegbu, M. and Egwurugwu, N. (2007). Heavy Metals Pollution and Human Toxic Effects. *International Journal of Physical Science*, 2 (5): 112 -118
9. Harurani, L. 2011. Analisa Kandungan Logam Berat Pb dan Fe dengan Metode Spektrofotometri Serapan Atom terhadap Susu Kental Manis di Pekanbaru.
10. 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
11. Khalid RS, Helaluddin ABM, Alaama M. Abdulkader AM, Kasmuri A, Abbas SA. 2016. Reliability of graphite furnace atomic absorption spectrometry as alternative method for trace analysis of arsenic in natural medicinal products. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15 (9): 1967 1972 ISSN: 1596-5996 (print); 1596-9827 (electronic), <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v15i9.22>
12. Khopkar, S.M. 2002. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta (ID): UI-Press
13. Kumaravel, S., & Alagusundaram, K. (2014). Determination of mineral content in Indian spices by ICP-OES. *Oriental journal of chemistry*, 30(2), 631-636
14. Lestari, A.P., Utami, P.I., Rahayu, W.S. 2010. Identifikasi Cemaran Timbal Pada Wortel (*Daucus carota* L.) Organik dan Anorganik dengan Metode Serapan Atom. *Journal of Pharmacy*, 7(3), 84-92
15. Ogabiele, E.E., Udiba, U.U., Adesina, O.B., Hamnel, 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.
16. Poirier, L., Nelson, J., Leong, D., Berhane, L., Hajdu, P., & Lopez-Linares, F. (2016). Application of ICP-MS and ICP-OES on the determination of nickel, vanadium, iron, and calcium in petroleum crude oils via direct dilution. *Journal of Energy & Fuels*, 30(5), 3783-3790.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Sardans J, Montes F, Peñuelas J. Determination of As, Cd, Cu, Hg and Pb in biological samples by modern electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta B*

- Atomic Spectroscopy*. 2010; 65(2): 97-112.
21. Sowmya, R., Indumathi, K. P., Arora, S., Sharma, V., & Singh, A. K. (2015). Detection of calcium based neutralizers in milk and milk products by AAS. *Journal of food science and technology*, 52(2), 1188-1193.

# Analisis Cemarkan *Staphylococcus Aureus* dalam Daging Sapi Asal Pasar Tradisional

Sagita Dini Lestari<sup>1</sup>, Ery Novarieta H.<sup>2\*</sup>, Sutiastuti<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB

<sup>2,3</sup>Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan,

\*Email korespondensi penulis: erynovarieta@pertanian.go.id

## ABSTRACT

*Positive results on the identification of coagulase are the key to confirmation of the presence of S. aureus colonies in beef. Colonies that have positive morphological identification results are not necessarily positive for the existence of coagulase. There are 2 samples from 25 samples in the test that showed positive results on the presence of S. aureus.*

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, Daging Sapi

## PENDAHULUAN

Daging sapi merupakan salah satu produk peternakan yang paling banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia setelah daging ayam. Tercatat dalam data BPS (2016), konsumsi daging sapi masyarakat Indonesia pada tahun 2016 mencapai 801.360 ton. Akan tetapi, masih ada produk yang tidak memenuhi persyaratan mutu dan keamanan pangan. Hal ini dapat dilihat dengan masih ditemukannya kasus keracunan karena konsumsi daging sapi yang sebagian besar belum dilaporkan dan belum diidentifikasi penyebabnya. Keracunan akibat bahan pangan dapat disebabkan diantaranya oleh adanya zat pencemar baik secara kimia, fisik maupun biologis. Berita dari Borneo News (2017), menyatakan ditemukannya cemarkan bakteri *Staphylococcus aureus* dalam hidangan daging di suatu acara syukuran di Desa Tajepan, Kecamatan Kapuas Murung, Kabupaten Kapuas, Kalimantan Tengah.

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif berbentuk bulat berdiameter 0,7-1,2 µm, tersusun dalam kelompok-kelompok yang tidak teratur seperti buah anggur, fakultatif anaerob, tidak membentuk spora, dan tidak bergerak. Bakteri ini tumbuh pada suhu optimum 37 °C, tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar (20-25 °C). Koloni pada perbenihan padat berwarna abu-abu sampai kuning keemasan, berbentuk bundar, halus, menonjol, dan berkilau. Lebih dari 90% isolat klinik menghasilkan *S. aureus* yang mempunyai kapsul polisakarida atau selaput

tipis yang berperan dalam virulensi bakteri (Jawetz *et al.* 1995).

*Staphylococcus aureus* merupakan salah satu mikroba yang menempati urutan penting mikroba yang dapat menyebabkan penyakit di dunia atau bisa disebut sebagai *food-borne illnesses* (Miller dan Cho 2011). Secara umum, mikroba ini ditemukan pada kulit dan jaringan mukosa pada tubuh manusia. Selain manusia, bakteri ini dapat pula hidup pada sayuran dan produk peternakan yang diproses oleh manusia (Mead *et al.* 1989). Beberapa strain dari bakteri ini mampu memproduksi satu atau lebih enterotoksin yang hanya dapat dihilangkan melalui sterilisasi autoklaf. Toksin ini dapat menyebabkan gejala infeksi dari gastrointestinal selama intoksikasi. Meskipun kasus keracunan *S. aureus* ini ringan, pada umumnya gejala yang timbul seperti muntah-muntah dengan atau tanpa diare, data dari Holmberg dan Blake (1984) menunjukkan 10% dari kasus keracunan membutuhkan penanganan secara medis ke rumah sakit. Waktu dari gejala keracunan biasanya cepat dan akut, tergantung pada daya tahan tubuh dan banyaknya toksin yang termakan. Jumlah toksin yang dapat menyebabkan keracunan adalah 1,0 µg/gr makanan (Jawetz *et al.* 1995).

Salah satu cara pencegahan yang baik adalah dengan mendeteksi pada sumber pangan asal hewan yang belum beredar di masyarakat melalui program pengendalian mutu dan sertifikasi yang dilakukan oleh Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan (BPMSPH). Melalui lembaga ini, produk hewan seperti daging sapi yang

beredar dalam masyarakat dapat lebih terkendali kualitasnya. Pengendalian ini dilakukan dengan cara pembuatan sertifikasi bebas cemaran mikroba *S. aureus* ataupun pengambilan sampel secara acak untuk *monitoring*, baik ke produsen maupun distributor di pasar penjualan. Pengujian cemaran ini dilakukan dengan uji identifikasi koagulase karena diduga strain ini dapat menghasilkan hasil negatif dan positif semu bila hanya melalui uji morfologi. Strain yang diduga merupakan bakteri *S. aureus* akan menunjukkan hasil reaksi koagulase positif.

## MATERI DAN METODE

Bahan yang digunakan adalah 25 sampel daging sapi yang diambil dari pasar tradisional, *Baird-Parker Agar* (BPA), *Egg yolk tellurite emulsion*, koagulase plasma kelinci (*coagulate rabbit plasma*) dengan *ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA) 0,1 %, *Buffered Peptone Water* (BPW) 0,1 %, dan Akuades steril. Alat yang digunakan adalah cawan petri, tabung reaksi, pipet serologis (ukuran 1 ml dan 10 ml), siring ukuran 3 ml, plastik steril, botol media, batang gelas bengkok (*hockey stick*), gunting, pinset, jarum inokulasi (*ose*), *stomacher*; pembakar bunsen, timbangan, pengocok tabung (*vortex*), inkubator, penangas air, autoklaf, lemari pendingin (*refrigerator*), dan *freezer*.

Metode yang digunakan mengikuti metode dari Badan Standar Nasional Indonesia (SNI) nomor 2897:2008 dengan modifikasi. Langkah yang dikerjakan meliputi penyiapan contoh daging sapi, pengidentifikasian secara morfologi, dan pengidentifikasian menggunakan uji koagulase. Dokumentasi seputar kegiatan praktik pengujian, seperti proses penyiapan sampel dan pengidentifikasian *S. aureus* terdapat pada lampiran 1 dan 2.

### Penyiapan Contoh Daging Sapi

Sampel daging sapi ditimbang sebanyak 25 g, kemudian secara aseptik dimasukkan dalam wadah steril. Sampel yang telah ditimbang lalu ditambahkan sebanyak 225 ml larutan *buffered peptone water* (BPW) steril ke dalam kantong steril yang berisi sampel. Kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *stomacher* selama 1 menit (2x30 detik, 230 rpm).

### Identifikasi Morfologi koloni *Staphylococcus aureus*

Pengujian selalu disertai dengan kontrol

positif. Sebanyak 1 ml sampel dari  $10^0$  dipindahkan ke dalam larutan 9 ml *buffered peptone water* (BPW) untuk mendapatkan pengenceran  $10^{-1}$ . Media Agar Baird-Parker (BPA) yang sudah ditambah dengan *egg yolk tellurite emulsion* (5 ml ke dalam 95 ml media BPA) dituangkan sebanyak 15 ml sampai dengan 20 ml pada 10 cawan petri yang akan digunakan dan dibiarkan hingga memadat. Sebanyak 1 ml suspensi dari setiap pengenceran dipipet dan diinokulasikan masing-masing 0,1 ml pada 10 cawan petri yang berisi media BPA tersebut. Suspensi sampel diratakan di atas permukaan media agar dengan menggunakan batang gelas (*hockey stick*), dan dibiarkan hingga suspensi terserap (diinkubasikan pada temperatur 35 °C selama 24 jam). Setelah 24 jam, inkubasi dilakukan kembali pada temperatur 35 °C selama 24 jam hingga 48 jam dengan posisi cawan petri terbalik. Satu atau lebih koloni dari masing-masing variasi bentuk yang tumbuh diambil untuk selanjutnya dilakukan uji identifikasi.

### Identifikasi Koagulase *Staphylococcus aureus*

Satu atau lebih koloni yang diduga *Staphylococcus aureus* diambil dan dimasukkan ke dalam 3 ml koagulase plasma kelinci (*coagulate rabbit plasma*) yang mengandung EDTA. Tabung diinkubasikan pada temperatur 35 °C selama 24 jam dan diamati terhadap pembentukan gumpalan. Hasil uji koagulase positif terhadap *S. aureus* ditandai dengan adanya penggumpalan plasma pada tabung yang tidak akan jatuh ketika tabung dirotasikan.

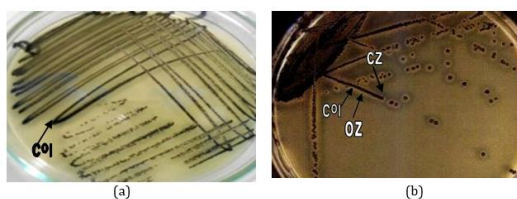
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil Identifikasi Morfologi Koloni *Staphylococcus aureus*

Pengamatan dan seleksi morfologi dilakukan terhadap 25 sampel daging sapi yang berasal dari pasar tradisional di Jawa Tengah. Sampel merupakan hasil pengambilan secara aktif dari staf Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan (BPMSPH) untuk mengontrol kondisi daging sapi di lapangan (*monitoring sample*). Pengamatan dan seleksi secara morfologi ini dilakukan menggunakan medium agar Baird Parker. Sampel yang diamati dalam medium merupakan hasil pengenceran  $10^{-1}$  dan telah diinkubasi selama 48 jam.

Koloni yang tumbuh di dalam media agar Baird Parker diseleksi berdasarkan

kemiripan dengan kontrol positif. Kontrol positif ini dibuat dari kultur murni *Staphylococcus aureus* ATCC (*the American Type Culture Collection*) 29213 dengan lebar zona keruh disekitar koloni  $\pm 3$  mm dan lebar zona bening  $\pm 2$  mm. Penentuan terhadap kode morfologi dilakukan pada variasi morfologi yang ditemui saat pengamatan. Koloni bakteri ini tampak berwarna hitam mengkilat dengan tepian yang tampak seperti zona keruh (*opaque zone*) berwarna putih dan disertai dengan zona bening (*clear zone*) (Gambar 5). Seringkali sulit untuk membedakan antara zona keruh dan media agar Baird-Parker setelah adanya pertumbuhan koloni. Bila cukup lebar, zona keruh ini akan terlihat berwarna lebih putih kekuningan dari media disekitarnya dengan warna yang lebih transparan. Kenampakan agar Baird-Parker sendiri adalah berwarna kuning transparan setelah menjadi padat dalam cawan petri.



**Gambar 1.** Identifikasi morfologi koloni *S. aureus*. (a) Kontrol positif koloni *S. aureus* ATCC 29213 dalam agar Baird-Parker (BPA); (b) Koloni diduga *S. aureus* dalam BPA setelah 48 jam. Tampak koloni *S. aureus* (Col), Zona bening (CZ), dan Zona keruh (OZ).

Hasil identifikasi morfologi menunjukkan 80% sampel (20 dari 25 sampel) terdapat koloni yang diduga *S. aureus* dalam media *Baird Parker Agar* (BPA) (Tabel 2). Hasil negatif ini ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan dalam medium BPA setelah inkubasi selama 48 jam. Terdapat 5 variasi morfologi yang ditemukan pada koloni diduga *S. aureus* yaitu kode morfologi A, B, C, D, dan E (Tabel 3). Kode A merupakan morfologi yang paling mirip dengan kontrol positif. Kode B, C, D, dan E merupakan koloni yang sedikit berbeda dengan kontrol positif. Kode B memiliki kenampakan zona keruh yang lebih lebar ( $\pm 3,5$  mm) dibandingkan kode A. Kode C memiliki zona keruh yang tampak sedikit bergelombang dan zona bening yang kurang tampak jelas. Kode D memiliki zona keruh sekitar koloni yang tampak lebih tipis daripada kode lain, sedangkan kode E memiliki zona keruh yang lebih sempit ( $\pm 2,5$  mm) dengan zona bening yang juga lebih sempit dari koloni lain ( $\pm 1,5$  mm).

**Tabel 1.** Hasil temuan variasi morfologi diduga *Staphylococcus aureus* dalam BPA

No	Kode morfologi	Lebar zona (mm)		Keterangan
		Zona bening ( <i>clear zone</i> )	Zona keruh ( <i>opaque zone</i> )	
1	Kontrol (ATCC 29213)	2	3	-
2	A	2	3	-
3	B	2	3,5	-
4	C	2	3	Zona keruh bergelombang, zona bening tidak tampak jelas
5	D	2	3	Zona keruh tipis
6	E	1,5	2,5	-

Sumber: Laboratorium Cemarkan Mikroba BPMSPH

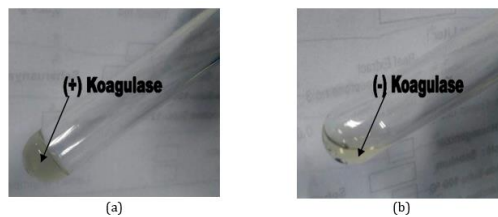
Tidak semua nomor sampel memiliki variasi koloni hingga kode morfologi D dan E. Hanya 4 sampel yang memiliki keempat variasi bentuk koloni, sedangkan kode morfologi E hanya ditemukan pada 1 sampel. Kode variasi yang ditemukan dalam setiap nomor selanjutnya diambil satu koloni perwakilan untuk pengidentifikasian koloni *S. aureus* menggunakan uji koagulase di dalam tabung reaksi berisi plasma kelinci.

