

JURNAL

KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER

Volume 10, 2023



JURNAL

KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER
VOLUME 10, 2023

ISSN:2502-0463

JURNAL

KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER
VOLUME 10, 2023

Penanggung jawab : drh. Imron Suandy, MVPH

Redaktur : drh. Rr. Anik Winaningrum
drh. Diyan Cahyaningsari, M.Si
drh. Wiwit Subiyanti

Editor : Dr. drh. Puji Rahayu
drh. Ika Kartika Syarifah, M.Si
drh. Hanif Anisatun
drh. Thufeil Yunindika, M.Si
drh. Madhumita Sirindon
drh. Alriando Hidayat
Metrizal, S.Pt

**Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan
2023**

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadapan Tuhan Yang Maha Esa karena atas berkat rahmat-Nya Jurnal Ilmiah Kesehatan Masyarakat Veteriner Volume 10 tahun 2023 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

	HALAMAN
KATA PENGANTAR.....	i
DAFTAR ISI.....	ii
1. Kelayakan Ekspor dan Perdagangan Domestik Sarang Burung Walet yang Diuji di Laboratorium Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan Tahun 2021-2022 Berdasarkan Parameter Uji Kadar Nitrit N.R. Elok Kania Suryaningsih, Fitri Amalia, Woro Dyah Pinilih.....	1
2. Verifikasi Metode Pengujian Residu Quinolon pada Sampel Daging Ayam dan Telur Menggunakan <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) Attya Asuh Insani, Riska Desitania, Oli Susanti, Sani Susanty, Diyan Cahyaningsari.....	6
3. Deteksi <i>Listeria monocytogenes</i> pada Sosis Ayam dengan Metode Kromogenik Agar Kanti Puji Rahayu, Zeze Zakiah.....	10
4. Validasi Metode Pengujian Residu Sulfonamida Kualitatif Menggunakan <i>Microbial Screening Methods</i> Attya Asuh Insani, Sani Susanty, Oli Susanti, Ari Retnowati.....	16
5. Validasi Metode Identifikasi DNA Anjing (<i>Canis Familiaris</i>) Menggunakan Metode Real Time <i>Polymerase Chain Reaction</i> (qPCR) Muamar Aziz Akbar, Puji Rahayu.....	22
6. Titik Kritis Pengujian <i>Total plate Count</i> pada Sampel Pangan Asal Hewan di BPMSPH Bogor Mohammad Gaody, kanti Puji Rahayu, Ika Kartika Syarifah.....	29
7. Prevalensi dan Validasi <i>Staphylococcus Aureus</i> pada Isolat <i>Staphylococci</i> Koagulasi Positif dari Sampel Susu Segar di Tiga Provinsi di Indonesia Ika Kartika Syarifah, Kanti Puji Rahayu, Agnes Swasti Anindya, Monika Danaparamitha A.....	36
8. Validasi Metode Pengujian Hydroxymetilfurfural menggunakan Instrumen <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC) pada Sampel Madu Puji Rahayu, Hanif Anisatun, Innes Maulidya, Elok Kania Suryaningsih, Dini Tri Mardiani.....	42

Kelayakan Ekspor dan Perdagangan Domestik Sarang Burung Walet yang Diuji di Laboratorium Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan Tahun 2021-2022 Berdasarkan Parameter Uji Kadar Nitrit

N.R. Elok Kania Suryaningsih¹, Fitri Amalia², Woro Dyah Pinilih³

Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan Kementerian Pertanian Republik Indonesia¹
e-mail: elokkania@pertanian.go.id

ABSTRAK

Sarang burung walet merupakan salah satu pangan yang banyak dikonsumsi bahkan digemari oleh masyarakat Indonesia dan menjadi komoditi ekspor yang sedang marak berkembang. Salah satu parameter kelayakan ekspor dan perdagangan domestik sarang burung walet adalah batas konsentrasi kadar nitrit pada sarang burung walet tersebut. Pada rentang waktu tahun 2021 dan 2022, sarang burung walet yang diuji di BPMSPH mengalami peningkatan jumlah layak ekspor dan perdagangan domestik. Hal ini terjadi berdasarkan hasil uji kadar nitrit yang sesuai dengan Keputusan Kepala Badan Karantina Pertanian Nomor: 416/Kpts/OT.160/L/4/2014 tentang Pedoman Pemeriksaan Kandungan Nitrit Sarang Walet. Menurut keputusan tersebut, kadar nitrit yang diperbolehkan untuk diekspor ke negara Republik Rakyat Tiongkok (China) adalah 30 ppm (mg/kg). Standar Nasional Indonesia (SNI) 8998 : 2021 tentang Sarang Burung Walet Bersih (*Edible Bird Nest*) mempersyaratkan sarang burung walet yang dapat diperdagangkan memiliki batas maksimal kadar nitrit 80 ppm (mg/kg). Sarang burung walet layak ekspor yang diuji di laboratorium BPMSPH di tahun 2021 adalah 86,67% dari contoh uji sarang burung walet dan rata-rata konsentrasi kadar nitritnya 18,46 mg/kg, sedangkan di tahun 2022 mengalami kenaikan persentase menjadi 91,67% dari contoh uji sarang burung walet dengan rata-rata konsentrasi kadar nitrit 8,83 mg/kg. Sedangkan semua sarang burung walet yang diuji di BPMSPH layak untuk diperdagangkan di Indonesia.

Kata Kunci :

Nitrit; Sarang Burung Walet; Spektrofotometer UV-Vis

PENDAHULUAN

Nitrit sebagai pengawet makanan biasa digunakan dalam bentuk garamnya yaitu natrium nitrit (NaNO_2). *Food Chemical Codex* (1981) menyatakan, natrium nitrit dengan rumus molekul NaNO_2 merupakan bahan berwarna putih sampai kekuningan, berbentuk tepung, butiran maupun stik. Nitrit berasa hambar atau rasa garam dan larutannya alkali pada kertas lakmus.

Penggunaan nitrit pada bahan makanan dibatasi karena sifat nitrit yang akan bereaksi dengan amina tersier dan sekunder membentuk senyawa N-nitrosamin yang bersifat teratogenik, mutagenik bahkan karsinogenik (Gomez *et al.*, 2015). Selain itu konsentrasi yang berlebih sangat berbahaya terutama bagi ibu hamil dan bayi. Tingginya konsentrasi nitrit dalam darah dapat menyebabkan defisiensi oksigen dimana nitrit bereaksi dengan hemoglobin membentuk methemoglobin dengan cara mengoksidasi Fe(II) dalam darah menjadi Fe(III). Kondisi ini disebut methemoglobinemia, dimana methemoglobin diketahui tidak memiliki kemampuan untuk mengangkut oksigen sehingga terjadi defisiensi oksigen yang menyebabkan kulit bayi menjadi biru atau yang dikenal sebagai sindrom *blue-baby* (Hasna dan Suryani, 2012).

Pembatasan kandungan nitrit sebagai bahan tambahan pangan juga berlaku bagi kandungan nitrit yang secara alami berada dalam pangan misalnya pada sarang burung walet. Nitrit pada sarang burung walet terbentuk dari hasil proses alamiah yaitu perubahan nitrogen yang ada di lingkungan Rumah Burung Walet (RBW), misalnya sampah organik yang membusuk dilantai, burung menjatuhkan kotoran di sarangnya yang terkontaminasi bakteri tertentu sehingga mengubah nitrogen menjadi nitrit pada lingkungan. Proses perubahan dari nitrogen menjadi nitrit disebabkan oleh bakteri nitrifikasi (*nitrifying bacteria*) yang terdapat pada lingkungan RBW (Widiyani *et al.*, 2022).

Sarang burung walet merupakan salah satu pangan yang banyak dikonsumsi bahkan digemari dan menjadi komoditi ekspor yang sedang marak berkembang. Di dalam sarang burung walet terdapat 50-60% protein, 25% karbohidrat, 10% air, asam amino esensial (asam aspartat, asam glutamat, dan prolin), asam amino non-esensial (treonin dan valin) serta mineral-mineral lainnya seperti kalsium, fosfor, kalium dan sulfur. Kandungan protein asam amino pada sarang burung walet cukup tinggi serta memiliki senyawa aktif *9-octadecenoic acid* (ODA) dan *hexadecenoic acid* (HAD). Hasil analisis ini menunjukkan bahwa sarang burung walet mengandung zat-zat makanan berkualitas tinggi. Selain memiliki kandungan protein tinggi sarang walet memiliki kandungan lemak rendah, mineral dan asam lemak omega-6 tinggi sehingga bermanfaat untuk kebugaran tubuh (Marccone, 2005; Huda *et al.*, 2008 dalam Setyawati dan Kurnia, 2020).

Sarang burung walet mampu menjadi komoditi ekspor ke negara Republik Rakyat Tiongkok (China) karena manfaatnya yang banyak, dengan pembatasan kadar nitrit yang diatur dalam

Keputusan Kepala Badan Karantina Pertanian Nomor: 416/Kpts/OT.160/L/4/2014 tentang Pedoman Pemeriksaan Kandungan Nitrit Sarang Walet untuk pengeluaran ke negara Republik Rakyat Tiongkok adalah tidak lebih dari 30 ppm (mg/kg). Sementara itu SNI 8998 : 2021 tentang Sarang Burung Walet Bersih (*Edible Bird Nest*) menetapkan kadar nitrit yang dipersyaratkan dalam perdagangan domestik adalah 80 ppm (mg/kg). Persyaratan pada sarang burung walet baik yang akan diekspor maupun diperdagangkan di dalam negeri (domestik) memerlukan hasil uji kuantitatif yang diminta dalam rangka pengawasan maupun pemantauan keberadaan nitrit yang secara alamiah ada dalam sarang walet tersebut. Pengujian kadar nitrit tersebut dapat mendukung gerakan tiga kali ekspor (Gratieks) sarang burung walet sebagai bagian dari peningkatan ekspor pertanian yang digagas oleh presiden Republik Indonesia.

Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan (BPMSPH) merupakan laboratorium rujukan pemerintah untuk pengujian sarang burung walet yang akan diekspor maupun untuk perdagangan domestik. Sarang burung walet yang diuji di BPMSPH sekitar 90% merupakan komoditi yang akan diekspor ke luar negeri dan sisanya sekitar 10% merupakan sarang burung walet yang diperdagangkan dan dikonsumsi di dalam negeri.

MATERI DAN METODE

Tempat dan Waktu

Pengujian kadar nitrit pada sarang burung walet dilakukan di Laboratorium Kimia BPMSPH dari bulan Januari 2021 hingga bulan Desember 2022.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan meliputi contoh uji sarang burung walet yang diujikan di Laboratorium BPMSPH dan bahan-bahan kimia untuk pengujian yaitu natrium nitrit, *N*-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NED), Sulfanilamida, asam asetat dan aquades. Alat yang digunakan untuk pengujian meliputi Spektrofotometer UV-Vis, penangas air, neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg, labu ukur 50 mL, corong kaca, gelas piala, gelas ukur, pipet volumetrik dan mikropipet.

Metode

Prinsip dari pengujian kadar nitrit adalah pengukuran senyawa azo yang terbentuk dari reaksi sulfanilamida dan NED dalam suasana asam pH 2,0 menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm. Semua metode tersebut mengacu pada modifikasi Standar Nasional Indonesia, SNI 01-2891-1992, butir 2.4.3 *Nitrit in Cured Meat*.

Komponen Pengamatan

Hal yang diamati pada pengujian ini adalah hasil integrasi serapan contoh dengan menggunakan deret standar berbagai konsentrasi sehingga didapatkan konsentrasi dari contoh yang diuji. Konsentrasi yang didapat dari alat kemudian dihitung dengan memperhitungkan volume akhir contoh dan bobot contoh serta faktor pengenceran.

$$\text{Konsentrasi contoh} = \frac{\frac{50}{A} \text{ mL} \times 50 \text{ mL} \times \text{Kons. pada alat}}{\text{Bobot Contoh}}$$

Pelaksanaan Pengujian

Pengujian dilakukan dengan menimbang contoh uji sebanyak $\pm 0,5$ gram. Contoh uji kemudian ditambahkan air bebas nitrit dan 3 mL NaCl jenuh ke dalam labu ukur 50 mL dan *shaker* dalam *waterbath shaker* selama 30 menit. Contoh uji kemudian didinginkan dalam suhu kamar dan disaring menggunakan kertas filter (Whatman No. 42).

Larutan contoh uji kemudian dipipet sebanyak 20 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan ditambahkan 2,5 mL pereaksi sulfonamida. Setelah 5 menit tambahkan 2,5 mL pereaksi NED, encerkan sampai tanda garis dengan air suling, homogenkan lalu kocok dan biarkan selama 15 menit sampai timbul warna. Larutan contoh uji kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Contoh sarang burung walet yang diuji di BPMSPH menunjukkan konsentrasi kadar nitrit yang bervariasi. Variasi data rentang konsentrasi dan rata-rata kadar nitrit di tahun 2021 dan 2022 dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rentang konsentrasi dan rata-rata kadar nitrit tahun 2021 dan 2022

Parameter	Rentang konsentrasi (mg/kg)	Rata-rata \pm SD (mg/kg)
Kadar Nitrit 2021 (mg/kg)	6,76 – 49,26	21,44 \pm 10,99
Kadar Nitrit 2022 (mg/kg)	0,22 – 45,90	11,10 \pm 10,02

Variasi konsentrasi kadar nitrit pada sarang burung walet di tahun 2021 berkisar antara 21,44 – 49,26 mg/kg sedangkan konsentrasi kadar nitrit pada sarang burung walet di tahun 2022 berkisar antara 0,22 – 45,9 mg/kg. Rentang hasil uji kadar nitrit yang cukup besar menyebabkan standar deviasi yang cukup besar juga. Kebersihan sarang burung walet dari kotoran burung dan bulu juga sangat berpengaruh pada hasil kadar nitrit yang akan diperoleh pada pengujian, karena keberadaan nitrit pada sarang burung walet salah satunya disebabkan oleh bakteri nitrifikasi (*nitrifying bacteria*) yang terdapat pada lingkungan Rumah Burung Walet (Widiyani et al, 2022). Proses panen, tingkat kebersihan, kelembapan dan tekstur sarang burung walet yang berbeda-beda adalah beberapa penyebab dari besarnya rentang hasil uji kadar nitrit pada sarang burung walet.

Contoh uji sarang burung walet yang datang untuk diuji kadar nitrit pada tahun 2021 berjumlah 15 contoh uji sedangkan di tahun 2022 mengalami peningkatan menjadi 36 contoh uji. Jumlah contoh uji layak ekspor dan konsentrasi kadar nitrit yang diperoleh bila dibandingkan dengan batas maksimum kadar nitrit untuk ekspor ke Republik Rakyat Tiongkok (China) yaitu 30 mg/kg dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Jumlah contoh sarang burung walet yang sesuai ketentuan ekspor dan tidak sesuai ketentuan ekspor

Parameter	Jumlah Contoh		Rata-rata konsentrasi kadar nitrit (mg/kg)		Persentase jumlah contoh (%)	
	2021	2022	2021	2022	2021	2022
Kadar Nitrit < 30 mg/kg	13	33	18,46	8,83	86,67	91,67
Kadar Nitrit > 30 mg/kg	2	3	40,81	36,01	13,33	8,33

Terdapat 13 contoh sarang burung walet sesuai ketentuan ekspor di tahun 2021 dan 2 contoh yang tidak sesuai ketentuan ekspor, di tahun 2022 ada peningkatan jumlah contoh yang diuji di BPMSPH dan sebanyak 33 contoh sesuai dengan ketentuan ekspor dan 3 contoh tidak sesuai dengan ketentuan ekspor seperti yang terlihat pada Tabel 2. Bila dibuat persentase kelayakan sarang burung walet untuk diekspor maka didapatkan 86,67% sarang burung walet layak ekspor di tahun 2021 dan mengalami kenaikan di tahun 2022 yaitu sekitar 91,67%. Persentase sarang burung walet tidak layak ekspor di tahun 2021 ada pada angka 13,33% dan mengalami penurunan menjadi 8,33% di tahun 2022.

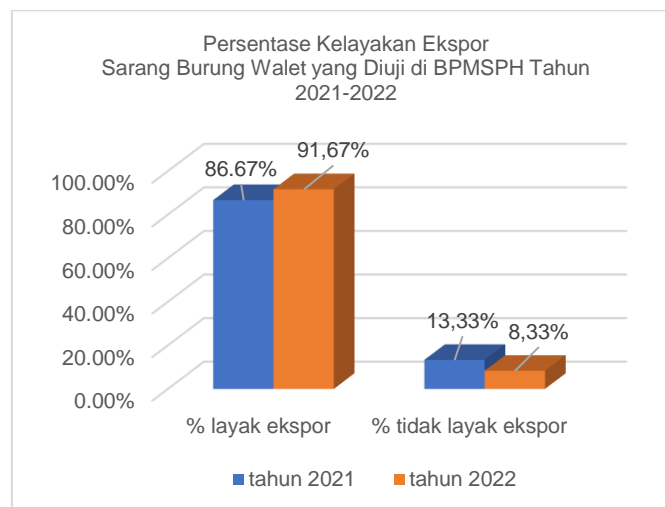
Perbandingan jumlah contoh sarang burung walet layak ekspor pada tahun 2021 dan tahun 2022 dapat dilihat pada grafik di Bagan 1.



Bagan 1. Perbandingan jumlah contoh sarang burung walet layak ekspor yang diuji di BPMSPP tahun 2021 dan 2022

Perbandingan jumlah contoh sarang burung walet yang sesuai dengan ketentuan ekspor di tahun 2022 mengalami peningkatan dibandingkan pada tahun 2021. Begitu pula dengan persentase sarang burung walet yang tidak sesuai ketentuan ekspor mengalami penurunan di tahun 2022. Hal ini dapat dilihat pada grafik perbandingan persentase sarang burung walet yang layak ekspor dan tidak layak ekspor pada Bagan 2.

Hasil pengamatan dari perbandingan kadar nitrit pada tahun 2021 dan 2022 menunjukkan bahwa persentase peningkatan sarang burung walet layak ekspor dan penurunan sarang burung walet tidak layak ekspor adalah 5%.



Bagan 2. Perbandingan persentase kelayakan ekspor sarang burung walet yang diuji di BPMSPP tahun 2021 dan 2022

KESIMPULAN

Hasil pengujian kadar nitrit pada contoh sarang burung walet yang diuji di BPMSPP menunjukkan bahwa kadar nitrit pada tahun 2021 berkisar pada rentang konsentrasi 21,44 – 49,26 mg/kg sedangkan kadar nitrit pada sarang burung walet di tahun 2022 berkisar pada rentang konsentrasi 0,22 – 45,9 mg/kg. Hasil pengujian ini memberikan kesimpulan bahwa contoh sarang burung walet yang diuji di BPMSPP semuanya layak untuk perdagangan domestik karena berada di bawah batas maksimum kadar nitrit 80 mg/kg sesuai SNI 8998 : 2021. Jumlah sarang burung walet layak ekspor yang diuji di BPMSPP di tahun 2021 adalah 86,67% dari contoh uji dan menunjukkan rata-rata konsentrasi kadar nitrit sekitar 18,46 mg/kg. Di tahun 2022 mengalami peningkatan menjadi 91,67% yang layak ekspor dengan rata-rata kadar nitrit 8,83 mg/kg. Dari perbandingan tersebut dapat disimpulkan bahwa terjadi peningkatan jumlah contoh sarang burung walet yang layak ekspor di tahun 2022 yaitu sebesar 5%. Jumlah contoh sarang burung walet yang tidak layak ekspor juga mengalami penurunan sekitar 5% yaitu 13,33% di tahun 2021 dengan rata-rata konsentrasi kadar nitrit 40,81 mg/kg dan 8,33% di tahun 2022 dengan rata-rata konsentrasi kadar nitrit 36,01 mg/kg.

DAFTAR PUSTAKA

- Gómez, J., N. Sanjuán, J. Bon, J. Arnau and G. Clemente. 2015. Effect of Temperature on Nitrite and Water Diffusion in Pork Meat, *J. Food Eng.*, 149, 188-194.
- Hasna dan Suryani. 2012. Analisis Kandungan Nitrit dalam Sosis pada Distributor Sosis di Kota Yogyakarta Tahun 2011. *Kes Mas*, Vol. 6 No.1 Januari 2012, 1-12.
- Ningrum et al, 2022. Evaluation of Nitrite Concentration in Edible Bird's Nest (White, Yellow, Orange, and Red Blood). *Makara Journal of Science*: Vol. 26: Iss. 1, Article 7. <https://scholarhub.ui.ac.id/cgi/viewcontent.cgi?article=1311&context=science>. 30 Maret 2022
- Sinaga, M., Naibaho, R.T., dan Situmorang, M. 2013. Rancang Bangun Sensor Kimia Dalam Deteksi Spektrofotometri Untuk Penentuan Pengawet Nitrit. *Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung*.
- Setyawati, W., Kurnia, D., 2020. Pengujian Kadar Nitrit untuk Mendukung Gerakan Tiga Kali Ekspor (Gratieks) Sarang Burung Walet. Prosiding Penyidikan Penyakit Hewan Rapat Teknis dan Pertemuan Ilmiah dan Surveilans Kesehatan Hewan Tahun 2020.
- Widiyani , P., Latif, H., Lukman, D.W., Sudarwanto, M.B., 2021. Artikel Review : Bakteri Nitrase dan Peranannya dalam Keberadaan Nitrit pada Sarang Burung Walet. *Jurnal Kajian Veteriner* Vol. 9 No. 2:98-109.
- Widiyani et al, 2002. Kadar Nitrit pada Sarang Burung Walet dan Analisis Metagenomik Bakteri pada Kotoran Rumah Burung Walet Asal Pulau Sumatera. <https://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/>

Verifikasi Metode Pengujian Residu Quinolon pada Sampel Daging Ayam dan Telur Menggunakan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Attya Asuh Insani¹, Riska Desitania¹, Oli Susanti¹, Sani Susanty¹, Diyan Cahyaningsari¹

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

e-mail korespondensi: att_insani@yahoo.com

ABSTRAK

Residu Quinolon, khususnya pada unggas, masih terus menjadi fokus pengujian. Karena menimbulkan efek buruk pada manusia, termasuk reaksi alergi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memverifikasi penggunaan *ELISA* /*screen* untuk mendeteksi adanya residu antibiotik golongan Quinolon pada produk hewan (daging dan telur). Berdasarkan hasil verifikasi uji Residu Antibiotika Golongan Quinolon dengan *ELISA* repeatability pada sampel daging ayam dan telur menghasilkan RSD(%) 9.673 dan 6.630; kurang dari nilai $2/3 CV_{Horwitz}$ 33.83 dan 30.85 menunjukkan metode memenuhi syarat keberterimaan. Sedangkan *inhouse reproducibility* kedua analisis sangat baik ditunjukkan dengan RSD(%) pada daging ayam masing-masing 9.673 dan 6.630; keduanya lebih kecil dari $CV_{Horwitz}$ 33.83 dan 34.63. Sedangkan pada sampel telur, kedua analisis menghasilkan RSD(%) masing-masing 6.630 dan 5.602, lebih kecil dari $2/3 CV_{Horwitz}$ 30.85 dan 30.79. Metode pengujian residu quinolon pada sampel daging ayam dan telur menggunakan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dapat diverifikasi dan digunakan untuk analisis sampel rutin.

Kata kunci: ELISA; Quinolon; Residu; Verifikasi

PENDAHULUAN

Antibiotik digunakan dalam industri unggas untuk meningkatkan pertumbuhan dan terapi penyakit. Selain itu, banyak digunakan untuk pencegahan penyakit pada hewan ternak. Penggunaan obat-obatan hewan telah memainkan peran penting dalam bidang peternakan dan agroindustri untuk mencegah dan mengobati penyakit serta sebagai agen pemacu pertumbuhan, namun memiliki potensi menghasilkan residu pada produk turunan hewan (daging, susu, telur dan madu) dan menimbulkan bahaya kesehatan bagi konsumen. Kontaminasi pangan dalam kadar rendah belum tentu menimbulkan masalah kesehatan masyarakat yang serius. Namun penggunaan yang berlebihan dan tidak memperhatikan waktu penghentian obat dapat meningkatkan risiko terjadinya resistensi mikroba terhadap obat, reaksi hipersensitivitas dan terganggunya flora normal usus (Beyene *et al.* 2016; Cotter *et al.* 2012).