### Identifikasi Koagulase *Staphylococcus aureus*

Pengujian terhadap koagulase dilakukan setelah pembacaan dan seleksi koloni secara morfologi. Koloni yang telah teridentifikasi positif dalam medium BPA selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung berisi koagulase plasma kelinci (*coagulase rabbit plasma*). Setelah penghomogenan menggunakan vortex dan inkubasi selama 24 jam pada temperatur 35°C, terdapat 2 sampel dalam pengujian yang teridentifikasi sebagai koloni *S. aureus*. Nomor yang teridentifikasi positif dalam uji koagulase adalah nomor sampel 7 kode morfologi A dan nomor sampel 19 dengan kode morfologi A dan B (Tabel 2).

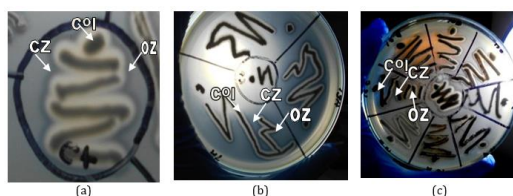
Hasil positif pada pengujian terhadap koagulase menunjukkan adanya gumpalan (koagulasi) pada seluruh bagian tabung yang telah diisi dengan plasma kelinci. Penggumpalan yang baik dapat diuji dengan membalikkan tabung, akan terlihat gumpalan tidak akan jatuh meski tabung dalam posisi terbalik. Hasil negatif koagulase ditunjukkan dengan tidak adanya penggumpalan pada tabung atau tetap dalam

bentuk cair (Gambar 6). Penggumpalan ini merupakan penanda positif koloni *S. aureus* karena bakteri ini dapat menggumpalkan plasma darah dengan enzim koagulasi yang dimilikinya. Sebagai perbandingan dan data komplementer, masing-masing koloni dengan variasi bentuk A hingga E pada setiap nomor diinokulasikan kembali di dalam media BPA. Data tersebut untuk memperjelas bagaimana kenampakan setiap kode yang diujikan dalam uji terhadap keberadaan koagulasi.



**Gambar 2.** Hasil uji koagulasi *S. aureus*. (a) *S. aureus* positif koagulasi; (b) *S. Aureus* negatif koagulasi. Hasil positif ditandai dengan adanya penggumpalan (*clotting*) pada dasar tabung yang tidak akan bergerak bila dirotasikan.

Kode morfologi yang memiliki nilai positif koagulasi tampak tidak berbeda nyata morfologinya dengan koloni yang memiliki hasil negatif terhadap koagulasi (Gambar 7). Koloni dengan hasil positif dan negatif, keduanya menghasilkan zona bening dan zona keruh yang merupakan ciri khas *S. aureus*. Koloni dengan kode morfologi yang sama dapat menghasilkan hasil uji koagulasi yang berbeda. Data menunjukkan kode morfologi A nomor 7 dan 19, serta kode B pada nomor 19 bernilai positif koagulasi sedangkan nomor lain yang telah memiliki nilai positif morfologi tidak menunjukkan adanya reaksi positif terhadap pengujian koagulasi (Tabel 2). Hal tersebut menunjukkan pengujian koagulasi merupakan uji yang harus dilakukan dalam pendeteksian *S. aureus*.



**Gambar 3.** Hasil inokulasi kembali beberapa tipe morfologi koloni diduga *S aureus* pada media BPA selama 24-48 jam. (a) kontrol positif koloni *S. aureus* ATCC 29213 (Col) dengan zona keruh (OZ) dan zona bening (CZ); (b) kultur positif uji koagulasi koloni *S aureus* dari sampel; (c) kultur negatif uji koagulasi koloni *S.aureus* dari sampel.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Kegiatan pengujian di Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan (BPMSPH) terdiri atas pengujian secara aktif yaitu dengan mengambil sampel dari lapangan, seperti pasar tradisional dan swalayan. Pengujian secara pasif yaitu dengan menguji suatu sampel yang berasal dari suatu perusahaan, pedagang, maupun pihak lain yang membutuhkan produknya memiliki sertifikat bebas cemaran baik cemaran mikroba, residu bioassay, maupun cemaran kimia. Pihak-pihak ini datang secara sukarela kepada BPMSPH dengan membayar biaya yang bervariasi sesuai dengan jenis dan jumlah pengujian yang diajukan. Sampel-sampel yang datang diberikan nomor singkat seperti nomor "131" untuk memudahkan dalam pelabelan. Nomor tersebut sudah tercatat dalam arsip yang berisi identitas lengkapnya dan tidak dapat digunakan oleh sampel lain. Arsip menyimpan identitas berupa jenis produk atau sampel, lokasi asal sampel, serta identitas penjual atau pemilik sampel yang diujikan.

Sampel yang diujikan pada kegiatan praktik lapangan berjumlah 25 sampel. Sampel ini merupakan sampel *monitoring* atau sampel yang secara aktif diambil dari lapangan. Sampel diambil dari suatu pasar tradisional di Jawa Tengah oleh staf BPMSPH. Sampel yang diujikan dalam praktik lapangan adalah daging sapi mentah. Daging sapi ini dilakukan pengujian secara lengkap mulai dari pengujian cemaran mikroba, residu bioassay, dan cemaran kimia. Pengujian dari sampel *monitoring* ini dilakukan untuk memantau dan menjaga kualitas daging sapi yang beredar dipasaran agar aman dari adanya cemaran yang membahayakan konsumen. Praktik lapangan ini hanya mencakup pengujian terhadap adanya cemaran *S. aureus* atau dikenal sebagai *Staphylococcus* positif koagulasi.

Kemampuan suatu kultur bakteri untuk menghasilkan koagulasi biasanya diidentifikasi sebagai hasil positif untuk identifikasi koloni *S. aureus*. Uji koagulasi merupakan metode umum yang dilakukan untuk uji konfirmasi dari bakteri *S. aureus* ini. Produksi koagulasi oleh bakteri diasosiasikan dengan patogenitas dari bakteri yang diuji (Normanno *et al.* 2007). Koagulasi merupakan substansi yang dapat menggumpalkan plasma dari manusia atau hewan. Koagulasi terjadi ketika fibrinogen dikonversikan menjadi fibrin oleh trombin. Di bawah kondisi fisiologi, aktivasi enzim



proteolitik dari prekursor inaktif protrombin menjadi trombin adalah tahap akhir di dalam regulasi koagulasi. *Staphylocoagulase* yang disekresikan oleh *S. aureus* secara langsung mengikat protrombin untuk membentuk kompleks *Staphylostrombin* (Vanassche *et al.* 2010). Hasil positif dari pengujian keberadaan *S. Aureus* ini dapat menggambarkan bagaimana kondisi sanitasi dari pihak yang memproduksi daging sapi tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa proses pengolahan dan alat yang digunakan dalam proses pengolahan daging sapi tersebut mempunyai sanitasi yang kurang baik sehingga dikhawatirkan akan menyebabkan penyakit bila sampai beredar di pasaran (Handayani dan Purwanti 2010). Masuknya *S. aureus* ke dalam daging sapi yang diujikan memiliki beberapa kemungkinan, diantaranya melalui kontak manusia dan lingkungan dengan daging sapi, atau memang merupakan mikroba yang sudah terdapat dalam daging tersebut. Lingkungan pasar yang kurang terjaga sanitasinya berpeluang besar dalam menyebarkan cemaran koloni *S. aureus*. Bila tidak ditangani dengan tepat, keberadaan mikroba ini pada tubuh manusia beresiko tersebar ke dalam makanan, yang kemudian dapat menyebabkan penyakit. Produk-produk yang tidak memenuhi standar keamanan pangan dapat dicegah penyebarannya melalui pemantauan dari Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan (BPMSPH).

Pengujian *S. aureus* di BPMSPH menggunakan media Agar Baird-Parker ditambahkan dengan suspensi kuning telur-telurit (*egg yolk-tellurite emulsion*) dari Oxoid sebagai media kultur. Media ini merupakan media yang direkomendasikan oleh badan Standar Nasional Indonesia (SNI). Agar Baird-Parker (BPA) mengandung zat selektif yaitu glisin, litium, dan telurit yang dapat menekan pertumbuhan bakteri lain tanpa menghambat pertumbuhan dari bakteri *S. aureus*. Koloni *S. aureus* yang tumbuh pada media BPA dengan penambahan suspensi kuning telur-telurit (*egg yolk-tellurite*) berwarna hitam mengkilat dan dikelilingi oleh dua zona hasil metabolisme sel. Zona bening yang terbentuk merupakan indikasi adanya aktifitas proteolitik dan zona opak atau keruh terbentuk karena adanya aktifitas lipolitik (Viçosa *et al.* 2010). Pengujian dilakukan dengan pengenceran sampel terlebih dahulu dalam medium *buffered peptone water* (BPW) hingga  $10^{-1}$  atau 1 ml sampel dalam 9 ml BPW.

Banyak media yang telah digunakan dalam isolasi dan enumerasi dari *Staphylococcus* positif koagulase dari bahan pangan, dan beberapa diantaranya telah dipublikasikan memiliki keunggulan dalam hal efisiensi maupun efektifitas media terhadap identifikasi bakteri ini. Akan tetapi, media tersebut kebanyakan membutuhkan biaya yang mahal untuk setiap pengujian. Menurut Patou *et al.* (2008), ketika pengujian dilakukan pada bahan pangan yang rutin serta hanya sedikit kemungkinan ditemukannya *S. aureus* didalamnya, akan lebih baik jika menggunakan media selektif yang tidak mahal, mudah untuk disiapkan dan stabil dalam penyimpanan. Hal tersebut merupakan salahsatu alasan digunakannya agar Baird-Parker (BPA) dalam pengujian ini. Medium BPW hanya merupakan medium yang berperan memperbaiki kembali sel-sel koloni *S. aureus* dan membantunya beradaptasi dengan lingkungan baru diluar lingkungan lamanya, yaitu daging sapi.

Hasil pengujian terhadap keberadaan bakteri diduga *S. aureus* pada daging sapi yang berasal dari pasar tradisional di Jawa Tengah, memiliki sampel yang tercemar sebanyak 20 sampel dari total 25 sampel. Sebanyak 20 sampel yang positif ini masih termasuk kedalam hasil positif sementara, karena hasil pengujian morfologi harus diujikan kembali pada uji secara biokimia. Pengujian biokimia ini dilakukan untuk melihat adanya enzim koagulase dengan menggunakan plasma kelinci dengan *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) sebagai mediumnya. Terdapat 2 sampel dengan hasil positif terhadap pengujian enzim koagulase. Enzim ini merupakan penanda diagnostik bagi *S. aureus* karena bakteri ini mampu menggumpalkan plasma darah. Hasil positif ini ditandai dengan adanya penggumpalan pada dasar tabung yang tidak akan bergerak bila tabung diposisikan secara terbalik.

Korelasi yang kuat ditemukan antara uji koagulase dengan terbentuknya zona bening karena aktivitas proteolitik pada medium BPA. Hasil pengujian menunjukkan, koloni yang positif dengan pengujian koagulase juga mampu mereduksi telurit dan melakukan aktivitas proteolitik sehingga menghasilkan zona bening pada medium BPA. Setelah pengujian dengan plasma kelinci, koloni yang memiliki hasil positif koagulase diinokulasikan kembali kedalam media. Hasilnya adalah koloni dengan kode morfologi A pada nomor 7 dan 19, serta koloni dengan kode morfologi B pada nomor

19 menghasilkan koloni dengan zona bening (Gambar 7b).

## KESIMPULAN

Hasil positif terhadap identifikasi koagulase merupakan kunci konfirmasi adanya keberadaan koloni *S. aureus* dalam daging sapi. Koloni yang memiliki hasil positif identifikasi secara morfologi belum tentu positif terhadap keberadaan koagulase. Terdapat 2 sampel dari 25 sampel dalam pengujian yang menunjukkan hasil positif terhadap keberadaan *S. aureus*.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Badan Pusat Statistik (BPS). 2009-2016. Produksi Daging Sapi menurut Provinsi. <http://www.bps.go.id> [20 Agustus 2017].
2. Baird-Parker AC. 1962. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. *J Appl Bacteriol.* 25: 12-19.
3. Baird-Parker AC, Davenport E. 1965. The effect of recovery medium on the isolation of *Staphylococcus aureus* after heat treatment and after storage of frozen or dried cells. *J Appl Bacteriol.* 28: 390-402.
4. Borneo News. 2017. Penyebab Keracunan Massal, Bakteri *Staphylococcus aureus*. <http://www.borneonews.co.id/berita/63242-penyebab-keracunan-massal-bakteri-staphylococcus-aureus> [Diakses 20 Agustus 2017].
5. Handayani KS, Purwanti M. 2010. Kesehatan ambing dan higiene pemerahan di peternakan sapi perah Desa Pasir Buncir Kecamatan Caringin. *Jurnal Penyuluhan Pertanian* 5(1): 47-54.
6. Holmberg SD, Blake PA. 1984. Staphylococcal food poisoning in the United States: new facts and old misconceptions. *JAMA* 251: 487- 489.
7. Jawetz E, Melnick J, Adelberg EA, Brooks GF, Butel JS, Ornston LN. 1995. *Mikrobiologi Kedokteran Edisi 20*. (Alih bahasa: Nugroho dan Maulany RF). Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
8. Katzung BG. 1998. *Basic and Clinical Pharmacology 7th edition*. USA: Prentice Hall
9. Loeb L. 1903. The influence of certain bacteria on the coagulation of the blood. *J Med Res.* 10: 407-419.
10. Mead GC, Norris AP, Bratchell N. 1989. Differentiation of *Staphylococcus aureus* from freshly slaughtered poultry and strains „endemic“ to processing plants by biochemical and physiological tests. *J Appl Bacteriol.* 66: 153- 159.
11. Miller LS, Cho JS. 2011. Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. *Nature* 11: 505-518.
12. Normanno G *et al.* 2007. Occurrence, characterization, and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 115: 290-296.
13. Patou J *et al.* 2008. *Staphylococcus aureus* enterotoxin B, protein A, and lipoteichoic acid stimulations in nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 121: 110-115.
14. Turner FJ, Schwartz BS. 1958. The use of a lyophilized human plasma standardized for blood coagulation factors in the coagulase and fibrinolytic tests. *J Lab Clin Med.* 52: 888-894.
15. anassche T, Verhaegen J, Willy E, Peetermans, Hoylaerts MF, Verhamme P. 2010. Dabigatran Inhibits *Staphylococcus aureus* Coagulase Activity. *Clinical Microbiology* 48(11): 4248-4250.
16. Viçosa GN, Moraes PM, Yamazi AK, Nero LA. 2010. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the Petrifilm Staph Express count system. *Food Microbiology* 27: 447-452.