Quinolon adalah agen antimikroba sintetik spektrum luas yang digunakan dalam pengobatan infeksi bakteri pada ternak dan *aquaculture*. Quinolon bekerja melalui penghambatan aktivitas enzim DNA-girase dan topoisomerase IV pada bakteri. Quinolon dapat dikelompokkan menjadi Quinolon asam dan Quinolon amfoter. Quinolon asam diwakili oleh asam karboksilat quinolon, seperti flumequine, asam oksolinat, asam nalidiksat, sinoksasin, asam piromidat dan asam pipemidat. Quinolon amfoter (fluoroquinolon) mengandung fluor pada posisi C-6 dan piperazinil pada posisi C-7, seperti marbofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin, lomefloxacin, dan ofloxacin, enrofloxacin, sarafloxacin, difloxacin, ofloxacin, enoxacin dan orbifloxacin (Chang *et al.* 2010).

Adanya residu fluoroquinolon (enrofloxacin dan ciprofloxacin) pada beberapa sampel daging ayam asal Kabupaten Malang dan Blitar Timur Provinsi Jawa, mengindikasikan enrofloxacin dan/atau ciprofloxacin masih digunakan oleh peternak, yaitu sebelum diberlakukannya larangan penggunaan antibiotik di Indonesia (Widiastuti *et al.* 2021).

Uji *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) tergolong immunoassay, yaitu uji kimia yang bergantung pada reaksi antigen dan antibodi, yang memiliki keluaran kolorimetri namun ada juga yang memiliki keluaran fluoresen atau chemiluminescent, bergantung pada molekul reporter yang digunakan. Metode ini memberikan deteksi antibiotik yang sangat sensitif dan spesifik dalam sampel cair atau padat yang diproses, dengan mengandalkan spesifitas interaksi antara antibodi dan molekul yang diinginkan (Parthasarathy *et al.* 2018). ELISA untuk analisis residu fluorokuinolon dalam daging dan telur telah dikembangkan dan divalidasi berdasarkan kriteria Keputusan Komisi 2002/657/EC.

Verifikasi metode adalah proses untuk membuktikan bahwa suatu metode yang telah tervalidasi yang digunakan oleh laboratorium, sesuai dengan spesifikasi metode yang ditentukan dalam studi validasi dan sesuai dengan tujuan yang dimaksudkan (ISO, 2021). Verifikasi dilakukan dengan penentuan presisi dan perhitungan Rasio Horwitz. Rasio Horwitz adalah parameter kinerja sederhana yang mencerminkan penerimaan metode analisis kimia sehubungan dengan presisi. (Horwitz 2006).

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah : ELISA Reader Model OPSYS MR Merk Dynex Seri 1 MRA-2438 Dynex Technologies Inc. USA, timbangan analitik, sentrifuse, vortex, mikropipet multichannel, mikropipet single channel. Bahan-bahan yang digunakan antara lain : l'screen QUINO tecna Eurofins Italy, methanol, DW.

Persiapan contoh

Pengujian tersebut diuji sesuai dengan pedoman pabrikan. Batas deteksi kit dilaporkan 0.6 µg/kg, sebagai nilai terendah untuk daging ayam dan telur dalam kit uji. Persiapan sampel dilakukan berdasarkan instruksi l'screen Kit. Contoh (daging, telur) di homogenisasi, lalu ditimbang sebanyak 1 gram, ditambahkan 2 mL 55 % methanol/air, vortex 30 menit, Shake 10 menit, kemudian disentrifus 4000 rpm selama 10 menit. Diambil supernatannya sebagai sampel negatif. Encerkan supernatant 1:5 dalam extraction buffer 1x (Misal : 100uL sampel+ 100 uL extraction buffer 5x + 300 uL Distillate Water).

Pelaksanaan Pengujian

Masukkan masing-masing sebanyak 50 µL larutan standar/ sampel dalam well, kemudian tambahkan 50 µL antibody (larutan biru) pada setiap well, shake pelan selama beberapa detik, lalu inkubasi 30 menit pada suhu ruang. Lakukan *washing I*, buang cairan pada well, tambahkan washing buffer dengan squeeze bottle, lakukan total 4x. Ketuk dengan keras mikroplate pada tisu absorben untuk mengeringkan. Kemudian masukan masing-masing sebanyak 100 µL enzym conjugate, mix secara manual dengan hati-hati, inkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Lalu lakukan *washing II* seperti *washing I*. Selanjutnya masukkan masing-masing sebanyak 100 µL larutan *developing solution*, mix secara manual dengan hati-hati, inkubasi dalam suhu ruang selama 15 menit, hindarkan dari cahaya. Terakhir tambahkan 50 µL *stop solution* (tutup putih) pada masing-masing *well*, mix dengan hati-hati, ukur absorbansinya pada 450 nm (baca hasil pengujian dalam 60 menit setelah penambahan *stop solution*).

Penentuan Hasil

Perhitungan hasil uji dengan rumus persamaan (1) dibawah.

$$\frac{\text{absorbance standard (or sampel)}}{\text{absorbance zero standard}} \times 100 = \% \text{ absorbance} \dots \dots \dots (1)$$

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

Untuk mendapatkan nilai aktual konsentrasi Quinolon dalam µg/kg (ppb) yang terkandung dalam sampel, nilai konsentrasi dibaca dari kurva kalibrasi yang kemudian dikalikan dengan faktor pengenceran. Berdasarkan regulasi yang berlaku, maka faktor koreksi pengenceran daging dan telur adalah x 15.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian verifikasi dilakukan di Laboratorium Residu Obat dan AMR, dilakukan pada parameter presisi (*repeatability* dan *inhouse reproducibility*) pada sampel daging ayam dan telur. Evaluasi uji presisi dilakukan dengan menghitung RSD dan nilai CV Horwitz (Riyanto, 2014). Cara penetapan presisi, yakni dari sampel spike yang dilakukan sebanyak 10 kali. Setelah sampel diukur dan dihitung kadar analitnya selanjutnya ditentukan repeatabilitasnya dengan mencari % RSD. Besaran nilai presisi dihitung dengan mencari % RSD, dengan rumus pada Persamaan (2).

$$\text{RSD (\%)} = \frac{SD}{x} \cdot 100 \dots \dots \dots (2)$$

x = nilai rata-rata.

Keberterimaan presisi hasil hitung RSD dibandingkan dengan CV_{Horwitz}; % RSD < 2/3 CV_{Horwitz} atau 0,66 x CV_{Horwitz}. Rumus CV_{Horwitz} (%) = $2^{1-0,5 \log C}$. Log C adalah logaritma konsentrasi analit (dalam bentuk fraksi). Keberterimaan parameter presisi mengacu ke AOAC (2016) Appendix F: SMPR.

Repeatability dilakukan pada pengujian mandiri dengan metode yang sama pada sampel uji yang identik dalam laboratorium yang sama oleh analis yang sama dengan menggunakan peralatan yang sama dalam selang waktu yang singkat.

Pengujian dilakukan sesuai MU 7.2.2.10 Metode Uji Residu Quinolon dengan ELISA. *Repeatability* dilakukan pada sampel daging ayam dan sampel telur. Preparasi sampel daging ayam dibuat pada konsentrasi 0.4 µg/mL, sedangkan pada sampel telur dibuat pada konsentrasi 0.8 µg/mL.

LOD uji ELISA pada daging ayam dan telur 0,6 µg/mL. Pengujian dilakukan sebanyak 10 kali ulangan untuk setiap sampel. Hasil uji terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Residu Quinolon dengan ELISA pada sampel Daging Ayam dan Telur

Larutan	Sampel Daging Ayam		Sampel Telur	
	Absorbansi (A)	Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi (A)	Konsentrasi (µg/mL)
1	1.369E	0.452	1.832E	0.730
2	1.381E	0.425	1.788E	0.826
3	1.409E	0.363	1.774E	0.851
4	1.369E	0.452	1.808E	0.780
5	1.365E	0.461	1.820E	0.755
6	1.368E	0.454	1.786E	0.828
7	1.369E	0.452	1.749E	0.902
8	1.368E	0.454	1.830E	0.745
9	1.408E	0.365	1.788E	0.826
10	1.349E	0.496	1.786E	0.828
Rata-rata (x)		0.437	Rata-rata (x)	0.807
SD		0.042	SD	0.054
RSD(%)		9.673	RSD(%)	6.630

Repeatabilitas metode pada sampel daging ayam menghasilkan RSD(%) 9.673 lebih kecil dari 2/3 CV Horwitz 33.83. Sedangkan pada sampel telur menghasilkan RSD(%) 6.630 lebih kecil dari 2/3 CV Horwitz 30.85, sehingga metode ini memenuhi syarat.

Istilah "*repeatability*" diterapkan pada parameter yang dihitung dari ulangan simultan dan istilah ini mewakili variabilitas minimum yang disamakan dengan parameter "*within laboratory*" (deviasi standar, varians, koefisien variasi, deviasi standar relatif) dari persamaan model presisi. Hal ini harus dibedakan dari variabilitas dalam laboratorium yang lebih besar yang disebabkan oleh replikasi non-simultan yang dilakukan di laboratorium yang sama pada sampel uji yang identik pada hari yang berbeda, oleh analisis yang berbeda, dengan instrumen dan kurva kalibrasi yang berbeda, dan dengan sumber reagen, pelarut, dan kolom yang berbeda. Ketika presisi "*intermediate*" within laboratorium (deviasi standar, varians, koefisien variasi, deviasi standar relatif) digunakan, pernyataan tentang kondisi yang tidak konstan harus menyertainya. Kondisi di dalam laboratorium ini juga sering disebut reproduktibilitas *within* laboratorium, sebuah istilah yang keliru.

Presisi yang ditentukan dari penentuan ulangan yang dilakukan dalam satu laboratorium secara tidak bersamaan, yaitu pada hari yang berbeda, dengan kurva kalibrasi yang berbeda, dengan instrumen yang berbeda, oleh analisis yang berbeda, dan sebagainya disebut presisi *intermediate*. Letaknya antara ketelitian dalam dan antar laboratorium, bergantung pada kondisi yang bervariasi. Jika analisis akan dilakukan oleh analisis yang berbeda, pada hari yang berbeda, pada instrumen yang berbeda, lakukan setidaknya 5 set analisis ulangan pada bahan uji yang sama dalam kondisi berbeda untuk setiap tingkat konsentrasi yang berbeda kira-kira dalam urutan besarnya (AOAC, 2002). Kondisi ini juga disebut *in-house reproducibility* dalam SNI ISO 16140-4:2020.

Inhouse Reproducibility dilakukan oleh 2 analisis berbeda, sampel uji yang identik, waktu berbeda, peralatan dan tempat yang sama. Setiap analisis melakukan pengujian sebanyak 10 kali ulangan untuk setiap sampel. Hasil uji analisis terlihat pada Tabel 2 dan Tabel 3.