## Prevalensi *Escherichia coli* pada Sampel Daging Ayam pada Unit Usaha di Provinsi Banten

Kanti Puji Rahayu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

\*email korespondensi penulis: kantipujirahayu@pertanian.go.id

### ABSTRAK

Daging ayam merupakan medium pertumbuhan yang baik untuk mikroba, hal ini dikarenakan daging ayam memiliki kandungan nutrisi yang tinggi. Salah satu mikroba yang paling sering ditemui dalam daging ayam adalah bakteri *Escherichia coli* (*E.coli*). *E.coli* merupakan flora normal saluran pencernaan, tetapi beberapa strain *E.coli* merupakan patogen yang dapat menyebabkan diare. Penularan *E.coli* pada manusia bisa melalui kontak langsung dengan hewan, konsumsi daging yang tidak dimasak dengan sempurna, dan air yang telah terkontaminasi. Penelitian ini bertujuan untuk menghitung jumlah bakteri *E.coli* pada sampel daging ayam di unit unit usaha di Provinsi Banten. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 40 sampel ditemukan sebanyak 36 sampel daging ayam (90%) mempunyai nilai *E.coli* dibawah BMCM (Batas Maksimum Cemaran Mikroba) berdasarkan SNI 7388:2009 yaitu  $1 \times 10^1$  CFU/gram dan 4 sampel (10%) masih diatas BMCM.

**Kata kunci :** *E.coli*, Daging Ayam

### PENDAHULUAN

Daging ayam mempunyai peranan penting dalam pemenuhan gizi masyarakat sebagai salah satu sumber protein hewani. Permintaan daging ayam berkembang pesat seiring tingginya tingkat konsumsi daging ayam oleh masyarakat. Produksi daging ayam potong dalam skala besar dilakukan oleh rumah potong ayam modern dan tradisional. Tempat pendistribusian atau perusahaan rumah potong ayam (RPA) pada umumnya telah mempunyai sarana penyimpanan yang memadai, namun tidak dapat dihindari apabila terjadi kerusakan atau kontaminasi pada saat proses pemotongan dan saat pendistribusian daging ayam. Tindakan pencegahan dapat dilakukan dengan meminimalisir adanya kontaminasi diantaranya dengan tindakan higienis, sanitasi, refrigerasi yang baik serta penanganan yang tepat (Judge et al., 1989).

Jumlah dan jenis mikroorganisme yang terdapat pada bahan pangan menentukan mutu mikrobiologi dari suatu produk makanan. Jumlah dan jenis mikroorganisme pada bahan pangan dapat mencerminkan mutu bahan mentahnya, keadaan sanitasi pada pengolahan, dan keefektifan metode pengawetan (Fardiaz, 1983). Keamanan pangan dari produk yang akan dikonsumsi sangat diperlukan terutama dalam mencegah bahan pangan dari kemungkinan terjadinya pencemaran, baik dari mikroorganisme, bahan kimia maupun benda lain yang dapat merugikan serta membahayakan

kesehatan manusia. Mikroorganisme hidup yang mampu bersporisasi dalam usus dan menyebabkan penyakit dapat diakibatkan oleh keracunan makanan. Mengonsumsi produk pangan yang bermutu akan lebih menjamin keamanan pangan dan mencegah terjadinya keracunan makanan.

Keracunan makanan juga dapat disebabkan oleh daging ayam yang tercemar mikroorganisme dari lingkungan seperti pada saat pemotongan, kondisi air pencucian daging ayam, kebersihan alat dan pekerja. Dengan menggunakan standar mutu pangan yang dikeluarkan oleh SNI dapat mempermudah dalam menentukan mutu produk pangan. Standar mutu bahan pangan merupakan pedoman yang digunakan untuk berbagai kebutuhan misalnya pemilihan bahan baku atau menghasilkan bahan pangan berdaya saing tinggi. Indonesia sendiri telah memiliki standar mutu yang dikeluarkan oleh Badan Standarisasi Nasional Indonesia atau SNI. Daging ayam yang beredar di pasar baik tradisional maupun modern yang belum memenuhi kriteria mutu yang baik akan mudah menyebabkan penyakit karena terkontaminasi oleh bakteri. Salah satu contoh bakteri patogen adalah *Escherichia coli* yang diketahui dapat menyebabkan diare, kolera, dan berbagai penyakit pada saluran pencernaan. *Escherichia coli* pertama kali ditemukan oleh seorang bakteriologis yang berasal dari Jerman bernama Theodor Von Escherich pada tahun 1885. Secara alamiah *E. coli* adalah penghuni umum dalam

pencernaan manusia dan hewan (Melliawati, 2009).



**Gambar 1.** Bentuk bakteri *Escherichia coli* pada mikroskop elektron (Stevens, 2009)

Bakteri *E. coli* merupakan bakteri yang bersifat fakultatif anaerob dan memiliki tipe metabolisme fermentasi dan respirasi tetapi pertumbuhannya paling banyak di bawah keadaan anaerob, namun beberapa *E. coli* juga dapat tumbuh dengan baik pada suasana aerob. Suhu yang baik untuk menumbuhkan *E. coli* yaitu pada suhu optimal 37 °C pada media yang mengandung 1% peptone sebagai sumber nitrogen dan karbon. Ukuran sel dari bakteri *E. coli* biasanya berukuran panjang 2,0 – 6,0 µm dan lebar 1,1 – 1,5 µm dengan bentuk sel bulat dan cenderung ke batang panjang (Melliawati, 2009).

Struktur sel dari bakteri *E. coli* terdiri dari dinding sel, membran plasma, sitoplasma, flagella, nucleus (inti sel), dan kapsul. Bakteri *E. coli* dalam beberapa jam setelah tumbuh dapat membentuk koloni pada saluran pencernaan manusia maupun hewan. Faktor utama pembentukan koloni ini ialah mikroflora dalam tubuh masih sedikit, rendahnya kekebalan tubuh, faktor stres, pakan, dan infeksi agen patogen lain. Kebanyakan *E. Coli* memiliki virulensi atau kemampuan untuk menimbulkan penyakit yang rendah dan bersifat oportunistis (Songer & Post 2005).

Berdasarkan persyaratan mikrobiologi *E. coli* dipilih sebagai indikator tercemarnya air atau makanan karena keberadaan bakteri *E. coli* dalam sumber air atau makanan merupakan indikasi terjadinya kontaminasi tinja manusia. Adanya *E. coli* menunjukkan suatu tanda praktek sanitasi yang tidak baik karena *E. Coli* bisa berpindah dengan kegiatan tangan ke mulut atau dengan pemindahan pasif lewat makanan, air, susu dan produk-produk lainnya. Bakteri ini dapat menyebabkan penyakit seperti diare, infeksi saluran kemih, pneumonia, meningitis pada bayi yang baru lahir dan infeksi luka (Karsinah et al., 1994).

Adapun latar belakang dilaksanakannya

program monitoring dan surveilans ini antara lain adalah karena adanya beberapa kejadian yang dapat merugikan kesehatan masyarakat veteriner yang diantaranya yaitu :

Masih ditemukannya produk-produk asal hewan dengan tingkat higienitas dan kualitas yang masih sangat rendah, seperti contohnya masih adanya tingkat kontaminasi cemaran mikroba yang masih sangat tinggi.

## **MATERI DAN METODE**

Alat-alat yang digunakan adalah cawan petri, tabung reaksi, pipet volumetrik 10 mL, *bulb*, gunting stainless, gelas ukur 250 ml, pinset, *stomacher*, timbangan, spidol, pengocok tabung (*vortex*), *HiGlass Bead Sterilizier*, inkubator, *water bath*, *clean bench* dan wadah steril.

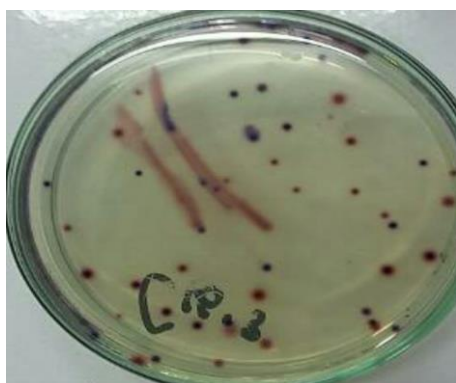
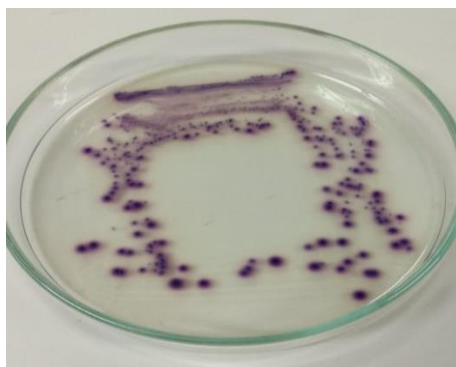
Bahan-bahan yang digunakan adalah *Brilliance agar E.Coli/F.Coliform*, *Buffered Pepton Water (BPW)*, bakteri *E.coli*, ATCC 25922 sebagai kontrol positif *E.coli*

## **Pengujian Total E.Coli**

Berdasarkan Metode Uji 5.4.1.3-1 dengan acuan : *The Oxoid Manual 9<sup>th</sup> edition, 2006*, uji total *E.coli/Coliform* memiliki prosedur sebagai berikut :

- a) Penyiapan contoh
  - Timbang contoh padat dan semi padat sebanyak 25 g atau ukur contoh cair sebanyak 25 ml secara aseptik, kemudian masukkan dalam wadah steril.
  - Untuk contoh daging, telur, dan susu Tambahkan 225 ml larutan *BPW* 0,1% steril ke dalam kantong steril yang berisi contoh, homogenkan dengan *stomacher* 230 rpm selama 1 menit. Ini merupakan larutan dengan pengenceran 10<sup>-1</sup>.
- b) Cara uji
  - Pindahkan 1 ml suspensi pengenceran 10<sup>-1</sup> tersebut dengan pipet steril ke dalam larutan 9 ml *BPW* untuk mendapatkan pengenceran 10<sup>-2</sup>. Dengan cara yang sama seperti di atas dibuat pengenceran 10<sup>-3</sup> dan seterusnya, sesuai kebutuhan.
  - Pipet masing-masing 1 ml dari setiap pengenceran ke dalam cawan petri steril secara duplo.
  - Tambahkan media *Brilliance agar E.coli/F.Coliform* sebanyak 18-20 mL pada setiap cawan petri.
  - Homogenkan dengan cara memutar cawan petri membentuk angka 8.
  - Buat kontrol positif bakteri *F.Coliform* dan *E.Coli*.

- Buat kontrol BPW + media *Brilliance agar E.coli/F.Coliform*.
- Buat kontrol negatif media *Brilliance agar E.coli/F.Coliform*.
- Inkubasi pada temperatur 37 °C selama 24 jam.
- Pengamatan setelah 24 jam 37 °C :  
Bandingkan /samakan dan hitung pertumbuhan koloni sampel dengan koloni pada kontrol positif.



**Gambar 2.** Kontrol Positif *E.coli* ATCC 25922

Dan Koloni *E.coli* pada Sampel daging ayam

Pada media chromogenik agar pada media chromogenik agar

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari data terlihat bahwa jumlah *E.coli* yang berada dibawah batas maksimum cemaran (<BMCM) 90 % dimana dalam SNI dinyatakan bahwa batas maksimum cemaran mikroba *E.coli* daging ayam adalah sebesar  $1 \times 10^1$  CFU/gram (SNI

7388:2009).

**Tabel 1.** Data PMSR 2018

Hal ini menunjukkan bahwa tingkat *hygiene* sanitasi pada unit unit usaha terutama Unit Usaha yang mempunyai Nomor Kontrol Veteriner (NKV) mendapatkan perhatian yang utama. Selain itu unit unit usaha ber NKV selalu menjaga rantai dingin dalam penyimpanannya.

Sedangkan *E.coli* yang berada di atas batas maksimum cemaran mikroba ( >BMCM) 10%. Kemungkinan hal ini disebabkan oleh berbagai faktor terutama pada saat pengeluaran jeroan ayam yang kurang hati hati oleh para pekerja, sumber air bersih yang telah terkontaminasi bakteri *E.coli* atau para pekerja yang kurang menjaga kebersihan serta rantai dingin yang kurang terjaga.

## KESIMPULAN

Dari hasil pengujian yang dilakukan, dapat disimpulkan bahwa 40 sampel daging ayam yang diuji dinyatakan 36 sampel (90%) layak konsumsi karena tidak melebihi batas maksimal cemaran mikroba *E coli* yang telah ditetapkan dalam yaitu  $1 \times 10^1$  CFU/gram (SNI 7388:2009), namun 4 sampel (10%) masih memiliki jumlah *E.coli* yang berada pada batas maksimal yang telah ditetapkan

## DAFTAR PUSTAKA

1. Badan Standarisasi Nasional. 2000. *Standar Nasional Indonesia Tentang Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Batas Maksimum Residu Dalam Bahan Makanan Asal Hewan*. Badan Standarisasi Nasional. Jakarta.
2. Badan Standarisasi Nasional. 2008. *Standar Nasional Indonesia Tentang Metode Pengujian Cemaran Mikroba Dalam Daging, Telur dan Susu Serta Hasil Olahannya* . Jakarta : Badan Standarisasi Nasional.
3. Mardiana, Aerita AN, Pawenang ET. 2014. Hubungan Hieginge Pedagang dan Sanitasi dengan Kontaminasi *Salmonella* pada Daging Ayam Potong. *Unnes Journal Of Public Health*. Vol 3:9.
4. Jasmadi, Yuli H, Christine J. 2014. Prevalensi Bakteri *Coliform* Dan *Escherichia coli* Pada Daging Sapi Yang Dijual Di Pasar Tradisional Dan Pasar Modern Di Kota Pekanbaru

Keterangan Kegiatan	Regional	Provinsi	Kota/Kab.	Unit Usaha/ Penyimpanan	Jenis Sampel	>E.coli		
						<BMCM	>BMCM	Jumlah Sampel
Sampel PMSR	Subang	Banten	Kab. Tangerang	RPA/ RPU	Daging Ayam	20	0	20
Sampel PMSR	Subang	Banten	Kota Serang	RPA/ RPU	Daging Ayam	6	0	6
Sampel PMSR	Subang	Banten	Kota Serang	Swalayan	Daging Ayam	10	4	14
Total						36	4	40
Persentase						90%	10%	

## Penentuan Kadar Aflatoksin M1 pada Susu Bubuk Dengan Metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Elisa)*

Aufa Khairunnisa<sup>1</sup>, Sani Susanty<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departemen Kimia Fakultas MIPA Institut Pertanian Bogor

<sup>2</sup>Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan Bogor

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

### ABSTRAK

Susu merupakan sumber protein hewani yang mengandung nilai gizi tinggi dan banyak dikonsumsi oleh masyarakat. Tingginya kadar nutrisi pada susu, mengakibatkan mudah terkontaminasi oleh mikroorganisme yang memanfaatkan nutrisi di dalam susu sebagai sumber makanan. 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). Aflatoksin merupakan senyawa metabolit sekunder yang bersifat toksik, diproduksi oleh jamur dari genus *Aspergillus*. Aflatoksin M1 merupakan senyawa beracun yang bersifat stabil terhadap pemanasan, baik suhu pasteurisasi maupun sterilisasi, dan proses penyimpanan. Penentuan aflatoksin M1 pada susu bubuk dilakukan dengan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. Penentuan residu Aflatoksin M1 pada 10 sampel susu bubuk menunjukkan Aflatoksin M1 ditemukan disemua sampel susu bubuk akan tetapi konsentrasinya berada di bawah Batas Maksimum Residu (BMR) yang ditentukan oleh SNI 7385-2009 yaitu sebesar 500 ppt. Hal ini menunjukkan bahwa susu bubuk tersebut aman untuk dikonsumsi.