Tabel 2. Hasil uji Analisis 1 dan Analisis 2 Uji Residu Quinolon dengan ELISA pada sampel daging ayam

Larutan	Analisis 1		Analisis 2	
	Absorbansi (A)	Konsentrasi	Absorbansi (A)	Konsentrasi
1	1.369E	0.452	1.408E	0.365
2	1.381E	0.425	1.369E	0.452
3	1.409E	0.363	1.409E	0.363
4	1.369E	0.452	1.407E	0.366
5	1.365E	0.461	1.408E	0.365
6	1.368E	0.454	1.409E	0.363
7	1.369E	0.452	1.406E	0.368
8	1.368E	0.454	1.407E	0.366
9	1.408E	0.365	1.409E	0.363
10	1.349E	0.496	1.407E	0.366
Rata-rata (x)		0.437	Rata-rata (x)	0.375
SD		0.042	SD	0.029
RSD(%)		9.673	RSD(%)	7.767

Tabel 3. Hasil uji Analisis 1 dan Analisis 2 Uji Residu Quinolon dengan ELISA pada sampel telur

Larutan	Analisis 1		Analisis 2	
	Absorbansi (A)	Konsentrasi	Absorbansi (A)	Konsentrasi
1	1.832E	0.730	1.788E	0.826
2	1.788E	0.826	1.750E	0.902
3	1.774E	0.851	1.830E	0.745
4	1.808E	0.780	1.786E	0.828
5	1.820E	0.755	1.786E	0.828
6	1.786E	0.828	1.786E	0.828
7	1.749E	0.902	1.821E	0.755
8	1.830E	0.745	1.790E	0.824
9	1.788E	0.826	1.790E	0.824
10	1.786E	0.828	1.820E	0.755
	Rata-rata (x)	0.807	Rata-rata (x)	0.818
	SD	0.054	SD	0.046
	RSD(%)	6.630	RSD(%)	5.602

Inhouse Reproducibility metode pada sampel daging ayam pada analisis 1 dan analisis 2 menghasilkan RSD(%) masing-masing 9.673 dan 6.630; keduanya lebih kecil dari CV Horwitz 33.83 dan 34.63. Sedangkan pada sampel telur, analisis 1 dan analisis 2 menghasilkan RSD(%) masing-masing 6.630 dan 5.602, lebih kecil dari 2/3 CV Horwitz 30.85 dan 30.79; sehingga metode ini memenuhi syarat. Hasil ini juga menunjukkan bahwa hasil uji kedua analisis sangat baik.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil data verifikasi uji Residu Antibiotika Golongan Quinolon dengan ELISA dapat disimpulkan *repeatability* pada sampel daging ayam dan telur menghasilkan RSD(%) 9.673 dan 6.630; kurang dari nilai 2/3 CV Horwitz 33.83 dan 30.85 menunjukkan metode memenuhi syarat keberterimaan. Sedangkan *inhouse reproducibility* kedua analisis sangat baik ditunjukkan dengan RSD(%) pada daging ayam masing-masing 9.673 dan 6.630; keduanya lebih kecil dari CV Horwitz 33.83 dan 34.63. Sedangkan pada sampel telur, kedua analisis menghasilkan RSD(%) masing-masing 6.630 dan 5.602, lebih kecil dari 2/3 CV Horwitz 30.85 dan 30.79. Maka metode pengujian residu quinolon pada sampel daging ayam dan telur menggunakan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dapat diverifikasi dan digunakan untuk analisis sampel rutin.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists). (2002). Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists). (2016). Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements
- Beyene, T. (2016) Veterinary Drug Residues in Food-animal Products: Its Risk Factors and Potential Effects on Public Health. *Journal of Veterinary Science Technology*, 7, 285-291.
- BSN (Badan Standarisasi Nasional). (2022). SNI ISO 16140-4:2020 Mikrobiologi rantai pangan – Validasi metode – Bagian 4: Protokol validasi metode pada suatu laboratorium, Jakarta
- Chang CS, Wang WS, Tsai CE. (2010). Simultaneous Determination of 18 Quinolone Residues in Marine and Livestock Products by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Food and Drug Analysis*, 18:2, 87-97
- Cotter, P., Stanton, C., Ross, R., & Hill, C. (2012). The impact of antibiotics on the gut microbiota as revealed by high throughput DNA sequencing. *Discover Medicine*, 13, 193-199.
- Horwitz W, Albert R, 2006, The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision, *Journal of AOAC International*. Vol. 89, No. 4
- ISO International Standard 16140-3, 2021, Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory, 1st Ed., Geneva.
- Mashak Z., Mojaddar Langroodi A., Mehdizadeh T., Ebadi Fathabad A., Hooman Asadi A., (2017). Detection of Quinolones residues in beef and chicken meat in hypermarkets of Urmia, Iran using ELISA, *Iran Agricultural Research*. 36(1) 73-77
- Parthasarathy R, Monette CE, Bracero S, Saha MS., (2018), Methods for field measurement of antibiotic concentrations: limitations and outlook, *FEMS Microbiology Ecology*, Vol 94, Issue 8, August 2018, fiy105, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy105>
- Riyanto, (2014), Validasi dan Verifikasi Metode Uji Sesuai dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi, Ed. 1, Deepublish, Yogyakarta
- Widiastuti R., Martindah E., & Anastasia Y., (2021), Detection and Dietary Exposure Assessment of Fluoroquinolones Residues in Chicken Meat from the Districts of Malang and Blitar, Indonesia, *Tropical Animal Science Journal*, March 2022, 45(1):98-103

Deteksi *Listeria monocytogenes* pada Sosis Ayam dengan Metode Kromogenik Agar

Kanti Puji Rahayu¹, Zeze Zakiah²

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

*Email korespondensi: kanti_pujirahayu@yahoo.co.id

ABSTRAK

Kasus keracunan makanan akibat infeksi bakteri semakin meningkat seiring berkembangnya produk industri pangan di beberapa negara maju dan berkembang. Produk makanan modern yang harus diwaspadai oleh konsumen adalah makanan siap saji yang dibekukan atau Frozen Ready to Eat (RTE) Food. Dalam penelitian ini, sampel makanan siap saji Frozen Food yang diuji diperoleh dari sampel pasif. Semua sampel diuji keberadaan *Listeria monocytogenes*, terutama karena kemampuannya untuk dapat hidup di suhu 4°C. Metode yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan *Listeria monocytogenes* adalah dengan menggunakan metode SNI ISO 11290-1:2012 Metode horizontal untuk deteksi dan enumerasi *Listeria monocytogenes* – Bagian 1: Metode deteksi dengan menggunakan media kromogenik agar Agar yaitu Listeria Ottaviani Agosti (ALOA) dengan melalui tahapan pengayaan, permurnian dan konfirmasi menggunakan Maltitof. Media kromogenik agar merupakan media spesifik untuk *L. monocytogenes* dan media ini lebih cepat dibandingkan dengan media konvensional seperti media Oxford agar ataupun Palcam agar karena dapat membedakan secara langsung bentuk makroskopis *L. monocytogenes* dengan bentuk makroskopis Listeria lainnya. Adapun bentuk makroskopis *L. monocytogenes* ditandai adanya zona opak dengan koloni cembung berwarna hijau, sedangkan Listeria lainnya tidak terdapat zona opak. Secara mikroskopis *L. monocytogenes* termasuk gram positif berbentuk batang pendek dan berwarna ungu. *L. monocytogenes* mampu memfermentasi rhamnosa, glukosa, maltosa namun tidak dapat memfermentasi xylose dan manitol. Selain itu *L. monocytogenes* bersifat motil dan positif terhadap uji katalase. Pada pengujian Sosis ayam menunjukkan hasil positif *L. monocytogenes* karena dari semua tahap pengujian menunjukkan reaksi yang sama yang sama dengan kontrol positif *L. monocytogenes*.

Kata kunci: *Listeria monocytogenes*; Kromogenik agar; Sosis ayam.

PENDAHULUAN

Sosis adalah produk makanan yang diperoleh dari campuran daging halus dan tepung atau pati dengan penambahan bumbu, bahan tambahan makanan yang dimasukkan ke dalam selongsong sosis. Sosis biasanya disajikan dengan proses pemasakan terlebih dahulu, baik direbus, dikukus, digoreng dan dipanggang. Dahulu sosis digunakan sebagai campuran masakan seperti sandwich maupun sup, namun saat ini sosis dapat dikonsumsi sendiri dan dijadikan produk siap santap. Berdasarkan bahan baku dagingnya, sosis terdiri dari sosis ayam, sosis babi dan sosis sapi. Sosis ayam biasanya dibuat dari dada ayam. Hal ini disebabkan dada ayam memiliki lemak paling kecil dibandingkan bagian lainnya, seperti paha, sayap, leher dan jeroan. Menurut Pearson dan Dutson (1987), kandungan lemak (kolesterol) pada dada ayam yang paling kecil dari bagian lainnya sebesar 58 mg/100g BDD sehingga dapat mengurangi jumlah asupan lemak bagi tubuh.

Meskipun rasanya enak dan mudah diolah dengan masa simpan yang panjang, sosis juga mudah mengalami kerusakan disebabkan adanya aktivitas mikroorganisme patogen sehingga diperlukan penanganan, penyimpanan yang sesuai. Salah satu jenis mikroba yang dapat mencemari daging sapi adalah *Listeria monocytogenes*. Aktivitas mikroorganisme ini dapat mengakibatkan *foodborne disease* yaitu penyakit yang ditularkan melalui makanan. Penyakit yang timbul dikenal dengan nama listeriosis (Amagliani *et al.*, 2004). Suhu optimum pertumbuhan *L. monocytogenes* berkisar antara 30^o-37^oC, tetapi masih dapat tumbuh pada suhu rendah hingga 3^oC. Oleh karena dapat tumbuh pada suhu rendah hingga 3^oC maka bakteri ini bisa berkembang biak dalam makanan yang disimpan di kulkas. Penyebab listeriosis adalah mengonsumsi produk pangan asal ternak berupa daging ayam/sapi mentah atau tidak dimasak dengan sempurna, *hot dog* yang tidak dipanaskan ulang, keju lunak, susu mentah, susu pasteurisasi atau makanan yang dibuat dari susu yang tidak dipasteurisasi, sayuran dan produk kacang-kacangan yang tidak dimasak, es krim, sosis (dari daging mentah yang difermentasi), ikan segar, ikan asap, serta makanan siap santap yang lain yang disimpan lama dalam *refrigerator* (Churchill, 2006).

Kemampuannya untuk tumbuh pada temperatur rendah hingga 1^oC memungkinkan bakteri ini berkembang biak dalam makanan yang disimpan di lemari pendingin. Bahan pangan siap santap tanpa pemanasan ulang dapat terkontaminasi oleh bakteri ini setelah proses pengolahan atau dimasak tetapi belum dikemas (Abdelgadir *et al.*, 2009). Susu mentah, susu pasteurisasi, telur dan produk olahannya, adalah bahan pangan asal ternak yang paling berperan pada kejadian listeriosis (Muchtadi, 1992).

METODOLOGI

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam pengujian bakteri *Listeria monocytogenes* adalah *selective listeria agar*, *Half Fraser*, *Fraser*, Kit *API Listeria monocytogenes*, kristal violet, lugol, safranin, minyak imersi, aquadest, plastik sampel steril, media NA (Nutrient Agar), kontrol positif *Listeria monocytogenes* ATCC 7644

Alat yang digunakan dalam pengujian bakteri *Listeria monocytogenes* adalah Cawan petri, pipet serologis ukuran 10 ml, Tabung reaksi dan tutup, gelas ukur 250 ml, botol media, ose (jarum inokulasi), gunting stainless, pinset, rak tabung reaksi, timbangan presisi, Inkubator, Stomacher, beaker glass, mikroskop cahaya, kaca preparat, magnetic stirrer, vortex mixer, penangas air/water bath, autoklaf, refrigerator, freezer, pemanas ose, Maliditof

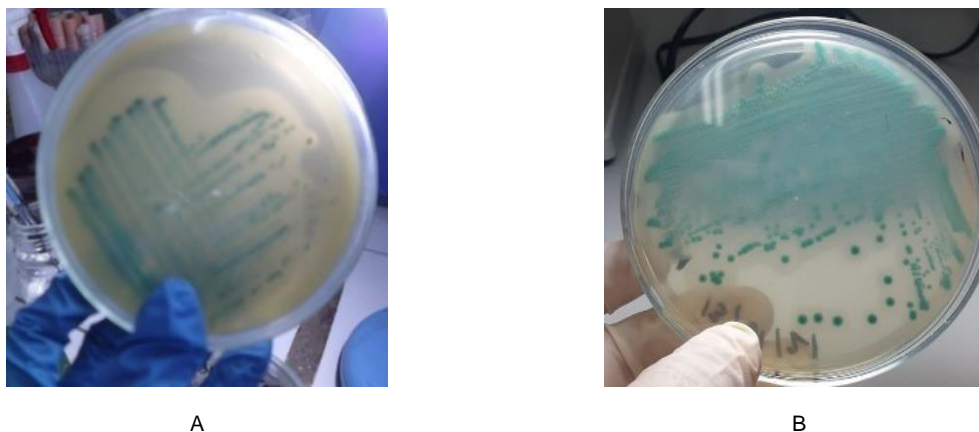
Metode Uji *Listeria monocytogenes*

Metode uji pada penelitian ini berdasarkan pada SNI ISO 11290-1:2012 Metode horizontal untuk deteksi dan enumerasi *Listeria monocytogenes* – Bagian 1: Metode deteksi. Teknik menggunakan media media kromogenik agar Agar yaitu *Listeria Ottaviani Agosti (ALOA)*. Sampel sosis ayam ditimbang sebanyak 25 gram dan ditambahkan dengan 225 ml pengayaan primer (*half fraser*) kedalam plastik steril, lalu dihomogenkan dengan stomacher selama 1 menit dengan kecepatan 230 rpm dan dinkubasi selama selama 24 jam pada suhu 30°C. Selanjutnya ambil 0,1 ml *half fraser* dan tambahkan ke dalam 10 ml *fraser* dan inkubasi selama 48 ± 2 jam pada temperatur 35-37° C. Sampel diplating pada permukaan *ALOA* dan inkubasi 37 °C ± 1 °C dan dilakukan pengamatan setelah 24 jam ± 3 jam untuk memeriksa adanya koloni khas yang diduga sebagai *L.monocytogenes*.