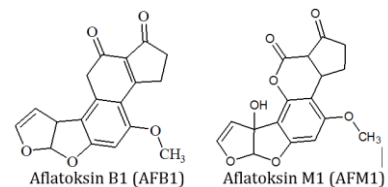
**Kata kunci :** aflatoksin M1, ELISA, susu bubuk

### PENDAHULUAN

Aflatoksin merupakan senyawa metabolit sekunder yang bersifat toksik, diproduksi oleh jamur dari genus *Aspergillus* (Klich, 2007). Penemuan aflatoksin bermula dari munculnya penyakit "Turkey X" di Inggris pada tahun 1962 pada saat 100.000 kalkun mati setelah mengonsumsi kacang tanah yang terkontaminasi aflatoksin (Amaiike dan Keller, 2011). Ratusan orang meninggal dunia di Kenya akibat mengonsumsi jagung yang terkontaminasi aflatoksin pada kurun waktu kurang dari 10 tahun terakhir (Lewis *et al*, 2005). Aflatoksin mengakibatkan aflatoksikosis pada manusia atau ternak karena menghirup atau mengonsumsi makanan atau pakan terkontaminasi aflatoksin dalam kadar yang tinggi. Aflatoksikosis kemudian menjadi masalah serius di negara berkembang salah satunya Indonesia.

Beragam komoditas pertanian berpotensi terkontaminasi aflatoksin, terutama kacang tanah, jagung, biji kapas, beras dan hasil ternak yang mengonsumsi bahan tersebut, seperti susu. Susu merupakan sumber protein hewani yang mengandung nilai gizi tinggi dan banyak dikonsumsi oleh masyarakat. Tingginya kadar nutrisi pada

susu, mengakibatkan mudah terkontaminasi oleh mikroorganisme yang memanfaatkan nutrisi di dalam susu sebagai sumber makanan (Sunarlim, 2016). 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), metabolit utama yang dihasilkan oleh jamur dari genus *Aspergillus*, khususnya *A. flavus*, *A. parasiticus*, dan *A. nomius* (Galvano *et al*, 2001). Struktur kimia AFB1 dan AFM1 (Gambar 1).



**Gambar 1** Struktur kimia AFB1 dan AFM1 (Prabawati, 2006)

Aflatoksin M1 merupakan senyawa beracun yang bersifat stabil terhadap pemanasan, baik suhu pasteurisasi maupun sterilisasi, dan proses penyimpanan (Stoloff *et al*, 1975). Aflatoksin M1 tidak terurai pada pemanasan mencapai 250 °C (Gizachew *et al*, 2016) sehingga masih dapat ditemukan pada susu pasteurisasi (Amoli-Diva *et al*, 2015),



susu *ultra high temperature* (Heshmati dan Milani 2010), dan susu bubuk (Iqbal *et al.*, 2015). Sapi perah yang mengonsumsi pakan yang tercemar AFB1 berubah menjadi AFM1 yang toksisitasnya mirip dengan AFB1 (Tandiabang, 2011). Aflatoksin M1 dapat terakumulasi dalam tubuh manusia dan hewan sehingga menyebabkan karsinogenik (penyebab kanker), mutagenik (ICAR, 1987) dan *immuno suppressive* (Heathcote dan Hibbert, 1978). *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 2002) telah mengklasifikasikan AFM1 sebagai penyebab kanker pada manusia (*carcinogenic to humans*) sehingga termasuk golongan karsinogen kelas 1. Dengan demikian, penting untuk memberikan kontrol yang efektif terhadap susu dan produk olahannya sesuai dengan batas maksimum residu (BMR) yang ditetapkan oleh otoritas regulasi makanan. Beberapa negara telah menetapkan batas maksimum residu AFM1 pada susu seperti Amerika Serikat sebesar 500 ppt dan Uni Eropa sebesar 50 ppt (FAO, 2004). Batas maksimum residu AFM1 pada susu dan produk olahan susu di Indonesia ditetapkan dalam SNI 7385-2009 tentang Batas Maksimum Kandungan Mikotoksin dalam Pangan yaitu 500 ppt (BSN, 2009). Oleh karena itu, perlu dilakukan pengukuran konsentrasi AFM1 pada produk susu bubuk yang beredar di masyarakat menggunakan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) merupakan suatu teknik deteksi dengan metode serologis yang berdasarkan reaksi spesifik antara antigen dan antibodi dengan menggunakan enzim sebagai indikator (McCarthy, 2003). Metode ini digunakan karena memiliki kelebihan, yaitu spesifisitas dan sensitifitasnya yang tinggi (Zheng *et al.*, 2006). Prinsip dasar metode ini ialah analisis interaksi antara antigen dan antibodi yang teradsorpsi secara pasif pada permukaan fase padat dengan menggunakan konjugat antibodi atau antigen yang dilabel enzim. Enzim ini akan bereaksi dengan substrat dan menghasilkan warna. Warna yang timbul dapat ditentukan secara kuantitatif dengan pembacaan nilai absorbansi pada ELISA reader (Burgess, 1995). Nilai absorbansi yang diperoleh akan berbanding terbalik dengan konsentrasi AFM1 pada susu bubuk.

## MATERI DAN METODE

### Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada percobaan, yaitu labu takar 50 dan 100 mL, spatula plastik, tabung sentrifugasi ukuran 2 mL, neraca analitik, rak tabung sentrifugasi, *Eppendorf Centrifuge* 5430, ELISA Reader, komputer, refrigerator, alat-alat gelas, gunting, *micropipette*, pipet tip, dan aluminium foil. Bahan-bahan yang digunakan dalam percobaan, yaitu 10 sampel susu bubuk, akuades, ELISA *Aflatoxin M1* kit yang terdiri atas *microwell* dengan 96 sumur, *wash buffer salt*, standar aflatoksin, enzim konjugat, antibodi, substrat, dan *stop solution*.

### Prosedur

Percobaan terdiri atas beberapa tahap, yaitu pembuatan larutan *washing buffer*, preparasi sampel, pengujian sampel dengan metode ELISA, dan pembacaan hasil dengan ELISA reader.

### Pembuatan Larutan *Washing Buffer*

*Washing buffer salt* yang terdapat pada ELISA kit dilarutkan dengan akuades dalam labu takar 100 mL untuk mendapatkan *washing buffer* konsentrat. Selanjutnya, sebanyak 10 mL bagian dari *washing buffer* konsentrat diencerkan dengan akuades dalam 100 mL labu takar lainnya. Nilai pH larutan buffer yaitu 7.4.

### Preparasi Sampel

Sampel susu bubuk masing-masing ditimbang sebanyak 5 g dan diencerkan dengan akuades dalam labu takar 50 mL. Setelah itu, larutan tersebut dipipet sebanyak 2 mL ke dalam tabung sentrifugasi. Pemisahan campuran pada sampel dilakukan dengan alat *Eppendorf Centrifuge* 5430 pada kecepatan 3500 rcf selama 10 menit dengan suhu 15 °C. Setelah proses sentrifugasi selesai, supernatan yang berada pada lapisan atas selanjutnya akan digunakan dalam pengujian dengan metode ELISA.

### Pengujian Sampel dengan Metode ELISA

Sebanyak 32 sumur disiapkan pada *microwell*. Larutan antibodi sebanyak 100 µL ditambahkan ke setiap sumur, dihomogenkan, dan diinkubasi pada suhu ruang (20–25 °C) selama 15 menit. Larutan antibodi dibuang dengan cara membalikkan posisi *microwell* pada kertas penyerap, kemudian dilakukan pencucian sebanyak 3 kali dengan 250 µL larutan *washing buffer* pada setiap sumur. Enam standar aflatoksin M1 sebanyak 100 µL

ditambahkan pada setiap sumur secara berurutan dari konsentrasi rendah ke tinggi. Sampel sebanyak 100  $\mu\text{L}$  ditambahkan ke dalam sumur lainnya. *Microwell* kemudian 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  $\mu\text{L}$  larutan *washing buffer*. Enzim konjugat sebanyak 100  $\mu\text{L}$  ditambahkan ke setiap sumur, dihomogenkan, dan diinkubasi pada suhu ruang dalam keadaan gelap selama 15 menit. Selanjutnya, cairan dibuang dan dilakukan pencucian dengan cara yang sama seperti sebelumnya. Substrat sebanyak 100  $\mu\text{L}$  ditambahkan ke setiap sumur dan dihomogenkan, kemudian diinkubasi pada suhu ruang dalam keadaan gelap selama 15 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 100  $\mu\text{L}$  *stop solution* ke setiap sumur. Absorbansi diukur dengan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm. Pembacaan harus dilakukan dalam jangka waktu kurang dari 15 menit setelah penambahan *stop solution* dengan melihat nilai *optical density* (OD) yang tercetak dari ELISA reader.

#### Pembacaan Hasil dengan ELISA Reader

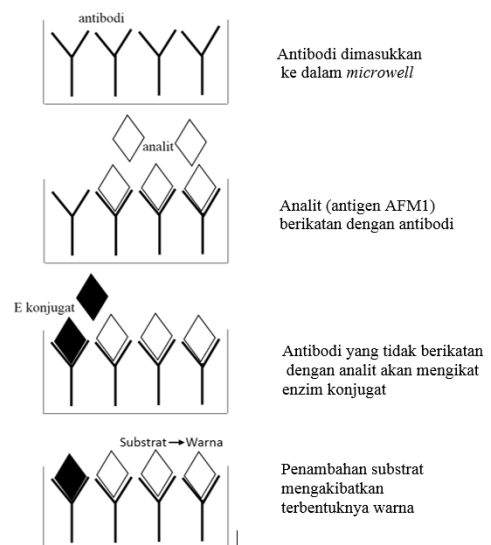
*Software* diaktifkan. *Microwell* dimasukkan ke dalam alat ELISA reader yang secara otomatis melakukan pengukuran absorbansi. Hasil data mentah muncul dan tersimpan dalam komputer. *Software* diatur pada panjang gelombang 450 nm dan dimasukkan data mentah sampel. Hasil data dalam bentuk kurva dan tabel konsentrasi aflatoksin M1 dinyatakan dalam *part per trillion* (ppt) kemudian hasil ELISA reader dicetak. Menurut pedoman ELISA kit yang digunakan, batas deteksi minimum untuk susu pada ELISA reader adalah 50 ppt setelah pengenceran.

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel susu bubuk yang digunakan untuk penentuan aflatoksin M1 (AFM1) merupakan jenis susu bubuk *full cream* yang diperoleh dari beberapa produsen di Indonesia. Susu bubuk berjumlah 10 sampel dan merupakan jenis susu sapi. Susu bubuk dikemas dalam kemasan plastik dengan berat 250–350 g. Penentuan AFM1 pada susu bubuk ditentukan dengan metode ELISA kompetitif. Metode ini umumnya dikembangkan untuk

menganalisis senyawa berbobot molekul rendah seperti AFM1. Metode ELISA kompetitif dibagi menjadi dua jenis yaitu langsung dan tidak langsung. Percobaan dilakukan dengan memanfaatkan metode ELISA kompetitif langsung.

Metode ELISA kompetitif langsung dipilih karena memiliki sensitivitas yang lebih baik dibandingkan dengan kompetitif tidak langsung (Rachmawati, 2005). Pembacaan hasil uji ELISA menggunakan ELISA reader dengan prinsip yang hampir sama dengan spektrofotometri. ELISA reader adalah spektrofotometer khusus yang telah dimodifikasi. Alat tersebut memiliki monokromator yang dilengkapi oleh kisi difraksi yang membatasi kisaran panjang gelombang yang digunakan yaitu 400–750 nm. Pada ELISA kompetitif (Gambar 2), antibodi spesifik untuk aflatoksin M1 yang telah terikat pada fase padat akan berikatan dengan aflatoksin M1 dalam sampel atau standar. Enzim konjugat yang ditambahkan akan bersaing untuk berikatan dengan antibodi, kemudian enzim konjugat yang berikatan dengan antibodi akan bereaksi dengan substrat dan memberikan warna (Hussain 2011). Warna yang dihasilkan terbaca sebagai *optical density* (OD) atau absorbansi pada panjang gelombang 450 nm. Panjang gelombang tersebut merupakan panjang gelombang optimum karena terjadi serapan warna yang maksimum. Semakin banyak analit yang berikatan dengan antibodi maka warna semakin memudar sehingga nilai absorbansi akan semakin kecil pada standar aflatoksin yang memiliki konsentrasi tinggi (Herniawati, 2017).



**Gambar 2** Proses pengikatan antibodi dengan analit dan enzim konjugat pada metode kompetitif ELISA (Stanker dan Beier, 1995)

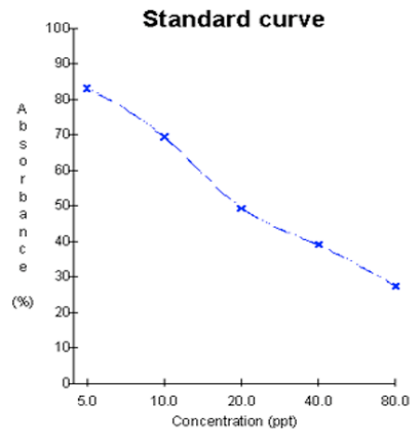


Pengujian dilakukan dengan menggunakan enam standar dengan konsentrasi 0, 5, 10, 20, 40, dan 80 ppt. Keenam standar tersebut diuji dengan dua kali ulangan atau duplo. Rerata absorbansi yang diperoleh dikonversi menjadi konsentrasi standar terukur. Lampiran 4 menunjukkan hasil uji konsentrasi standar AFM1 pada ELISA reader. Hasil konsentrasi terbaca dalam satuan *part per trillion* (ppt). Konsentrasi yang dihasilkan berfungsi dalam pembuatan kurva standar yang menjadi acuan dalam mencari konsentrasi aflatoxin pada sampel.

Kurva standar AFM1 hasil uji dengan ELISA reader (Gambar 3) menunjukkan hubungan antara konsentrasi standar dengan absorbansinya. Kurva yang dihasilkan berbentuk *cubic spline* sesuai dengan kurva standar yang terdapat pada ELISA kit. Limit deteksi uji ELISA untuk mendeteksi AFM1 pada percobaan adalah 50 ppt dengan nilai 50% *inhibition concentration* (IC<sub>50</sub>) sebesar 19.5 ppt. Limit deteksi adalah tingkat konsentrasi terendah yang masih dapat dideteksi dan masih memberikan respon yang signifikan. Nilai IC<sub>50</sub> adalah konsentrasi AFM1 untuk menghambat 50% intensitas warna (Lee dan Rachmawati, 2006). Nilai IC<sub>50</sub> diperoleh melalui persamaan regresi linear antara persentase inhibisi terhadap konsentrasi standar AFM1, persentase inhibisi diperoleh menggunakan rumus :

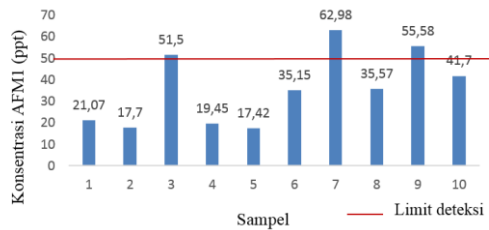
$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Nilai IC<sub>50</sub> diperoleh melalui persamaan regresi linear yang didapatkan dari pengujian daya inhibisi dengan memasukkan nilai  $y = 50$ . Nilai IC<sub>50</sub> yang diperoleh masuk ke dalam rentang IC<sub>50</sub> yang diizinkan, yaitu 16.24–24.36 ppt merujuk kepada kurva standar optimum yang terdapat di dalam ELISA kit yang memiliki nilai IC<sub>50</sub> sebesar 20.3 ppt (Lampiran 5).



Gambar 3 Kurva standar aflatoxin M1 hasil uji dengan ELISA reader

Sepuluh sampel susu bubuk diuji secara duplo. Faktor pengenceran (FP) adalah 10 karena dilakukan pengenceran 1:10 terhadap sampel (Lampiran 6). Hasil pengujian (Gambar 4) menunjukkan sebanyak 7 sampel susu memiliki konsentrasi di bawah limit deteksi, sedangkan 3 sampel lainnya berada pada rentang deteksi. Sampel yang berada di bawah limit deteksi masih dapat dihitung, akan tetapi hasil yang diperoleh tidak signifikan. Perbedaan konsentrasi tersebut dipengaruhi oleh sumber produksi susu yang berbeda. Sumber produksi susu berasal dari peternak susu yang berbeda sehingga penanganan pasca panen seperti lama penyimpanan pakan ternak juga berbeda. Pakan yang sudah disimpan cukup lama dengan cara penyimpanan yang kurang baik, seperti disimpan pada ruangan atau gudang yang lembab dan bocor akan mengandung aflatoxin tinggi (Rachmawati, 2005). Hewan ternak yang mengonsumsi pakan dengan kandungan aflatoxin yang tinggi akan menghasilkan susu dengan konsentrasi AFM1 yang tinggi. Berdasarkan SNI 7385-2009 tentang Batas Maksimum Kandungan Mikotoksin dalam Pangan, konsentrasi AFM1 pada susu bubuk tidak boleh melebihi 500 ppt (BSN, 2009). Nilai tersebut adalah jumlah yang masih dapat diterima oleh tubuh terutama pada organ hati. Di lain pihak, batas maksimum residu (BMR) yang ditetapkan oleh Uni Eropa adalah 50 ppt (FAO, 2004). Merujuk Gambar 4, terdapat 3 sampel dengan konsentrasi di atas BMR yang ditetapkan oleh Uni Eropa. Meskipun demikian, seluruh sampel memiliki konsentrasi di bawah BMR yang ditetapkan oleh SNI sehingga aman untuk dikonsumsi.



Gambar 4. Diagram konsentrasi aflatoksin M1 pada sampel

Keberadaan AFM1 pada susu bubuk dapat berasal dari AFM1 pada susu segar. Hal ini disebabkan oleh AFM1 memiliki sifat yang stabil terhadap pemanasan suhu pasteurisasi (Stoloff *et al.*, 1975). Proses pemanasan pada susu pasteurisasi menurut SNI 01-3141-1995 ialah 63–66 °C selama minimum 30 menit atau 72 °C selama minimum 15 detik, sehingga AFM1 masih dapat ditemukan pada susu bubuk (Iqbal *et al.*, 2015). Menurut Mohammadian *et al.*, (2010), konsentrasi AFM1 pada susu segar dan susu setelah proses pasteurisasi tidak berbeda nyata. AFM1 dapat ditemukan dalam pangan asal hewan akibat kontaminasi langsung dan kontaminasi tidak langsung (*carry-over* dari pakan). Kontaminasi langsung terjadi akibat pertumbuhan kapang pada pangan akibat adanya cemaran. Kontaminasi tidak langsung terjadi akibat hewan mengonsumsi pakan yang tercemar mikotoksin dan mengekskresikan residu mikotoksin ke dalam produk hewan seperti daging, telur, dan susu (Sengun *et al.*, 2008; Prandini *et al.*, 2009).

Aflatoksin M1 dapat ditemukan pada susu segar akibat kontaminasi tidak langsung atau *carry-over* dari pakan. Pakan ternak seperti tumbuhan hijau, oat, jagung, kacang-kacangan, biji kapas, dan gandum sangat mudah terkontaminasi oleh aflatoksin B1 (AFB1). Aflatoksin B1 adalah jenis aflatoksin yang dihasilkan oleh kapang *Aspergillus flavus* (Sari dan Wantini, 2017). Kapang ini dapat tumbuh subur pada kondisi iklim tropis seperti di Indonesia. Kapang *A. flavus* dapat tumbuh secara optimum pada suhu 25–45 °C dengan pH 7.4 (Rakhmawati 2006). Kondisi lingkungan yang lembab hingga tingkat kelembaban 80–90% membuat *Aspergillus* dapat tumbuh dengan subur. Kadar air lingkungan sebesar 16–17% turut mempengaruhi tingkat pertumbuhan *Aspergillus* pada tumbuhan. *Aspergillus* dapat menghasilkan spora yang mudah tertiuap angin dan menyebar sehingga menyebabkan kontaminasi terhadap bahan pangan (Safika *et al.*, 2014). Mamalia laktasi yang mengonsumsi bahan pangan yang terkontaminasi AFB1 akan mengekskresikan

metabolit hidroksilasi berupa AFM1 ke dalam susu yang dihasilkan (Prandini *et al.*, 2009).

Kandungan AFM1 dalam susu telah dilaporkan pada susu segar yang berasal dari peternakan sapi perah di beberapa wilayah di Indonesia. Widiastuti *et al.*, (2006) melaporkan AFM1 pada susu segar yang berasal dari peternakan sapi perah di Kota Bogor memiliki konsentrasi 1–343 ppt. Berbeda di daerah Pangalengan (Kabupaten Bandung) rata-rata susu memiliki konsentrasi 2–1200 ppt. Di lain pihak, 113 sampel susu segar yang berasal dari peternakan sapi perah di Yogyakarta menghasilkan 42.5% konsentrasi AFM1 kurang dari 5 ppt dan 57.5% mengandung AFM1 dengan konsentrasi 5–25 ppt (Nuryono *et al.*, 2009). Penelitian lain memberikan hasil konsentrasi AFM1 dalam susu segar dari peternakan sapi perah di Yogyakarta sebesar 33–113 ppt (Fillaeli, 2007).

Dampak dari AFM1 dalam susu perlu diperhatikan walaupun berada di bawah batas maksimum kandungan aflatoksin yang telah ditetapkan karena paparan jangka panjang AFM1 dalam pangan pada tingkat yang sangat rendah dapat mengganggu kesehatan manusia. Asupan harian (*daily intake*) untuk AFM1 yang dapat ditoleransi ialah 0.2 ng/kg berat badan (Kuiper-Goodman, 1990). Dosis dan durasi paparan aflatoksin sangat mempengaruhi beragam akibat yang ditimbulkan, seperti paparan aflatoksin dalam dosis tinggi mengakibatkan infeksi akut dan kematian, sedangkan dosis subletal secara kronis menimbulkan gangguan nutrisi dan imunologis (Williams *et al.*, 2004). Aflatoksin merupakan hepato-karsinogen yang dapat mengakibatkan kerusakan hati dan apabila dikonsumsi dalam jumlah kecil secara terus menerus dapat mengakibatkan kanker hati (Syarief *et al.*, 2003). *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 2002) telah mengklasifikasikan mikotoksin sebagai salah satu penyebab kanker pada manusia, karsinogenitas.

Efek pada hewan ternak yang mengonsumsi pakan yang telah terkontaminasi aflatoksin dapat menghambat pertumbuhan dan menurunkan efisiensi hewan ternak dalam mengonversikan pakan menjadi protein hewani serta mengurangi produksi susu. Hal lain yang penting dari bahaya aflatoksin, yaitu memiliki kemampuan untuk terakumulasi dalam tubuh. Hewan ternak yang mengonsumsi pakan yang tercemar oleh aflatoksin dengan kadar rendah dapat terakumulasi dan menjadi signifikan selama masa hidup ternak. Kadar aflatoksin

dalam konsentrasi rendah dapat mengganggu aktivitas sel dan pada konsentrasi yang tinggi dapat membunuh sel (Rasooly *et al.*, 2013).

Beberapa negara termasuk Indonesia telah menetapkan batas maksimum kadar aflatoxin pada pakan dan pangan untuk menjaga agar kadar aflatoxin tetap dalam batas-batas yang wajar dan tidak membahayakan manusia dan hewan ternak. Indonesia mengatur Batas Maksimum Residu (BMR) AFM1 pada susu dan produk olahan susu melalui peraturan SNI 7385-2009 dan Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.06.1.52.4011 yaitu sebesar 500 ppt atau 0.5 ppb. Uni Eropa, Austria, Jerman, Swiss, Belgia, Prancis, Turki, Iran, dan Argentina memiliki BMR AFM1 pada susu sebesar 50 ppt. Amerika Serikat dan Brazilia memiliki BMR AFM1 pada susu sebesar 500 ppt sama seperti Indonesia (Widiastuti, 2014). Hasil percobaan menunjukkan bahwa 10 sampel susu bubuk memiliki konsentrasi jauh di bawah BMR yang ditetapkan di Indonesia, sehingga aman untuk dikonsumsi.

Upaya pengendalian dapat dilakukan untuk meminimalkan kandungan AFM1 dalam susu. Pengendalian dapat dilakukan dengan cara pencegahan dan cara langsung. Upaya pencegahan dilakukan dengan pemberian pakan yang bebas atau sedikit mengandung AFB1. Pengendalian kontaminasi aflatoxin pada pakan dapat dilakukan mulai dari ladang pertanian, pabrik pakan, dan gudang penyimpanan pakan. Kondisi yang tetap kering akan membuat kapang penghasil AFB1 sulit untuk tumbuh. Pengendalian secara langsung dapat dilakukan dengan menggunakan absorben, bahan kimia, atau dengan memanfaatkan metode biologis (Widiastuti, 2014). Contoh metode langsung yang dapat dilakukan adalah dengan metode biologis 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 DAN SARAN

### Kesimpulan

Penentuan aflatoxin M1 pada susu bubuk dilakukan dengan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Aflatoxin M1 ditemukan pada 10 sampel susu bubuk, akan tetapi konsentrasinya berada di bawah Batas Maksimum Residu

(BMR) yang ditentukan oleh SNI 7385-2009 yaitu sebesar 500 ppt. Hal ini menunjukkan bahwa susu bubuk tersebut aman untuk dikonsumsi.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Amoli-Diva M, Taherimaslak Z, Allahyari M, Pourghazi K, Manafi MH. 2015. Application of dispersive liquid-liquid microextraction coupled with vortex-assisted hydrophobic magnetic nanoparticles based solid-phase extraction for determination of aflatoxin M1 in milk samples by sensitive micelle enhanced spectrofluorimetry. *J Talanta*. 134(1):98-104.
2. Amaike S, Keller NP. 2011. *Aspergillus flavus*. *Ann Rev of Phytopath*. 49(1):107-133.
3. [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2009. SNI 7385:2009 Batas Maksimum Kandungan Mikotoksin dalam Pangan. Jakarta (ID): BSN.
4. Burgess GW. 1995. Prinsip dasar ELISA dan variasi konfigurasinya. Artama WT, penerjemah. Di dalam: Burgess GW, editor. *Teknologi ELISA dalam diagnosis dan Penelitian*. Yogyakarta (ID): GM University Pr. Terjemahan dari: *ELISA Technology in Diagnosis and Research*.
5. Endarwati D, Kusumaningtyas E. 2017. Beberapa fungsi *Rhizopus sp* dalam meningkatkan nilai nutrisi bahan pakan. *Wartazoa*. 27(2): 81-88.
6. [FAO] Food and Agriculture Organization. 2004. *Worldwide Regulation for Mycotoxins in Food and Feed in 2003* [internet]. [diunduh 2019 Sept 15]. Tersedia dari: <http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.html>
7. Fillaeli A. 2007. Cemar alam aflatoxin B1 dalam pakan konsentrat dan aflatoxin M1 dalam susu sapi perah [tesis]. Yogyakarta (ID): Universitas Gajah Mada.
8. Galvano F, Galofaro V, Ritieni A, Bognanno M, De Angelis A, Galvano G. 2001. Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Italy: second year of observation. *Food Additives and Contaminants*. 18(7):644-646.
9. Gizachew D, Szonyi B, Tegegne A, Hanson J, Grace D. 2016. Aflatoxin contamination of milk and dairy feeds in the greater addis ababa milk shed, Ethiopia. *Food Control*. 59(1):773-779.