Karakteristik koloni terduga *L.monocytogenes* adalah koloni khas berwarna hijau bersinar dan cembung (diameter 1,5 – 2,5 mm), dikelilingi zona bening yang mungkin sebagian buram dan terbentuk lingkaran *opalescent* di sekitar zona bening. Koloni yang menunjukkan karakteristik tersebut kemudian dilanjutkan ke uji morfologi, fisiologi, biokimia dan *Malditoff*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat yang diperoleh kemudian ditumbuhkan pada media *selective listeria agar* yang telah ditambahkan suplemen kemudian ratakan dengan ose steril. Dilakukan perlakuan yang sama untuk kontrol positif. Penggunaan kontrol positif *Listeria monocytogenes* bertujuan sebagai pembanding terhadap pengujian pada sampel sosis ayam. Setelah isolat pada *selective agar listeria agar* diinkubasi selama 24 ± 2 jam pada suhu 37°C koloni yang diduga *L. monocytogenes*, dapat dilihat pada Gambar 1. sebagai berikut:



Gambar 1. A). kontrol positif (+) *Listeria monocytogenes* terdapat zona opak, B). sampel *Listeria monocytogenes* terduga positif *Listeria monocytogenes*

Berdasarkan Gambar 1. diatas dapat diketahui bahwa pada media pada *selective listeria agar* Gambar A. kontrol positif terdapat zona opak yang mengindikasikan bahwa terdapat koloni *Listeria monocytogenes* sedangkan pada Gambar B. juga terdapat zona opak hal tersebut mengindikasikan bahwa terdapat koloni yang diduga sebagai *Listeria monocytogenes*. Media memanfaatkan substansi kromogenik yang menghasilkan sekumpulan warna yang terkait dengan spesies patogen tertentu ketika substrat ini mengalami hidrolisis oleh enzim patogen yang didasarkan pada phospholipases spesifik *Listeria monocytogenes*.

Hal tersebut memungkinkan pembedaan langsung *Listeria monocytogenes* berdasar warna koloni biru dengan lingkaran putih di sekitar koloni, dapat dilihat langsung di bawah pencahayaan normal sedangkan spesies bakteri lainnya dihambat atau memberikan warna biru tanpa halo/opak atau

warna koloninya seperti media biakan. Sehingga koloni *Listeria monocytogenes* mudah dideteksi dan dapat dipelajari secara langsung dengan tes additional untuk konfirmasi. Pada umumnya, hasilnya bisa terlihat setelah 18-24 jam setelah inkubasi. Dengan menggunakan media kromogenik ALOA ini, tingkat ketelitian dan kepercayaan terhadap analisa produk akan semakin tinggi.

Sedangkan menurut Microbiology of Food and Animal (FDAM) (2004), pertumbuhan *Listeria monocytogenes* dengan menggunakan metode konvensional yaitu pada media differensial selektif *Listeria monocytogenes* yang mengandung esculine (OXFORD dan PALCAM) akan tampak berwarna hitam dengan halo yang berwarna hitam juga. Beberapa bakteri jenis lainnya juga dapat membentuk pertumbuhan yang serupa dengan *Listeria monocytogenes*, hanya saja lebih lambat waktu pertumbuhannya lebih dari 2 hari. Koloni tipikal yang tumbuh pada media OXFORD atau PALCAM dilanjutkan dengan purifikasi pada media TSA + Yeast Extract (Churchill, 2006). Setelah didapat ciri-ciri positif koloni yang diduga *Listeria monocytogenes* dengan koloni berwarna biru dan terdapat zona opak pada media kromogenik, harus dilakukan purifikasi/pemurnian untuk selanjutnya dilakukan konfirmasi.

Uji Konfirmasi *Listeria monocytogenes*

Uji Biokimia dan Motilitas

Tahapan selanjutnya dalam mendeteksi keberadaan *Listeria monocytogenes* pada sampel sosis ayam yaitu uji konfirmasi yang dapat dilihat pada Tabel 1. yang disajikan sebagai berikut :

Table 1 Hasil uji konfirmasi *L. monocytogenes* pada sosis ayam menggunakan uji biokimia

No	No. Analisis	Kuman Standar positif	Jenis sampel	Uji Konfirmasi							Hasil
				Mot	Glu	Mal	Man	Rham	Xyl	Cat	
C+		Bakteri <i>L. monocytogenes</i>	Kontrol (+) isolat dalam Nutrient Agar	+	+	+	-	+	-	+	+
											(<i>Listeria monocytogenes</i>)
1	Sosis ayam (A)			+	+	+	-	+	-	+	+
											(<i>Listeria monocytogenes</i>)
2	Sosis ayam (B)			-	+	+	-	-	-	-	-
											(<i>Listeria monocytogenes</i>)

Keterangan : (+) = hasil positif terhadap pengujian (-) = hasil negatif terhadap pengujian

Berdasarkan Tabel 1. Hasil sampel sosis ayam A dan kontrol positif bakteri mampu memfermentasikan rhamnose, glukosa, maltose, kecuali xylose dan manitol. Sedangkan pada sampel Sosis ayam B hanya mampu memfermentasi glukosa dan maltosa. Hal tersebut diperkuat oleh pernyataan Esteban, (2009) bahwa semua strain *Listeria* memproduksi asam dari selobiosa, eskulin, fruktosa, glukosa, mannose, dan salisin (waktu inkubasi 2 hari), bila waktu inkubasi diperpanjang sampai 4 hari maka juga dapat memfermentasi maltose, dekstrin, dan α -metil-D-glukosida (2-6 hari).

Pada uji motilitas sampel sosis ayam (B) yang juga menunjukkan hasil negatif karena bentuk bakteri bulat kecil sedangkan pada sampel sosis ayam A dan kontrol positif menunjukkan hasil positif bersifat motil karena berbentuk batang pendek sehingga memiliki alat gerak (motil). Hal tersebut sesuai dengan pernyataan menurut Volk, (1988) kemampuan suatu organisme untuk bergerak sendiri disebut motilitas (daya gerak). Hampir semua sel bakteri spiral dan sebagian dari sel bakteri basil (batang) bersifat motil, sedangkan bakteri yang berbentuk kokus (bulat) bersifat tidak bergerak (immotil).

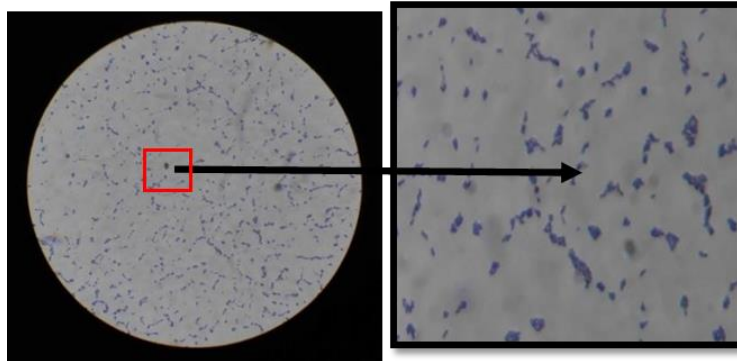
Menurut Lemon (2007) kebanyakan sel bakteri dapat bergerak dengan menggunakan flagel, akan tetapi ada bakteri yang tidak dapat bergerak karena tidak memiliki flagel. Gerak bakteri pada bakteri yang bersifat motil diakibatkan oleh adanya struktur atau organ sel bakteri yang berbentuk benang yang disebut flagella. Karena flagella pada bakteri berfungsi untuk bergerak. Flagella berbentuk panjang dan ramping. Hal ini membuktikan *Listeria* termasuk bakteri anaerob fakultatif, *Listeria* termasuk bakteri patogen interseluler yang dalam menggunakan actin filaments di dalam sel inang untuk bergerak.

Pewarnaan Gram

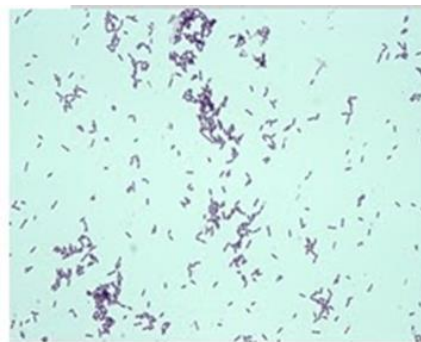
Uji konfirmasi dengan pewarnaan Gram dilakukan untuk memudahkan melihat bakteri dengan mikroskop, memperjelas ukuran dan bentuk bakteri (Muchtadi, 1992). Mula-mula kaca objek dibersihkan dengan alkohol. Pembersihan ini dilakukan supaya kaca objek bebas lemak dan debu. Koloni tunggal yang diduga *Listeria monocytogenes* diinokulasikan masing-masing 1 ose dari media NA (Nutrient Agar) dan koloni tersebut diletakan pada gelas objek yang telah ditetes aquades dan diratakan selanjutnya di fiksasi. Selanjutnya ditetesi dengan kristal violet dan dibiarkan selama satu menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dibiarkan sampai kering, dan dilanjutkan dengan larutan lugol dan dibiarkan selama 1 menit dan bilas kembali dengan air mengalir. Tahap dekolorizer

(etanol) dan bilas sampai bersih, kemudian ditetaskan pewarna sekunder yaitu safranin dan bilas lagi menggunakan air mengalir dan dikeringkan.

Setelah diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran dengan pembesaran 100x dan ditambahkan minyak emersi pada saat pengamatan. Hasil pengamatan bakteri *Listeria monocytogenes* dibawah mikroskop adalah sebagai berikut:



Gambar 2. Kontrol positif *L. monocytogenes* pada uji pewarnaan Gram (Perbesaran 100x).



Gambar 3. Sampel sosis ayam (A) pada pewarnaan Gram (Perbesaran 100x)

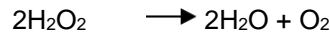
Berdasarkan hasil uji pewarnaan gram pada sampel sosis ayam A dan kontrol positif *Listeria monocytogenes* pada perbesaran 100x sama sama berbentuk batang dan gram positif. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan menurut Sutherland, (1998) yang menyatakan bahwa *L. monocytogenes* merupakan bakteri Gram positif, berbentuk batang pendek, dan memiliki diameter sel berukuran 0,4 – 0,5 μm dan panjang 0,5 – 2,0 μm . Perbedaan respon terhadap mekanisme pewarnaan Gram pada bakteri adalah didasarkan pada struktur dan komposisi dinding sel bakteri. Bakteri Gram positif mengandung protein dan Gram negatif mengandung lemak dalam presentasi lebih tinggi dan dinding selnya tipis. Pemberian alkohol, menyebabkan terekstraksi lipid sehingga memperbesar permeabilitas dinding sel (Slutsker, 1999).

Zat warna safranin pada bakteri Gram positif dinding selnya terdehidrasi dengan perlakuan alkohol, pori-pori mengkerut, daya rembes dinding sel dan membran menurun sehingga zat warna safranin tidak dapat masuk sehingga sel berwarna ungu sedangkan pada bakteri Gram negatif pewarna tersebut masuk ke dalam sel dan menyebabkan sel menjadi berwarna merah (Andini, 1998). Dinding sel bakteri Gram positif terdiri dari lapisan peptidoglikan yang tebal dan ketika ditambahkan pewarnaan Kristal violet maka dinding sel bakteri Gram positif akan menyerap apabila diberi alkohol dan pada Gram positif akan tetap berwarna ungu walaupun diberi zat warna kedua, karena dinding selnya tersusun oleh lapisan peptidoglikan yang tebal sehingga dapat dicuci alkohol (Andini, 1998).

Uji Katalase

Uji konfirmasi berikutnya yaitu uji katalase yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas katalase pada bakteri *Listeria monocytogenes*. Tahap pertama untuk uji katalase adalah koloni tunggal yang diduga *L. monocytogenes* diambil 1 ose steril dari media NA (Nutrient Agar) kemudian dicampurkan dengan satu tetes pereaksi H_2O_2 katalase pada kaca preparat. Dilakukan perlakuan yang sama untuk kontrol positif, dan sampel. Berdasarkan Tabel 1. hasil uji katalase dapat diketahui bahwa kontrol positif terdapat gelembung begitu juga pada sampel Sosis ayam A terdapat gelembung sedangkan pada sampel sosis ayam B tidak terdapat gelembung. Hal ini disebabkan bakteri pada sampel tidak bereaksi melepas air dan oksigen saat di tambahkan dengan hydrogen peroksida atau disebut katalase negatif.

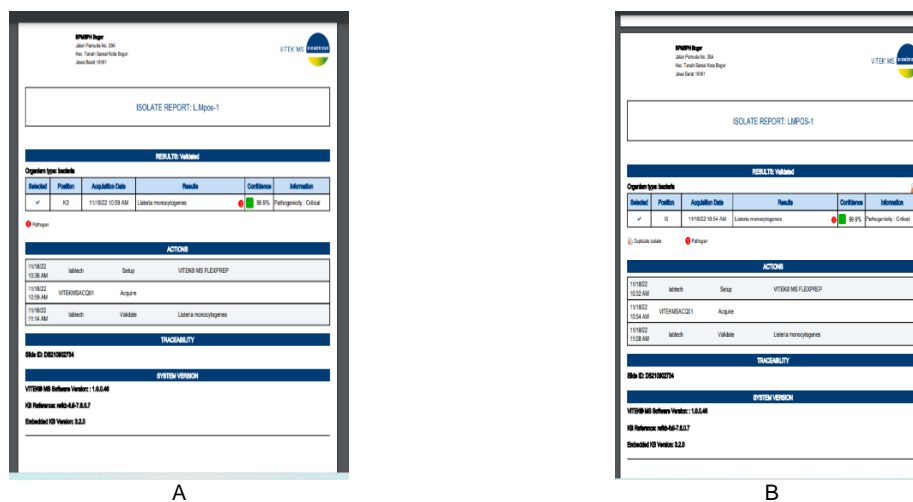
Reaksi katalase positif terjadi apabila terbentuk gelembung sedangkan reaksi katalase negatif jika tidak terbentuk adanya gelembung. Pada saat melakukan respirasi salah satu komponen yang dihasilkan bakteri adalah H_2O_2 . Bentuk reaksi kimianya adalah:



Bakteri yang memiliki kemampuan memecah H_2O_2 dengan enzim katalase segera membentuk suatu sistem pertahanan dari toksik H_2O_2 yang dihasilkan sendiri. Senyawa peroksida harus segera diuraikan menjadi air (H_2O) dan oksigen (O_2) yang tidak berbahaya. Penguraian peroksida ditandai dengan timbulnya gelembung (Sunatmo, 2007).

Maldi ToF-MS (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*)

Peneguhan terakhir untuk deteksi spesies bakteri *Listeria monocytogenes* menggunakan MaldiToff yang mempunyai prinsip teknik ionisasi menggunakan matriks penyerap energi laser untuk membuat ion dari molekul besar dengan fragmen minimal. Pada penelitian ini sampel sosis ayam terduga *Listeria monocytogenes* selanjutnya dikonfirmasi menggunakan Maldi ToF-MS dan menunjukkan hasil positif, demikian juga dengan kontrol positifnya. Hasil Maldi ToF-MS sampel sosis ayam dan kontrol dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Hasil Maldi ToF-MS pada sampel ayam ditunjukkan oleh gambar A dan kontrol Positif pada gambar B

SIMPULAN

Pada penelitian ini menunjukkan hasil positif *Listeria monocytogenes* pada sosis ayam baik dengan media kromogenik agar dan dengan konfirmasi menggunakan *Maldi ToF-MS*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelgadir, A. 2009. Detection of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat products. Am. J. Anim. Vet. Sci. 4(4): 101– 107
- Amagliani, G. 2004. Direct detection of *Listeria monocytogenes* from milk by magnetic based DNA isolation and PCR. Food Microbiol. 21: 597 – 603
- Andini, L.S. 1998. Kemampuan hidup *Listeria monocytogenes* yang diisolasi dari bahan pangan asal ternak terhadap iradiasi gamma. Pros. Seminar Hasil-hasil Penelitian Veteriner. Bogor, hlm. 95 – 102
- Astawan, Made, 2004. Sehat Bersama Aneka Serat Pangan Alami. Cetakan I. Penerbit Tiga Serangkai, Solo
- Badan Standardisasi Nasional. (2012). *Standar Nasional Indonesia (SNI) ISO No. 11290-1-2012 tentang Mikrobiologi bahan pangan dan pakan –Metode horizontal untuk deteksi dan enumerasi Listeria monocytogenes – Bagian 1: Metode deteksi.*
- Badan Standardisasi Nasional. 2008. Karkas dan Daging Sapi SNI 3932:2008. Badan Standardisasi Nasional. Jakarta
- Buckle KA.1985. Ilmu Pangan. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta
- Canadian Food Inspection Agency. 2008. "Food Safety Facts on *Listeria*".www.inspection.gc.ca. Diakses pada Rabu, 27 Mei 2015

- Cessaran, C. 2010 Isolasi dan Identifikasi *Listeria monocytogenes* dari Frozen Food. Institut Teknologi Bandung.
- Churchill, R. 2006. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. J. Microbiol. Methods 64: 141 – 170
- Clark, Marler. 2005. *Listeria*. www.about-listeria.com. Diakses pada Rabu, 27 Mei 2015
- Costerton, J.W. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. Annu. Rev. Microbiol. 41: 435 – 464
- Dwidjoseputro, D. 1998. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Djambatan, Jakarta
- Esteban, J.I. 2009. Faecal shedding and strain diversity of *Listeria monocytogenes* in healthy ruminants and swine in Northern Spain. BMC Vet. Res. 5: 2 – 10
- Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: interpretative summary. FAO/WHO. Geneva
- Frank, J.F. 1990. Surface adherent growth of *Listeria monocytogenes* associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. J. Food Proto 53: 550 – 554
- Grossklau, D. 1993. *Food Hygiene and Consumer Protection*. A Word Wide Future Challenge. The 11th International Symposium of The Word Association of Veterinary Hygienist, Bangkok, Thailand
- Hadiwiyoto, S. 1983. *Hasil-Hasil Olahan Susu, Ikan, Daging, dan Telur*. Liberty. Yogyakarta
- International Standard Organization. 2004. 11290-1:1198/FDAM (E), Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs- Horizontal Method for The Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*
- Jay, J.M. 1997. *Modern Food Microbiology*. 5th edition. International Thomson Publishing. New York
- Jay, J.M. 1998. *Modern Food Microbiology*. Second Edition. D. Van Nostrand Company
- Kinsman, D. M., A. W. Kotula and B. C. Breindenstein. 1994. Muscle Food, Meat, Poultry and Seafood Technology. Chapman and Hall, London
- Kusumawati, N. 2000. *Peranan Bakteri Asam Laktat Dalam Menghambat Listeria monocytogenes Pada Bahan Pangan*. Jurnal Teknologi Pangan dan Gizi Vol 1
- Lemon, K.P. 2007. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. J. Bacteriol. 189(12): 4418 – 4424
- Lisa. 2013. *Listeria monocytogenes*. www.analiskimia.co.vu. Diakses pada tanggal 27 Mei 2015
- Martin, Roy E., Robert L. Collete, and Joseph W. Slavin. 1997. *Fish Inspection, Quality Control, and HACCP*. Arlington, Virginia, USA: Technomic Publishing Co., Inc
- Muchtadi, T.R. dan Sugiono. 1992. *Ilmu Pengetahuan Bahan Pangan*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Nurhayat. W. 2014. BPS: Tahun Depan Permintaan Daging Sapi Naik 8% Jadi 639.000 Ton. finance.detik.com. Diakses pada tanggal 27 mei 2015
- Pearson, A.W. and T.R. Dutson. (1987). *Advances in Meat Research Vol 3 Restructured Meat and Poultry Products*. An Avi Book. New York.
- Rahayu, E.S. 2006. *Amankan Produk Pangan Kita : Bebaskan dari Cemaran Berbahaya*. Apresiasi peningkatan mutu hasil olahan pertanian. Dinas Pertanian Propinsi DIY dan Kelompok Pemerhati Keamanan Mikrobiologi Produk Pangan, Yogyakarta
- Slutsker L, Schuchat A. 1999. Listeriosis in humans. Di dalam: Ryser ET, Marth EH, editor. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. Ed ke-2. Marcel Dekker. New York. hlm 75–96
- Soeparno. 1998. Ilmu dan Teknologi Daging. Gajah Mada Universitas Press, Yoyakarta
- Soeparno. 1992. *Pilihan Produksi Daging Sapi dan Teknologi Prosesing Daging Unggas*. Fakultas Peternakan. Universitas Gadjah Mada
- Sunatmo, T.I. 2007. *Eksperimen Mikrobiologi dalam Laboratorium*. Ardy Agency. Jakarta
- Supardi, Imam & Sukamto. 1999. Mikrobiologi dalam Pengolahan dan Keamanan Pangan. Bandung: Penerbit Alumni, 184-185
- Sutherland, P.S. 1989. *Listeria monocytogenes*. In: Foodborne Microorganismes of Public Health Significance, Fourth Edition AIFST (Nsw Branch). Food Microbiol. Group pp. 289 – 311
- Syarif H. 1997. *Membangun Sumberdaya Manusia Berkualitas: Suatu telaah Gizi Masyarakat dan Sumberdaya Keluarga*. Orasi Ilmiah Guru Besar Ilmu Gizi Masyarakat dan Sumberdaya Keluarga. IPB. Bogor
- Usmiati, Sri. 2010. *Pengawetan Daging Segar dan Olahan*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian Kampus Penelitian Pertanian. Jl. Tentara Pelajar 12 Cimanggu, Bogor
- Todar, K. 2008. "*Listeria monocytogenes* (page1)". www.textbookofbacteriology.net. Diakses pada Selasa, 26 Mei 2015
- Volk & Wheeler, 1993, *Mikrobiologi Dasar Jilid 1 Edisi kelima*, Erlangga. Jakarta

Validasi Metode Pengujian Residu Sulfonamida Kualitatif Menggunakan *Microbial Screening Methods*

Attya Asuh Insani¹, Sani Susanty¹, Oli Susanti¹, Ari Retnowati¹

Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan Bogor¹
e-mail: att_insani@yahoo.com

ABSTRAK

Residu sulfonamida, khususnya pada unggas, masih terus menjadi fokus pengujian. karena menimbulkan efek buruk pada manusia, termasuk reaksi alergi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memvalidasi penggunaan *Microbial Screening Methods* untuk mendeteksi adanya residu antibiotik golongan Sulfonamida pada produk hewan (daging, telur, dan susu). Berdasarkan hasil validasi *repeatability* terhadap semua parameter uji (Sensitifitas, Spesifisitas, Efisiensi) sangat baik (100%), begitupula hasil *reproducibility* 100 % baik dan benar. Limit deteksi pada sampel daging ayam, telur dan susu adalah pada konsentrasi 0,25 µg/mL. Hasil data perbandingan uji Residu Sulfonamida menggunakan metode skrining (Uji Tapis) dengan hasil uji menggunakan metode ELISA tidak berbeda nyata.