10. Heathcote JG, Hibbert JR. 1978. *Aflatoxins: Chemical and Biological Aspects. Developments in Food Science 1*. Amsterdam (NL): Elsevier Scientific Publishing Company.
11. Herniawati CN. 2017. Titer HBsAg dengan perbedaan waktu pembacaan absorbansi pada ELISA reader [skripsi]. Semarang (ID): Universitas Muhammadiyah Semarang.
12. Heshmati A, Milani JM. 2010. Contamination of UHT milk by aflatoxin M1 in Iran. *Food Control*. 21(1):19–22. doi:10.1016/j.foodcont.2009.03.013.
13. Hussain I. 2011. Aflatoxin measurement and analysis. Di dalam: Torres-Pacheco I, editor. *Aflatoxins-Detection, Measurement and Control* [Internet]. [diunduh 2019 Okt 8]. Tersedia pada: <http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-detection-measurement-and-control/aflatoxin-measurement-and-analysis1>.
14. [IARC] International Agency for Research on Cancer. 2002. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 82: Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. Perancis (FR): IARC.
15. ICAR. 1987. *Aflatoxin in Groundnuts*. New Delhi (IN): ICAR.
16. Iqbal SZ, Jinap S, Pirouz A, Faizal AA. 2015. Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review. *Trends Food Sci Tech*. 46(1):110–119.
17. Klich MA. 2007. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Path*. 8(6):713–722.
18. Kuiper-Goodman T. 1990. Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxins: aflatoxin, ochratoxin, and zearalenon. *Can J Physiol Pharmacol*. 68:1017–1024.
19. Lee NA, Rachmawati S. 2006. A rapid ELISA for screening aflatoxin B1 in animal feed and feed ingredients in Indonesia. *Food and Agricultural Immunology*. 17(2):91–104
20. Lewis L, Onsongo M, Njapau H, Schurz-rogers H, Lubner G, Kieszak S, Nyamongo J, Backer L, Dahiye AM, Misore A, Decock A, Rubin C. 2005. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya. *Environ Health Perspect*. 113(12):1763–1767.
21. McCarthy J. 2003. Immunological techniques: ELISA. Di dalam: McMeekin TA, editor. *Detecting Pathogens in Food*. Cambridge (GB): Woodhead Publishing Limited.
22. Mohammadian B, Khezri M, Ghasemipour N, Mafakheri S, Poorghafour LP. 2010. Aflatoxin M1 contamination of raw and pasteurized milk produced in Sanandaj, Iran. *Arch Razi Institute*. 65(2): 99–104.
23. Nuryono N, Agus A, Wedhastri S, Maryudani YB, Setyabudi FMCS, Bohm J, Razzazi-Fazeli E. 2009. A limited survey of aflatoxin M1 in milk from Indonesia by ELISA. *Food Control*. 20:721–724. doi:10.1016/j.foodcont.2008.09.005.
24. Prabawati YS. 2006. Aspek Kimiawi Racun Aflatoksin Dalam bahan Pangan Dan Pencegahannya. *Kaunia*. 2(2):135–148.
25. Prandini A, Tansini G, Sigolo S, Filippi L, Laporta M, Piva G. 2009. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products [review]. *Food Chem Toxicol*. 47:984–991. doi:10.1016/j.fct.2007.10.005.
26. R-Biopharm. 2016. *Ridascreen® ELISA Aflatoxin M1 kit Art. No. R2601 Enzyme Immunoassay for The Quantitative Analysis of Aflatoxin M1 in Milk and Milk Powder*. Darmstadt (DE): R-Biopharm.
27. Rachmawati S. 2005. Aflatoksin dalam pakan ternak di Indonesia: persyaratan kadar dan pengembangan teknik deteksinya. *Wartazoa*. 15(1):26–37.
28. Rakhmawati A. 2006. Biosorpsi ion logam kadmium oleh *Aspergillus flavus*. *Prosiding seminar nasional MIPA*. Yogyakarta (ID): Universitas Negeri Yogyakarta.
29. Rasooly R, Hernlem B, He X, Friedman M. 2013. Non-linear relationships between aflatoxin B1 levels and the biological response of monkey kidney vero cells. *Toxins*. 5: 1447–1461.
30. Safika, Jamin P, Aisyah S. 2014. Deteksi Aflatoksin B1 pada jenis makanan olahan jagung menggunakan *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). *Jurnal Medika Veterinaria*. 9(1): 23–25.
31. Sari NM, Wantini S. 2017. Gambaran jamur *Aspergillus flavus* pada kecap manis hasil industri rumahan yang dijual di Pasar Kipondo dan Pasar Margorejo Kota Metro. *Jurnal Analis Kesehatan*. 6(1): 585–589.
32. Sengun IY, Yaman DB, Gonul SA. 2008. Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. *World Mycotoxin J*. 1(3): 291–298. doi:10.3920/WMJ2008.x041.

33. Stanker LH, Beier RC. 1995. Introduction to immunoassay for residue analysis: concept, formats, and applications in immunoassays for residue analysis . In: ELISA workshop. *Simple test for monitoring mycotoxins and pesticides in produce*;1999 November 15-17; Ho Chi Minh City, Vietnam. Australia (AU): University of Sydney. hlm 12-22.
34. Stoloff LM, Trucksess M, Hardin N, Francis OJ, Hayes JR, Polan CE, Campbell TC. 1975. Stability of aflatoxin M in milk. *J Dairy Sci.* 58(12):1789-1793.
35. Sunarlim R. 2016. Potensi *Lactobacillus* Sp. asal dari dadih sebagai starter pada pembuatan susu fermentasi khas Indonesia. *Bul Teknologi Pasca Panen.* 5(1):69-76.
36. Syarief R, Ega L, Nurwitri CC. 2003. *Mikotoksin Bahan Pangan*. Bogor (ID): IPB Press.
37. Tandibang J. 2011. Kajian pengendalian aflatoxin pada jagung. *Seminar Nasional Serealia*. Sulawesi Selatan: Balai Penelitian Tanaman Serealia.
38. Widiastuti R, Maryam R, Bahri S, Firmansyah R. 2006. Residu aflatoxin M1 pada susu sapi segar di Pangalengan dan Bogor Jawa Barat. Di dalam: *Seminar nasional teknologi peternakan dan veteriner*. Bogor (ID): Balai Penelitian Veteriner.
39. Widiastuti R. 2014. Residu Aflatoxin dan Metabolitnya pada Berbagai Produk Pangan Asal Hewan dan Pencegahannya. *Wartazoa.* 24(4):179-190
40. Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Joly CM, Aggarwal D. 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr.* 80:1106-1122
41. Zheng MZ, Richard JL, Binder J. 2006. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia.* 161: 261-273. doi:10.1007/s11046-006-0215-6.

**Pengaruh Penambahan Berbagai Macam Konsentrasi  
2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride (Ttc) pada Pengujian  
Total Plate Count terhadap Pertumbuhan Bakteri  
Gram Negatif dan Gram Positif**

**Ika Kartika Syarifah\*, Hasniah Achmad**

*Laboratorium Cemanan Mikroba, Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi  
Produk Hewan Bogor, Indonesia*

*\*email korespondensi: ikakartikasyarifah@pertanian.go.id*

**ABSTRACT**

*2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) is a dye agent that is widely used in microbiological analysis, especially in the total plate count (TPC) examination which functions as a bacterial cell dye and makes it easy to calculate the number of colonies. The concentration of TTC added to the culture medium is very important because it can affect the growth of bacterial cells. Consequently, the TTC concentration used in culture medium should be low enough to avoid growth inhibition but high enough to allow color development in the colony of bacteria. Concentration of TTC that added to the culture medium used for TPC examination in this study was 0.1% (1T), 0.5% (5T), 0.8% (8T) and without TTC (0T). The results obtained from this study were the addition of TTC concentrations did not provide a significant difference and there was no significant effect on the average growth of the number of colonies of Gram-negative and Gram-positive bacteria.*

**Keywords:** *Concentration of TTC, Bacteria, Dye, Growth Inhibitor*

**PENDAHULUAN**

2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) adalah zat pewarna yang banyak diterapkan di berbagai disiplin ilmu seperti pada ilmu kedokteran, farmakologi, imunologi, biokimia dan histokimia, tetapi sebagian besar pemakaian TTC digunakan pada bidang mikrobiologi untuk digunakan sebagai pewarna mikroorganisme yang bertujuan untuk menghitung jumlah koloni dalam media kultur agar (Senyk *et al.*, 1987; Moussa *et al.*, 2013).

TTC disintesis oleh Pechmann dan Runge pada tahun 1894. Pada tahun 1941, Kuhn dan Jerchel menunjukkan bahwa bakteri, khamir dan tumbuhan mampu mereduksi pewarna ini dan salah satu aplikasi pertama TTC adalah untuk memverifikasi kapasitas perkecambahan dari biji-bijian. Sejak saat itu banyak aplikasi lain yang dilaporkan termasuk penggunaan TTC dalam mikrobiologi (Beloti *et al.*, 1999). Gershenfeld dan Weber Jr. (1951) melaporkan bahwa *Staphylococcus* sp. koagulase-positif membentuk koloni dengan pusat berwarna orange ketika TTC ditambahkan ke dalam media kultur agar,

sedangkan *Staphylococcus* sp. koagulase negatif membentuk koloni berwarna merah muda. Turner *et al.* (1963) mengamati bahwa *Streptococcus cremoris* dapat dibedakan dari *Streptococcus lactis* dengan penggunaan TTC, karena memiliki kemampuan yang berbeda dalam mereduksi TTC.

Zat pewarna ini merupakan komponen penting yang banyak digunakan untuk menganalisis mikrobiologi dari bahan pangan. TTC tidak berwarna dalam bentuk teroksidasi dan akan berwarna merah saat tereduksi (Beloti *et al.*, 1999). Mikroorganisme mampu menyerap TTC secara enzimatik, kemudian direduksi menjadi formazan yang disimpan di dalam sel dan selanjutnya sel berubah warna menjadi merah. Mikroorganisme seperti bakteri dapat mereduksi TTC bila sel aktif atau dalam keadaan hidup, oleh sebab itu metode uji menggunakan TTC dapat digunakan sebagai metode yang relatif cepat untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri agen antimikroba dalam waktu kurang dari 12 jam (Moussa *et al.*, 2013).

Beberapa faktor, seperti pH, suhu, cahaya dan konsentrasi TTC, dapat menghambat proses reduksi TTC (Jonas dan

Prasad, 1969). Jumlah konsentrasi TTC yang ditambahkan ke dalam media kultur agar sangat penting karena penggunaan konsentrasi yang tinggi dapat merusak membran sel (Senyk *et al.*, 1987), sehingga konsentrasi TTC yang digunakan harus cukup rendah untuk menghindari penghambatan pertumbuhan tetapi cukup tinggi untuk memungkinkan terbentuknya warna (Hurwitz dan Carthy, 1986).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penggunaan konsentrasi TTC terhadap pertumbuhan bakteri pada media agar untuk digunakan sebagai metode analisis mikrobiologi pada bahan pangan.

## **MATERI DAN METODE**

### **Disain Penelitian**

Disain penelitian yang digunakan adalah eksperimental dengan menggunakan 4 jenis konsentrasi TTC yang ditambahkan ke dalam media *plate count agar* (PCA) pada uji *total plate count* (TPC) yang mengandung bakteri dalam jumlah tertentu.

### **Persiapan Sampel Uji**

Sebanyak 2 buah erlenmeyer berisi 225 ml susu steril masing-masing ditambahkan dengan 25 ml *nutrient broth* berisi inokulum bakteri yang akan diuji. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sebagai kontrol bakteri Gram positif dan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 sebagai kontrol bakteri Gram negatif. Inokulum bakteri yang ditambahkan ke dalam susu steril mengandung bakteri sebanyak  $1 \times 10^3$  CFU, sehingga diperkirakan jumlah koloni yang terbaca pada cawan petri berisi media PCA adalah berjumlah ratusan ( $1 \times 10^2$  CFU).

### **Persiapan Media PCA dengan Beragam Konsentrasi TTC**

*Stock solution* TTC yang digunakan yaitu 1% (w/v) dalam aquadest steril. Konsentrasi TTC yang akan digunakan untuk penelitian ini adalah sebanyak 0.1% (1T), 0.5% (5T), 0.8% (8T) dan tanpa penambahan TTC (0T) ke dalam sejumlah media PCA steril.

### **Prosedur Uji TPC**

Sebanyak 1 ml sampel uji yang telah berisi bakteri *Escherichia coli* dipipetkan ke dalam cawan petri steril secara aseptik dengan 4 kali ulangan untuk setiap konsentrasi TTC. Tuang sebanyak 15-20 ml

PCA pada setiap cawan petri yang telah diberi label sesuai dengan jumlah konsentrasi TTC yang akan diuji, kemudian dihomogenkan dan dibiarkan memadat. Inkubasi selama  $\pm 48$  jam dengan suhu  $32 \pm 2^\circ\text{C}$  di dalam inkubator dengan posisi tutup cawan petri menghadap ke atas. Selanjutnya dilakukan metode pengujian yang sama pada sampel uji yang berisi bakteri *Staphylococcus aureus*.

Koloni bakteri dihitung berdasarkan jumlah koloni yang berwarna merah pada cawan petri berisi PCA dengan penambahan TTC dan koloni berwarna putih untuk cawan petri berisi PCA tanpa penambahan TTC.

## **Hipotesis dan Analisis Data**

Hipotesis dari penelitian ini adalah penambahan sejumlah konsentrasi TTC pada media PCA tidak mempengaruhi rata-rata pertumbuhan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* pada pengujian TPC. Data yang diperoleh selanjutnya diolah secara statistika dengan menggunakan uji ANOVA.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Penggunaan TTC dalam pengujian mikrobiologi dapat membantu dalam perhitungan koloni dengan cara mewarnai sel bakteri, dan dapat digunakan untuk membedakan koloni bakteri dari partikel makanan atau sampel yang tidak dapat bereaksi dengan pewarna (Beloti *et al.*, 1999). Selain itu dapat membedakan antara sel bakteri hidup dengan bakteri yang sudah mati (Moussa *et al.*, 2013). Akan tetapi, jumlah pemberian konsentrasi TTC yang ditambahkan ke dalam media PCA sangat penting karena penggunaan konsentrasi TTC yang tinggi dapat merusak membran sel (Senyk *et al.*, 1987).

Pada penelitian ini diperoleh 2 parameter uji yang akan dibahas secara terpisah antara hasil uji terhadap bakteri Gram negatif yaitu *Escherichia coli* dan bakteri Gram positif yaitu *Staphylococcus aureus*, berdasarkan pemberian konsentrasi TTC yang berbeda-beda.

### **Analisis Pada Bakteri Gram Negatif**

Pada hasil pengujian menggunakan bakteri *Escherichia coli* sebagai kontrol untuk bakteri Gram negatif yang dijelaskan pada Tabel 1, rata-rata hasil perhitungan koloni dimana pada konsentrasi TTC tertinggi (8T) yaitu sebesar 90.5 CFU diperoleh jumlah yang lebih banyak dibandingkan dengan

pemberian konsentrasi TTC lainnya (5T dan 1T). Sedangkan pada media PCA tanpa penambahan TTC (0T) diperoleh jumlah koloni paling rendah yaitu sebesar 82 CFU. Hal tersebut membuktikan bahwa penambahan TTC dapat meningkatkan akurasi perhitungan koloni. Susu sebagai matriks pada sampel yang diuji pada penelitian ini memberikan warna putih pada media PCA yang mengakibatkan perhitungan koloni tanpa penambahan TTC menjadi lebih sulit dilakukan.