Kata kunci:

Residu; Skrining; Sulfonamida; Validasi.

PENDAHULUAN

Penggunaan Sulfonamida pada ternak terus meningkat sejak tahun 2017 menurut Center for Veterinary Medicine, US Food and Drug Administration (FDA), pada tahun 2021 mencapai angka 3%, dengan kenaikan 7% dari tahun 2020. Sedangkan di Indonesia, penggunaan sulfonamida pada ternak ayam broiler pada tahun 2022 sebesar 8% (POH, 2023). Residu sulfonamida, khususnya pada unggas, terus menjadi fokus deteksi. Karena menimbulkan efek buruk pada manusia, termasuk reaksi alergi, maka perlu diperhatikan *withdrawal times* (waktu penghentian obat).

Sulfonamida adalah antibiotik yang tertua dan masih menjadi salah satu agen antibakteri yang paling banyak digunakan pada ternak, terutama karena biayanya yang rendah dan relatif ampuh terhadap beberapa penyakit bakteri yang umum. Aksi sinergis sulfonamida dengan diaminopirimidin spesifik menjadikan obat ini jauh lebih efektif dibandingkan sulfonamida saja.

Kelompok diaminopyrimidines (trimethoprim, methoprim, ormetoprim, aditoprim, dan pyrimethamine) menghambat reduktase dihydrofolate pada bakteri dan protozoa jauh lebih efisien dibandingkan pada sel mamalia. Jika digunakan sendiri, agen ini tidak terlalu efektif melawan bakteri, dan resistensi akan berkembang dengan cepat. Namun, bila dikombinasikan dengan sulfonamid, terjadi blokade berurutan pada sistem enzim mikroba yang menimbulkan efek bakterisidal (Mercer 2022).

Sulfonamida adalah analog struktural asam para-aminobenzoat (PABA) dan secara kompetitif menghambat dihydropterate synthetase (DPS), suatu enzim yang memfasilitasi PABA sebagai substrat untuk sintesis asam dihidrofolik (asam folat). Dihydrofolate adalah prekursor pembentukan tetrahydrofolate (asam folinat), komponen penting dari koenzim yang bertanggung jawab untuk metabolisme karbon tunggal dalam sel. Sulfonamida adalah antimetabolit yang menggantikan PABA, mengakibatkan blokade beberapa enzim yang diperlukan untuk biogenesis basa purin dan reaksi metabolisme lain yang diperlukan untuk pembentukan RNA. PABA adalah antagonis dari semua sulfonamid. Tindakan bakteriostatik dari sulfonamida dihambat dengan adanya kelebihan dari PABA, berarti dengan adanya PABA, sulfonamida kehilangan aktivitas antibakterinya (Kozarova *et al.* 2005).

Metode uji kimiawi terlalu spesifik untuk diterapkan pada pendekatan pertama, karena terlalu banyak potensi zat yang harus dipantau yang bersifat antibakteri dalam makanan. Strategi pengendalian didasarkan pada tiga hal langkah berurutan: skrining level satu, skrining level dua dan akhirnya konfirmasi. (Ferrini *et al.* 2006). Langkah pertama umumnya terdiri dari skrining luas untuk mendeteksi sebanyak mungkin antibiotik sedini mungkin. Skrining ini umumnya dilakukan dengan metode mikrobiologi (Gaudin *et al.* 2004). Kelebihan utama dari metode ini yaitu murah, mudah dilakukan, dan sesuai untuk tujuan skrining sampel dalam jumlah besar dan memiliki spektrum deteksi antimikroba yang cukup luas (Mitchel *et al.* 1998). Skrining level dua dapat dilakukan secara simultan dengan level satu. yaitu dengan penambahan Paba untuk golongan Sulfonamida dan aktivitas Paba spesifik untuk golongan sulfonamid (Gale *et al.* 1972; Russel *et al.* 1979).

Setelah mengisolasi sampel yang positif memiliki aktivitas penghambatan generik, residu harus diidentifikasi dan diuji secara kimia. Oleh karena itu, penting untuk mengetahui kelompok inhibitor mana yang termasuk dalam obat tersebut untuk mengatasi analisis kimia yang pasti, karena banyak obat yang berpotensi mampu menginduksi penghambatan mikroba dan tidak mungkin untuk menguji secara kimia, satu per satu, semua obat yang berbeda (Mitchel *et al.* 1998). Uji kimia antara lain uji imuno-

enzim-assay (ELISA), elektroforesis tegangan tinggi uji reseptor Charm II dan/atau metode kromatografi. Kelemahan uji residu secara kimia adalah mahal, dan membutuhkan keahlian spesifik untuk menerapkannya (Ferrini *et al.* 2006; Smither *et al.* 1978).

MATERI DAN METODE

Residu antibiotika akan menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada media agar. Penghambatan dapat dilihat dengan terbentuknya daerah hambatan disekitar kertas cakram (*paper disc*). Metode uji ini berdasarkan SNI 7424 tentang *Metode uji tapis (screening test) residu antibiotika pada daging, telur, dan susu secara bioassay* (BSN, 2008).

Spora dan Media Agar

Spora *Bacillus Subtilis*/Spizizenii ATCC 6633 ditumbuhkan dalam media Subtilis, yaitu media racikan yang terdiri dari : *yeast extract, beef extract, peptone, bacto agar*.

Standar antibiotika

Stok solution Sulfadiazin konsentrasi 1000 µg/ml dibuat dengan cara melarutkan sejumlah baku pembanding Sulfadiazin dalam 10% Metanol. Larutan baku kerja dibuat dengan pengenceran bertingkat dengan pelarut Destilate Water (DW) dengan konsentrasi 10, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, dan 0.125 µg.ml⁻¹.

Stok Larutan baku Trimetoprim

Larutan 1000 µg/ml dibuat dengan melarutkan sejumlah baku pembanding Trimetoprim dalam 50% Etanol. Larutan baku kerja Trimetoprim dibuat dengan mengencerkan stok larutan baku dengan DW hingga konsentrasi 50 µg.ml⁻¹.

Stok Larutan Konfirmasi PABA

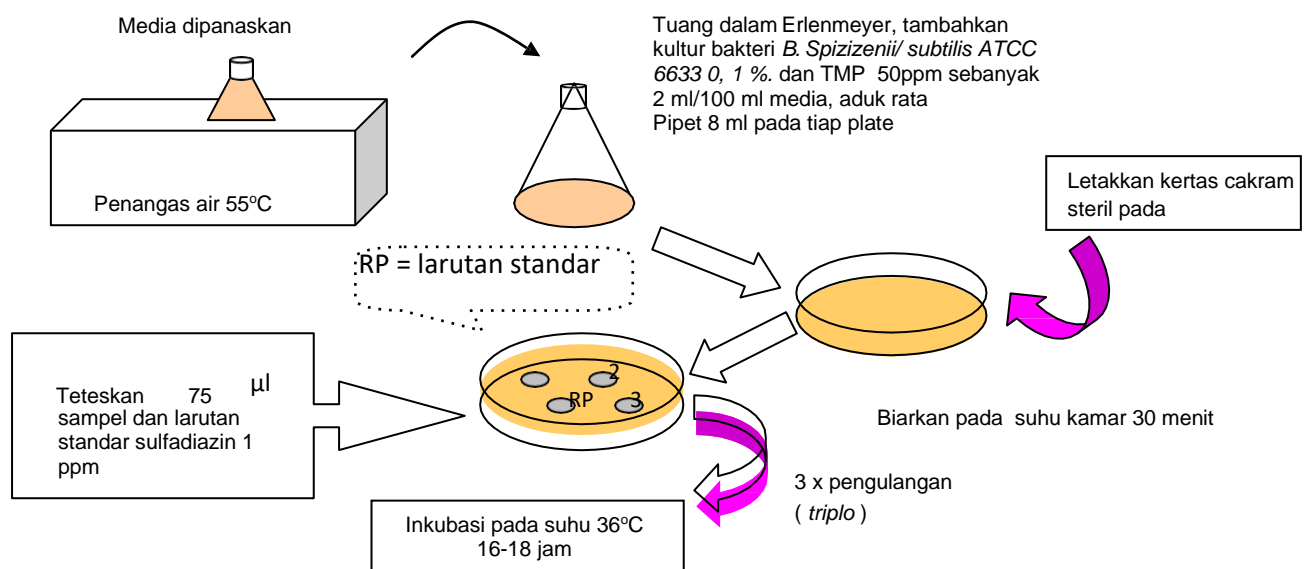
Larutan 1000 µg/ml dibuat dengan melarutkan sejumlah larutan konfirmasi PABA dalam DW steril. Seluruh stok standar disimpan di freezer.

Persiapan contoh

Contoh (daging, telur) ditimbang sebanyak 10 g, ditambahkan pelarut dapar fosfat no 2 sebanyak 20 ml, dihomogenkan dengan homogenizer kemudian disentrifus 3000 rpm selama 10 menit. Diambil supernatannya sebagai sampel negatif. Untuk sampel positif, diambil sebanyak 0,5 mL standar Sulfadiazin 10 µg/mL ditambahkan ke dalam 9,5 mL supernatan sampel.

Pelaksanaan Pengujian

Media agar Subtilis yang telah dibuat dicairkan dengan pemanasan, kemudian diletakkan pada penangas air hingga temperatur 55°C±1°C. Dituang dalam Erlenmeyer, ditambahkan kultur bakteri *B. Spizizenii/ subtilis* 0,1 %, diaduk rata. Lalu tambahkan 2 ml TMP 50 ppm/100 ml media. Dipipet 8 ml pada tiap plate. Diletakkan kertas cakram steril pada kultur media. Dibiarkan 30 menit pada suhu kamar. Ditetaskan 75 µl larutan standar sulfadiazine 1 ppm dan sampel. Tiap plate dibuat triplo. Satu plate ditetes PABA pada kertas cakram sampel dan kontrol positif. Lalu diinkubasi selama 6-18 jam pada suhu 36°C.



Gambar 1. Proses Pengujian Residu Antibiotik

Penentuan Hasil

Sampel dikatakan positif jika terbentuk daerah hambatan disekitar *paperdisc*, dan pada plate yang ditetesi larutan PABA tidak membentuk daerah hambatan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian validasi dilakukan di Laboratorium Residu Obat dan AMR, dilakukan pada parameter repeatability (sensitifitas dan spesifitas), reproduibilitas, limit deteksi, dan perbandingan metode.

Hasil *Repeatability* yaitu pengujian dilakukan oleh 2 analis dengan waktu, peralatan, dan tempat yang sama. Setiap analis melakukan pengujian sebanyak 10 kali ulangan untuk setiap sampel. Hasil uji analis terlihat pada Tabel 1 dan Tabel 3. Sedangkan jumlah data terkonfirmasi yang diperoleh dari hasil uji dua analis terlihat pada Tabel 2 dan Tabel 4.