Hal tersebut sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Ohara (1992) dan Baloti *et al.* (1999) dimana penggunaan TTC sangat dianjurkan untuk pengujian TPC dengan sampel uji yang dapat mewarnai atau mempengaruhi density dari media PCA seperti sampel susu, coklat, cabai bubuk dan lain-lain yang dapat mempersulit pembacaan atau membedakan antara koloni bakteri dan partikel lain yang mengakibatkan perhitungan koloni menjadi tidak akurat.

**Tabel 1** Hasil uji TPC koloni *Escherichia coli* dengan penambahan sejumlah konsentrasi TTC

Ulangan	Jumlah Koloni Berdasarkan Perlakuan Dosis TTC (CFU)			
	0T	8T	5T	1T
1	69	96	68	76
2	82	94	69	79
3	87	90	69	88
4	90	82	95	96
Total	328	362	301	339
<b>Rata-rata</b>	<b>82</b>	<b>90.5</b>	<b>75.25</b>	<b>84.75</b>

Untuk mengetahui pengaruh penambahan sejumlah konsentrasi TTC pada media PCA terhadap rata-rata pertumbuhan jumlah koloni bakteri *Escherichia coli* pada pengujian TPC, hasil uji tersebut dianalisis menggunakan uji ANOVA dan hasilnya dapat dilihat pada Tabel 2. Berdasarkan jumlah koloni yang diperoleh dan analisis hasil menggunakan uji ANOVA, nilai F hitung (1.687856) bernilai kurang dari F tabel (3.49), sehingga hipotesis dapat diterima dimana pemberian sejumlah konsentrasi TTC dan tanpa penambahan TTC tidak berbeda nyata dan tidak berpengaruh secara signifikan terhadap rata-rata pertumbuhan jumlah koloni bakteri *Escherichia coli* pada pengujian TPC.

**Tabel 2** Hasil uji ANOVA dari koloni *Escherichia coli* dengan penambahan konsentrasi TTC

Sumber	db	JK	KT	F hitung	Ftabel 5%
Perlakuan	3	481.25	160.4167	<b>1.687856</b>	<b>3.49</b>
Galat	12	1140.5	95.04167		
Total	15	1621.75			

Junillon dan Flandrois (2013) menyebutkan dalam penelitiannya bahwa sebagian besar aplikasi mikrobiologi untuk penggunaan TTC lebih difokuskan pada bakteri Gram negatif karena tidak memiliki efek toksisitas seperti pada bakteri Gram positif.

### Analisis Pada Bakteri Gram Positif

Pada hasil pengujian menggunakan bakteri *Staphylococcus aureus* sebagai kontrol untuk bakteri Gram positif yang ditunjukkan pada Tabel 3, diperoleh hasil rata-rata koloni pada media PCA tanpa penambahan TTC (0T) berjumlah paling banyak yaitu sebesar 134.25 CFU dibandingkan dengan jumlah koloni pada media yang ditambahkan dengan TTC. Koloni pada konsentrasi TTC tertinggi (8T) berjumlah paling sedikit yaitu sebesar 103.25 CFU, selanjutnya pada konsentrasi 5T (120.5 CFU) dan jumlah koloni terbanyak pada konsentrasi terendah (1T) yaitu sebesar 129 CFU.

Berdasarkan hasil tersebut diatas, terdapat selisih yang cukup banyak antara jumlah koloni pada media PCA tanpa penambahan TTC dengan jumlah koloni pada media dengan penambahan TTC. Hal tersebut dapat terjadi karena TTC memberikan efek toksisitas pada membran sel bakteri Gram positif pada konsentrasi tertentu. Junillon *et al.* (2012) menyebutkan bahwa pada beberapa penelitian penggunaan TTC, sensitivitas yang lebih tinggi ditunjukkan pada bakteri Gram positif dimana efek toksik dari TTC dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan koloni pada media agar.

Perbedaan jumlah koloni pada pemberian konsentrasi TTC yang berbeda yang ditunjukkan pada Tabel 3 membuktikan bahwa penggunaan konsentrasi TTC pada media PCA harus cukup rendah untuk menghindari penghambatan pertumbuhan bakteri, namun cukup tinggi untuk memungkinkan terbentuknya warna pada koloni (Hurwitz dan Carthy 1986).



**Tabel 3** Hasil uji TPC koloni *Staphylococcus aureus* dengan penambahan sejumlah konsentrasi TTC

Ulangan	Jumlah Koloni Berdasarkan Perlakuan dosis TTC (CFU)			
	0T	8T	5T	1T
1	127	139	142	145
2	146	137	121	129
3	125	14	121	124
4	139	123	98	118
Total	537	413	482	516
Rata-rata	134.25	103.25	120.5	129

Pada penelitian ini diperoleh hasil jumlah koloni *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi TTC terendah (1T) berjumlah paling banyak yaitu sebesar 129 CFU dibandingkan dengan konsentrasi 5T dan konsentrasi 8T. Meskipun jumlah koloni pada konsentrasi 1T menghasilkan jumlah koloni terbanyak, namun terbentuknya warna merah pada koloni kurang baik dan dapat mengakibatkan kesalahan perhitungan koloni. Hal tersebut sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Pegram (1969) serta Junillon dan Flandrois (2013) yang menyebutkan bahwa efek toksisitas dari TTC pada bakteri Gram positif membatasi pemberian konsentrasi TTC hingga level suboptimum untuk memberikan warna pada bakteri *Listeria monocytogenes*.

Untuk mengetahui pengaruh penambahan sejumlah konsentrasi TTC pada media PCA terhadap rata-rata pertumbuhan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* pada pengujian TPC, hasil uji dianalisis menggunakan uji ANOVA dan hasilnya dapat dilihat pada Tabel 4. Berdasarkan jumlah koloni yang diperoleh dan analisis hasil menggunakan uji ANOVA, nilai F hitung (0.710629) bernilai kurang dari F tabel (3.49), sehingga hipotesis dapat diterima dimana pemberian sejumlah konsentrasi TTC dan tanpa penambahan TTC tidak berbeda nyata dan tidak mempengaruhi secara signifikan terhadap rata-rata pertumbuhan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* pada pengujian TPC.

**Tabel 4.** Hasil uji ANOVA dari koloni *Staphylococcus aureus* dengan penambahan konsentrasi TTC

Sumber	db	JK	KT	F hitung	Ftabel 5%
Perlakuan	3	2210.5	736.8333	0.710629	3.49
Galat	12	12442.5	1036.875		
Total	15	14653			

Pada penelitian ini, hasil yang tidak berbeda nyata dan tidak mempengaruhi secara signifikan terhadap rata-rata pertumbuhan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* pada pengujian TPC menggunakan TTC atau tanpa TTC berbeda artinya dengan hanya menghitung selisih jumlah koloni yang tumbuh pada media PCA. Perhitungan koloni pada pengujian TPC memiliki perbedaan yang signifikan bila jumlah koloni yang dihitung memiliki perbedaan hingga mencapai satu LOG. Hal tersebut dibuktikan dengan diterimanya hipotesis penelitian ini melalui analisis menggunakan uji ANOVA.

Selisih jumlah koloni yang diperoleh pada setiap pemberian konsentrasi TTC yang berbeda membuktikan bahwa konsentrasi TTC yang digunakan harus cukup rendah untuk menghindari penghambatan pertumbuhan bakteri, tetapi cukup tinggi untuk memungkinkan terbentuknya warna.

## KESIMPULAN

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian konsentrasi TTC sebesar 0.1% (1T), 0.5% (5T), 0.8% (8T) dan tanpa penambahan TTC (0T) tidak berbeda nyata dan tidak memberikan pengaruh secara signifikan terhadap rata-rata pertumbuhan jumlah koloni bakteri Gram negatif dan Gram positif pada pengujian TPC, sehingga dapat digunakan sebagai metode analisis TPC pada bahan pangan. Penggunaan konsentrasi TTC pada bakteri Gram negatif tidak memiliki efek toksisitas seperti pada bakteri Gram positif, selain itu penambahan TTC dapat membantu perhitungan koloni dan dapat digunakan untuk membedakan koloni bakteri dari partikel sampel.

Saran yang dapat diberikan pada penelitian ini adalah menambahkan jumlah uji lebih dari 4 kali pengulangan untuk hasil yang lebih akurat dan menguji coba pada konsentrasi TTC yang lebih tinggi untuk mengetahui limit dan efek toksisitas yang ditimbulkan pada pertumbuhan koloni bakteri Gram positif.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Beloti V, Barros MAF, de Freitas JC, Nero LA, de Souza JA, Santana EHW, Franco BDGM. 1999. Frequency of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) non-reducing bacteria in pasteurized milk.

- Microbiol.* 3(2). DOI: 10.1590/S0001-37141999000200009.
2. Gershenfeld L, Weber Jr L.S. 1951. Bacterial variants produced in culture media containing 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. *Am J Pharm.* 123 (6): 203-207.
  3. Hurwitz CN, Mc Carthy TJ. 1986. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a novel tool in germicide dynamics. *J Pharm Sci.* 75 (9): 912-916.
  4. Jones PH, Prasad D. 1969. The use of tetrazolium salts as a measure of sludge activity. *J Water Poll Control Fed.* 41 (11): R441-R449.
  5. Junillon T, Vimont A, Mosticone D, Mallen B, Baril F, Rozand C, Flandrois JP. 2012. Simplified detection of food-borne pathogens: an in situ high affinity capture and staining concept. *J Microbiol Meth.* 91: 501e505.
  6. Junillon T, Flandrois JP. 2013. Diminution of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride toxicity on *Listeria monocytogenes* growth by iron source addition to the culture medium. *Food Microbiol.* 38:1e5.
  8. Moussa SH, Tayel AA, Al-Hassan AA, Farouk A. 2013. Tetrazolium/formazan test as an efficient method to determine fungal chitosan antimicrobial activity. *J Micology.* 753692:7.
  9. Ohara MT. 1992. Aplicação do cloreto de trifeniltetrazólio no teste de limite microbiano em medicamentos e cosméticos [disertasi]. São Paulo (BR): Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP.
  10. Pegram RG. 1969. The microbiological use of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride. *Med Lab Tech.* 26:175e198.
  11. Senyk GF, Kozlowski SM, Noar PS, Shipe WF, Bandler DK. 1987. Comparison of dry culture medium and conventional plating techniques for enumeration of bacteria in pasteurized fluid milk. *J Dairy Sci.* 70:1152-1158.
  12. Turner N, Sandine WE, Elliker PR, Day EA. 1963. Use of tetrazolium dyes in an agar medium for differentiation of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *J Dairy Sci.* 46: 380-385.

## Identifikasi Spesies Tikus Menggunakan *Real-Time* PCR *Melt Curve Analysis* (MCA)

Diyan Cahyaningsari<sup>1\*</sup>, Puji Rahayu<sup>1</sup>, Hanif Anisatun<sup>1</sup>, Metrizar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan Bogor

\*Email korespondensi penulis: diyanacs@pertanian.go.id

### ABSTRACT

*This research was conducted to optimize the method of real-time PCR amplification using melt curve analysis (MCA) to identify and analyse the presence of rat meat in animal product. The primers of rat sequences were included in master mix real-time commercial kit. The samples consisted of laboratory and local rats. The result of real-time PCR showed that Ct value in detection system below 35 cycle and similar melting point with positive control of commercial kit. Optimizing of real-time PCR by using melt curve analysis (MCA) could identify adulteration of rat meat in commercial animal products.*

**Keywords:** rat meat, real-time PCR, melt curve analysis (MCA)

### PENDAHULUAN

Seiring dengan meningkatnya angka pendapatan masyarakat berpengaruh terhadap gaya hidup masyarakat dalam mengkonsumsi daging sapi dan produk olahannya untuk memenuhi kebutuhan protein hewani. Hal tersebut mempengaruhi meningkatnya permintaan daging konsumsi terutama di kota-kota besar di Indonesia untuk memenuhi permintaan Hotel, Restoran dan Katering (HOREKA). Tingginya permintaan kebutuhan daging sapi yang tidak sebanding dengan ketersediaan daging sapi dapat memicu kenaikan harga daging yang tinggi. Hal tersebut dapat memungkinkan adanya praktik kecurangan pemalsuan daging dan produk olahannya. Saat ini telah banyak terjadi pemalsuan daging sapi dengan cara mencampur daging sapi asli dengan daging babi, tikus dan spesies lainnya. Adanya isu tentang pemalsuan daging tikus pada produk olahan daging sapi telah banyak dilaporkan.

Salah satu upaya penjaminan pangan asal hewan dilakukan dengan cara pengembangan metode untuk mengidentifikasi spesies terkait pemalsuan dan kehalalan suatu produk hewan. Beberapa metode uji yang digunakan saat ini untuk mendeteksi keberadaan daging dari spesies yang tidak dikehendaki antara lain *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (Asensio *et al.* 2008; Kuswandi *et al.* 2017), *electronic nose* (enose), *gas chromatography mass spectrometer with headspace analyzer* (GCMS-HS) (Nurjuliana *et al.* 2011; Kuswandi *et al.* 2017), imunokromatografi (Kuswandi *et al.* 2017), *polymerase chain reaction* (PCR)

(Pestana *et al.* 2010; Soares *et al.* 2013; Kim *et al.* 2016; Al-Kahtani *et al.* 2017; Perestam *et al.* 2017) dan *DNA hybridization* (Ballin *et al.* 2009). Metode analisis berdasarkan DNA, salah satunya PCR, merupakan metode identifikasi makhluk hidup yang cukup sensitif dan keakuratannya tinggi. Hal ini disebabkan karena setiap spesies memiliki sekuens DNA khasnya sendiri. Justifikasi adanya pemalsuan daging tikus terhadap daging sapi dan olahannya kerap sulit dibuktikan. Hal tersebut terjadi karena spesies tikus bervariasi dan memiliki susunan DNA yang berbeda sehingga primer DNA yang digunakan seringkali tidak sesuai dengan sampel yang ada pada saat pengujian untuk identifikasi spesies menggunakan metode PCR.

Proses PCR dilakukan dengan cara melipatgandakan sekuens nukleotida tertentu secara eksponensial dengan jumlah kelipatan hingga jutaan salinan melalui *in vitro* (Bottero *et al.* 2011). Prinsip kerja PCR yaitu proses pemanasan yang dilakukan berulang-ulang antara 20–30 kali siklus. Setiap siklus terdiri atas tiga tahap utama yaitu denaturasi, *annealing*, dan *elongation*. Metode PCR yang umum digunakan adalah PCR konvensional dan *real-time* PCR. Perbedaan antara PCR konvensional dengan *real-time* PCR terletak pada pembacaan hasil analisis. PCR konvensional memerlukan elektroforesis gel agarosa untuk menganalisis ampikon hasil proses amplifikasi. *Real-time* PCR hasil dapat dimonitor menggunakan fluoresensi dan ampikon cukup dianalisis menggunakan *melting curve analysis* (MCA) tanpa perlu dianalisis menggunakan elektroforesis gel

agarosa sehingga waktu yang diperlukan sangat singkat (Pestana *et al.* 2010). *Real-time* PCR merupakan pengembangan teknik PCR yang bertujuan untuk mempercepat proses pengujian dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. Teknik *real-time* PCR memiliki dua macam prinsip utama yaitu berdasarkan DNA *binding dye* atau yang dikenal dengan *Sybr Green I* dan berdasarkan probe yaitu *Taqman*, *Molecular beacons* and *scorpions*. Prinsip MCA adalah melting temperature suatu fragmen DNA dipengaruhi oleh panjang dan sekuens dari fragmen tersebut. Bila hanya ada 1 jenis fragmen DNA untai ganda, maka hanya akan muncul satu melting curve (Pestana *et al.* 2010).

Belum ditemukan adanya penelitian terkait analisis kandungan daging tikus dalam campuran bakso sapi dengan menggunakan *Real-Time* PCR, sedangkan yang sudah banyak dilakukan adalah menggunakan PCR konvensional (Faizah, 2013). Berdasarkan hal tersebut penelitian ini bertujuan untuk optimasi amplifikasi pengujian *real-time* PCR untuk identifikasi spesies tikus menggunakan *melting curve analysis* (MCA) sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi adanya spesies tikus pada produk pangan asal hewan..

## MATERI DAN METODE

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian adalah gunting, pinset, *single channel* mikropipet, *mini spin down*, dan *real-time thermal cycler Rotor-Gene Q*. Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daging tikus laboratorium dan daging tikus rumah, kit komersial ekstraksi *Dneasy Mericon Food Kit*, dan kit komersial master mix *Rat Sybr Select real time* PCR Kit.

### Metode

Identifikasi spesies tikus pada penelitian ini menggunakan teknik *real-time* PCR berdasarkan *melt curve*. Sampel daging diekstraksi sesuai prosedur standar dari *Dneasy Mericon Food Kit*. DNA hasil ekstraksi dapat langsung digunakan untuk amplifikasi PCR dan disimpan pada suhu -20 °C sampai -80 °C untuk penyimpanan lebih lama. Proses amplifikasi diawali dengan penambahan *master mix* PCR menggunakan *Rat Sybr Select real time* PCR Kit. Amplifikasi DNA dilakukan pada *thermal cycler Rotor-Gene Q*. Program amplifikasi pada metode uji *real-time* PCR yaitu denaturasi awal (HOLD) 95 °C selama 2 menit, denaturasi 95 °C selama 15 detik, *annealing/extension* 60 °C selama 60 detik,

dengan siklus sebanyak 30 kali, *melting point* pada suhu 60 ° - 95 °C selama 90 detik pada tahap pertama dan 5 detik pada tahap selanjutnya (*Applied Biosystem*). Seluruh sampel pengujian dilakukan *replicate/duplo*. Deteksi target menggunakan pewarna reporter FAM dengan *channel Green* (FAM) dan *melting* menggunakan *sybr green*.

Interpretasi hasil positif dinyatakan apabila sampel DNA menunjukkan adanya amplifikasi pada *detection system* dengan nilai *cycle threshold* (Ct) <35 dan memperhitungkan *melting curve*, hasil dinyatakan negatif apabila sampel DNA tidak menunjukkan adanya amplifikasi pada *detection system* dan nilai *melting curve* yang berbeda dengan kontrol positif dan setiap sampel.

Amplifikasi metode pengujian *real time* PCR dapat dimonitor menggunakan fluoresensi dan ampikon cukup dianalisis menggunakan *Melting Curve Analysis* (MCA) tanpa perlu dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa (Atlas dan Bey, 1994).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

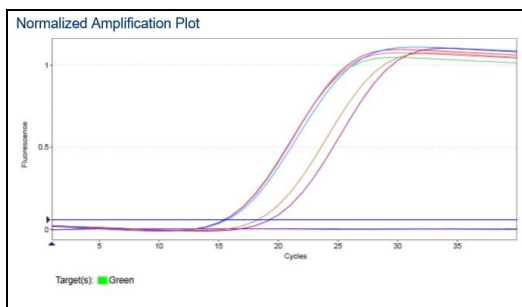
Hasil pengujian *real-time* PCR menunjukkan bahwa sampel daging tikus A dan tikus B dapat terdeteksi pada Ct value dan *melting point* (*peak*) yang memiliki rentang yang relatif sama dengan kontrol positif kit komersial (Tabel 1). *Amplification plot cycle threshold* (Ct) metode *real-time* PCR identifikasi spesies tikus dapat dilihat pada Gambar 2 dan *melt curve* pada Gambar 3.

**Tabel 1.** Nilai *cycle threshold* dan *melting point* uji *real-time* PCR identifikasi spesies tikus

Sampel	Ct Value	Mean	Melt Curve	Mean	Hasil
Daging tikus A	20.80	20.20	80.80	80.80	+
	19.60		80.80		+
Daging tikus B	16.60	16.65	80.80	80.80	+
	16.70		80.80		+
Kontrol positif kit komersial	16.80	16.80	80.50	80.80	+
	16.80		80.50		+
No template control	-	-	-	-	-
	-		-		-

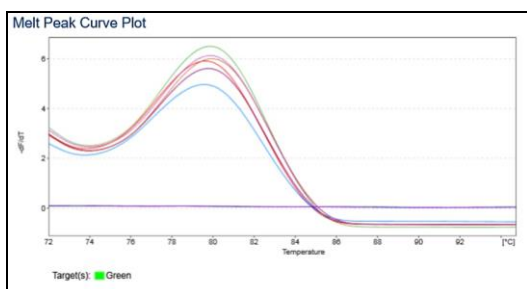
Hasil penelitian menunjukkan bahwa daging tikus A terdeteksi pada rerata Ct value 20.20 sedangkan daging tikus B terdeteksi pada rerata Ct value 16.65. Hal ini menunjukkan bahwa primer yang digunakan pada kit komersial *real time* PCR spesifik terhadap sampel daging tikus dan kontrol positif yang digunakan. Ct value adalah jumlah siklus yang harus dilalui untuk mendapatkan jumlah respon fluoresensi

(RFU) tertentu. Nilai Ct dapat ditentukan dengan bantuan garis ambang (*threshold*) pada tingkat respon fluoresensi tertentu. Selanjutnya dilihat bagian kurva yang dilewati garis ambang tersebut sedang berada di siklus ke berapa (Pestana *et al.* 2010). Metode *real time* PCR memiliki dua jenis pelacak berfluoresensi yang umum digunakan yaitu pelacak yang berinterkalasi dengan DNA (*DNA binding dyes*) dan pelacak yang berbasis probe atau label (Johansson, 2006) yang akan menghasilkan fluoresensi yang proporsional dengan jumlah DNA yang ada pada sampel (Dooley *et al.* 2004). Penambahan pelacak berfluoresensi (*fluoresence dye*) pada metode *real time* PCR akan menghasilkan data fluoresensi yang dapat diamati secara langsung pada saat proses amplifikasi sedang berjalan tanpa harus menunggu proses amplifikasi berakhir (*end point*).



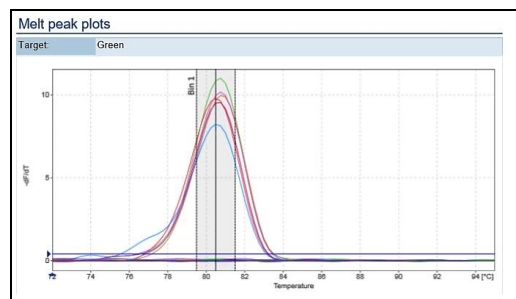
Gambar 1 Nilai cycle threshold (*fluorescence detection*) uji *real-time* PCR identifikasi spesies tikus

Penelitian ini menggunakan pelacak yang berikatan atau berinterkalasi dengan DNA (*DNA binding dyes*) yaitu dengan menggunakan SYBR® green I. Pelacak SYBR® green I merupakan pelacak yang berikatan dengan semua jenis DNA untai ganda yang tidak spesifik tetapi tidak berikatan dengan DNA untai tunggal. Pelacak SYBR® green I memberikan fluoresensi dengan intensitas yang cukup tinggi saat berinterkalasi dengan DNA untai ganda (Pestana *et al.* 2010).



Gambar 2. Melt Curve uji *real-time* PCR identifikasi spesies tikus

Hasil positif terhadap daging tikus sebagai target pada penelitian ini tidak hanya ditentukan dengan melihat Ct *value* saja tetapi juga harus melihat *peak melt curve* dengan analisis *melting curve* pada akhir pengujian *real-time* PCR untuk membedakan satu dsDNA dengan dsDNA yang lainnya (Pestana *et al.* 2010). MCA merupakan suatu analisis untuk memperkirakan karakteristik denaturasi DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal selama mengalami pemanasan suhu pada saat 50% dari DNA terdenaturasi dikenal sebagai titik leleh (*melting point*). Nilai suhu *melting point* ini sangat bergantung dari panjang sekuens DNA dan komposisi dari basa Guanin dan Cytosin pada DNA.



Gambar 3. Melt Peak Plots uji *real-time* PCR identifikasi spesies tikus

Pada penelitian ini terlihat bahwa *peak melt curve* terhadap daging tikus A (80.80) dengan tikus B (80.80) adalah sama. Jika dilihat dari *peak melt curve* antara daging tikus A dan tikus B dengan kontrol positif yang digunakan menunjukkan bahwa kit komersial yang digunakan dapat mengidentifikasi spesies tikus yang berasal dari hewan tikus yang berbeda (spesies tikus tidak diketahui). Pada dasarnya, spesifitas primer dapat ditingkatkan dengan optimasi suhu leleh (*melting temperature*) dari fragmen DNA. Optimasi dapat dilakukan dengan *Melting Curve Analysis* (MCA). Prinsip MCA adalah *melting temperature* suatu fragmen DNA dipengaruhi oleh panjang dan sekuens dari fragmen tersebut. Bila hanya ada 1 jenis fragmen DNA untai ganda, maka akan muncul 1 *melting curve* (Lyon, 2001). MCA dapat membedakan produk yang spesifik dengan produk nonspesifik jika hanya dihasilkan satu puncak suhu leleh pada hasil amplifikasi DNA, maka primer dapat dikatakan spesifik.

Tikus merupakan hewan yang sangat beragam jenisnya seperti tikus yang hidup di habitat rumah, pekarangan, gudang dan selokan/ got. Contoh spesies tikus yang sering ditemukan yaitu *Rattus rattus diardii*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* dan *Bandicota indica* yang disebut sebagai rodent

komensal (*commensal rodents*) yang artinya hewan yang sudah beradaptasi dengan baik pada aktivitas kehidupan manusia, serta menggantungkan hidupnya (Astuti 2013). Berdasarkan hal tersebut dapat dimungkinkan jika terdapat pencampuran produk olahan hewan oleh daging tikus komensal karena mudah diperoleh. Penelitian lanjutan terhadap metode *real time* PCR dengan *melt curve analysis* menggunakan berbagai macam spesies tikus yang beragam dan berbagai persentase konsentrasi kandungan daging tikus pada produk hewan sangat diperlukan untuk menganalisis dan mengidentifikasi spesies tikus yang memiliki risiko tinggi terhadap pencampuran maupun pemalsuan produk hewan yang beredar di masyarakat.

## KESIMPULAN

### Kesimpulan

Hasil penelitian mampu mendeteksi spesies mendeteksi dan mengidentifikasi spesies tikus yang berasal dari hewan tikus yang berbeda dengan *melting point* yang sama. Metode *real time* PCR berdasarkan *melt curve analysis* dapat dijadikan sebagai metode pengujian untuk mengidentifikasi spesies yang tidak dikehendaki pada pangan asal hewan yang beredar di masyarakat, khususnya terhadap penambahan daging tikus pada pangan asal hewan.

Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan terhadap metode *real time* PCR dengan *melt curve analysis* menggunakan berbagai macam spesies tikus yang beragam dan berbagai persentase konsentrasi kandungan daging tikus pada produk hewan yang memiliki risiko tinggi terhadap pencampuran maupun pemalsuan produk hewan yang beredar di masyarakat.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Atlas, R.M., Bej, A.K., 1994, *Polymerase Chain Reaction Methods for general and Molecular bacteriology*, dalam Gerhardt, P., Murrey, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R., (Eds.), *American Society for Microbiology*, 10:418-435
2. Asensio L, Gonzalez I, Garcia T, Martin R. 2008. Review determination of food authenticity b-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control* 19:1-8.
3. Astuti DR, 2013, Keefektifan Rodentisida Racun Kronis Generasi II terhadap Keberhasilan Penangkapan Tikus , *J.Kemas* 2:183-189.
4. Ballin NZ, Vogensen FK, Karlsson AH. 2009. Species determination – Can we detect and quantify meat adulteration?. *Meat Sci* 83:165-174.
5. Bottero MT, Dalmaso A. 2011. Review animal species identification in food products: evolution of biomolecular methods. *Vet. Journal* 190:34-38.
6. Dooley, J. J., Paine, K. E., Garrett, S. D., & Brown, H. M. (2004). *Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. Meat Science*, 68: 431-438.
7. Kim M, Yoo I, Lee SY, Hong Y, Kim HY. 2016. Quantitative detection of pork in commercial meat products by TaqMan real-time PCR assay targeting the mitochondrial D-loop region. *Food Chem* 210:102-106.
8. Kuswandi B, Gani AA, Ahmad M. 2017. Immuno strip test for detection of pork adulteration in cooked meatballs. *Food Biosci* 19:1-6.
9. Johansson, Mary, Katherine, 2006, Choosing Reporter-Quencher Pairs for efficient Quenching Through Formation of Intramolecular Dimers, *Methods in Molecular Biology*, 335, Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes: Designs and Protocols, Humana Press Inc, NJ.
10. Perestam AT, Fujisaki KK, Nava O, Hellberg RS. 2017. Comparison of real-time PCR and ELISA-based methods for the detection of beef and pork in processed meat products. *Food Control* 71:346-352.
11. Pestana EA, Belak S, Diallo A, Crowther JR, Viljoen GJ. 2010. *Early Rapid and Sensitive Veterinary Molecular Diagnostics Real-time PCR Application*. Dordrecht (DE): Springer Science & Business Media.





## PERTANIAN

ISBN 977-250-204-601-5



9 772502 046015