Tabel 1. Hasil uji kualitatif skrining residu Sulfonamida Analis 1

Sampel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabel 2. Jumlah data terkonfirmasi yang diperoleh dari hasil uji Analis 1

	Presumptive	
	Positif	Negatif
Positif	10 (A) (positif)	0 (B) (false negatif)
Negatif	0 (C) (false positif)	10 (D) (negatif)

$$\begin{aligned}
 1) \text{ Sensitifitas} &: \frac{A}{(A+B)} \times 100\% = \frac{10}{(10+0)} \times 100\% = \mathbf{100\%} \\
 2) \text{ Spesifitas} &: \frac{D}{(C+D)} \times 100\% = \frac{10}{(0+10)} \times 100\% = \mathbf{100\%} \\
 3) \text{ False positif} &: \frac{C}{(A+C)} \times 100\% = \frac{0}{(10+0)} \times 100\% = \mathbf{0\%} \\
 4) \text{ False negatif} &: \frac{B}{(B+D)} \times 100\% = \frac{0}{(0+10)} \times 100\% = \mathbf{0\%} \\
 5) \text{ Effisiensi} &: \frac{(A+D)}{n} \times 100\% = \frac{(10+10)}{20} \times 100\% = \mathbf{100\%}
 \end{aligned}$$

Tabel 3. Hasil uji kualitatif skrining residu Sulfonamida Analis 2

Sampel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabel 4. Jumlah data terkonfirmasi yang diperoleh dari hasil uji Analis 2

	Presumptive	
	Positif	Negatif
Positif	10 (A) (positif)	0 (B) (false negatif)
Negatif	0 (C) (false positif)	10 (D) (negatif)

$$\begin{aligned}
 1) \text{ Sensitifitas} &: \frac{A}{(A+B)} \times 100\% = \frac{10}{(10+0)} \times 100\% = \mathbf{100\%} \\
 2) \text{ Spesifitas} &: \frac{D}{(C+D)} \times 100\% = \frac{10}{(0+10)} \times 100\% = \mathbf{100\%} \\
 3) \text{ False positif} &: \frac{C}{(A+C)} \times 100\% = \frac{0}{(10+0)} \times 100\% = \mathbf{0\%}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 4) \text{ False negatif} &: \frac{(A+C)}{B} \times 100\% = \frac{(10+0)}{0} \times 100\% = \mathbf{0\%} \\
 5) \text{ Efisiensi} &: \frac{(B+D)}{(A+D)} \times 100\% = \frac{(0+10)}{(10+10)} \times 100\% = \mathbf{100\%}
 \end{aligned}$$

Dari Tabel 2 dan tabel 4, dapat dilihat hasil repeatability terhadap semua parameter uji (Sensitifitas, Spesifisitas, Efisiensi) analisis 1 dan analisis 2 adalah 100%, sedangkan hasil false positif dan false negative kedua analisis 0%. Hasil ini menunjukkan bahwa hasil uji kedua analisis sangat baik. Hasil *Reproducibility* yaitu data yang digunakan dalam perhitungan adalah gabungan data hasil uji dari 2 analisis yang terlihat pada tabel dibawah.

Tabel 5. Hasil uji kualitatif skrining residu Sulfonamida Analisis 1 dan Analisis 2

Confirmed	Presumptive	
	Positif	Negatif
Positif	20 (A) (positif)	0 (B) (false negatif)
Negatif	0 (C) (false positif)	20 (D) (negatif)

$$\begin{aligned}
 1) \text{ Sensitifitas} &: \frac{A}{(A+B)} \times 100\% = \frac{20}{(20+0)} \times 100\% = \mathbf{100\%} \\
 2) \text{ Spesifitas} &: \frac{D}{(C+D)} \times 100\% = \frac{20}{(0+20)} \times 100\% = \mathbf{100\%} \\
 3) \text{ False positif} &: \frac{C}{(A+C)} \times 100\% = \frac{0}{(20+0)} \times 100\% = \mathbf{0\%} \\
 4) \text{ False negatif} &: \frac{B}{(B+D)} \times 100\% = \frac{0}{(0+20)} \times 100\% = \mathbf{0\%} \\
 5) \text{ Efisiensi} &: \frac{(A+D)}{n} \times 100\% = \frac{(20+20)}{40} \times 100\% = \mathbf{100\%}
 \end{aligned}$$

Dari Tabel 5, dapat dilihat hasil reproducibility terhadap semua parameter uji (Sensitifitas, Spesifisitas, Efisiensi) gabungan kedua analisis 100%, sedangkan hasil false positif dan false negatif 0%. Hasil ini menunjukkan bahwa hasil uji adalah baik dan benar. Hasil dari Limit Deteksi yaitu pengujian limit deteksi pada 7 konsentrasi standar Sulfadiazin yaitu 10, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 µg/mL, dan diuji secara duplo.

Tabel 6. Hasil uji Limit deteksi uji Skrining residu Sulfonamida

KONSENTRASI STANDAR Sulfadiazin (µg/mL)	Plate	
	1	2
10	Positif	Positif
4	Positif	Positif
2	Positif	Positif
1	Positif	Positif
0,5	Positif	Positif
0,25	Positif	Positif
0,125	Negatif	Negatif

Tabel 6 menunjukkan bahwa konsentrasi terkecil standar sulfadiazin yang memberikan hasil positif adalah pada konsentrasi 0,25 µg/mL. Konsentrasi ini menjadi limit deteksi uji skrining Sulfonamida.

Perbandingan metode pengujian ini dilakukan dengan membandingkan hasil uji sampel yang sama dengan 2 metode berbeda, yaitu metode uji skrining dan metode ELISA kualitatif. Pengujian skrining dilakukan sesuai MU 7.2.2.12 Metode Uji Residu Sulfa Secara Uji Tapis, sedangkan pengujian ELISA sesuai MU 7.2.2.14 Metode Uji Residu Sulfonamid dengan ELISA.

Preparasi sampel dibuat dengan 3 konsentrasi. Sampel negatif pada sampel No. 1, 4, 7. Sedangkan untuk sampel positif dibuat dengan 2 konsentrasi, yaitu konsentrasi bawah 250 ppb dan konsentrasi atas 500 ppb. Konsentrasi bawah 250 µg/mL dibuat dengan melarutkan standar Sulfadiazin 10 µg/mL ke dalam 9,75 mL larutan sampel (supernatant daging/ telur dan susu), pada sampel No. 2,5, dan 8. Konsentrasi atas 500 µg/mL dibuat dengan melarutkan standar Sulfadiazin 10 µg/mL ke dalam 9.5 mL larutan sampel (supernatant daging/telur dan susu), pada sampel No. 3,6 dan 9.

Pengujian dengan metode skrining memberikan hasil positif atau negatif, sampel dikatakan positif jika terbentuk daerah hambatan disekitar *paperdisc*, dan pada *plate* yang ditetesi larutan PABA tidak membentuk daerah hambatan. Sedangkan metode ELISA memberikan hasil terdeteksi atau tidak terdeteksi. Jika nilai % B/B0 sampel lebih tinggi dari Kontrol Positif (B/B0>PC), sampel mengandung tingkat sulfonamida di bawah *detection capability* (CC β) untuk zat yang ada. Maka sampel di *judge* Tidak Terdeteksi. Jika nilai sampel B/B0 % lebih rendah dari Kontrol Positif (B/B0< PC), sampel diduga mengandung konsentrasi sulfonamida yang ada sama dengan atau lebih tinggi dari CC β . Maka sampel di *judge* Terdeteksi (Diana *et al.* 2011). Hasil pengujian kedua metode pada tabel 7 dibawah ini.

Tabel 7. Hasil Uji Perbandingan Metode Skrining Residu Sulfonamida dan metode ELISA kualitatif

No Sampel	Jenis Sampel	Hasil Uji Skrining			Hasil Uji ELISA		
		Mean RP* \pm SD (mm)	Mean IZ \pm SD (mm)	Judgement	% B/B0	% PC	Judgement
1	Daging ayam	18,4 \pm 0,2	-	Negatif	105,47	42,36	Tidak Terdeteksi
2	Daging ayam	18,4 \pm 0,2	14,2 \pm 1,0	Positif	8,20	42,36	Terdeteksi
3	Daging ayam	18,4 \pm 0,2	11,5 \pm 0,8	Positif	10,43	42,36	Terdeteksi
4	Telur	18,6 \pm 0,3	-	Negatif	93,29	42,36	Tidak Terdeteksi
5	Telur	18,6 \pm 0,3	14,3 \pm 1,2	Positif	8,16	42,36	Terdeteksi
6	Telur	18,6 \pm 0,3	11,25 \pm 0,9	Positif	10,52	42,36	Terdeteksi
7	Susu	18,2 \pm 0,2	-	Negatif	98,5	42,36	Tidak Terdeteksi
8	Susu	18,2 \pm 0,2	14,4 \pm 0,8	Positif	8,27	42,36	Terdeteksi
9	Susu	18,2 \pm 0,2	11,2 \pm 0,8	Positif	10,47	42,36	Terdeteksi

*RP=Reference point ; IZ = Inhibition Zone ; SD = Standar deviasi; % B/B0 = ; % PC = Positive Control

Pada Tabel 7 menunjukkan sampel nomor 1,4, 7 pada uji skrining menunjukkan hasil Negatif, dan pada uji ELISA menunjukkan hasil Tidak Terdeteksi. Sedangkan pada sampel nomor 2,3,5,6,8,9 pada uji skrining menunjukkan hasil positif, dan pada uji ELISA menunjukkan hasil Terdeteksi. Sehingga hasil pada uji skrining dan ELISA memberikan hasil yang sesuai.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil data validasi uji Skrining Residu Antibiotika Golongan Sulfonamida dapat disimpulkan *repeatability* Analisis 1 dan Analisis 2 terhadap semua parameter uji sangat baik (100%), sedangkan *reproducibility* kedua analisis 100 % baik dan benar. Limit deteksi skrining residu golongan Sulfonamida pada sampel daging ayam, telur dan susu adalah pada konsentrasi 0,25 µg/mL. Hasil data perbandingan uji Residu Sulfonamida menggunakan metode skrining (Uji Tapis) dengan hasil uji menggunakan metode ELISA tidak berbeda nyata. Maka dapat ditarik kesimpulan bahwa BPMSPH mampu melakukan pengujian residu Sulfonamida menggunakan *Microbial Screening Methods* golongan sulfonamida dengan valid.

DAFTAR PUSTAKA

- Badan Standardisasi Nasional. (2008). *Standar Nasional Indonesia (SNI) 7424 tentang Metode uji tapis (screening test) residu antibiotika pada daging, telur, dan susu secara bioassay*. Jakarta, Indonesia
- Diana, Francesca., Rosar, Giulia., Puppini, Barbara., Paoluzzi, Elisa. (2011). I'screen Sulfa QL: a new qualitative enzyme immunoassay for a rapid and sensitive detection of thirteen sulfonamides in food. *Conference: 5th International Symposium on Recent Advances In Food AnalysisAt: Prague, Czech Republic*
- [FDA] Food Drug Administration. (2021). *Summary report on antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals*. Spanyol.
- Ferrini, A.M., Mannoni V., Aureli, P. (2005). Combined Plate Microbial Assay (CPMA): A 6-plate-method for simultaneous first and second level screening of antibacterial residues in meat. *Food Additives and Contaminants*, January 2006; 23(1): 16–24
- Gale, E.F., Cundliffe, E., Reynolds, P.E., Richmond, M.H., Waring, M.J. (1972). *The Molecular Basis of Antibiotic Action, 2nd edition*. London: Wiley.
- Gaudin, V., Maris, P., Fuselier, R., Ribouchon, J.L., Cadieu, N. and Rault, A. (2004) Validation of a microbiological method: the STAR protocol, a five-plate test, for the screening of antibiotic residues in mil. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 21, No. 5 (May 2004), pp. 422–433
- Gaudin, V., Hedou, C., Rault, A., Verdon, E. (2010). Validation of a Five Plate Test, the STAR protocol, for the screening of antibiotic residues in muscle from different animal species according to the European decision 2002/657/EC. *Food Additives and Contaminants*, Vol 27, 07 (2010) 935-952"
- Kozarova, I., Janasova, J., Mate, D., Pipova, M., Jevinova, P. (2005). Utilisation of para-aminobenzoic acid (PABA) for the presumptive identification of sulphadimidine at its residue screening by using the microbiological four-plate test. *Bulletin Veterinary Institute in Pulawy*, Vol. 49, 59-64.
- Louisia, M., et al. (2015). Screening for antibiotic residues in swine and poultry tissues using the STAR test. *Int J Food Safety, Nutrition and Public Health*, Vol. 5, No. 2
- Mercer, M.A. (2022). *Sulfonamides and Sulfonamide Combinations Use in Animals*. Virginia Maryland College of Veterinary Medicine, USA.
- Mitchell, J. M., Griffiths M. W., Mcewen S. A., McNab W. B., And Yeei A. J. (1998). Antimicrobial Drug Residues in Milk and Meat: Causes, Concerns, Prevalence, Regulations, Tests, and Test Performance. *Journal of Food Protection*, Vol. 61, No.6, Pages 742-756
- [POH] Substansi Pengawasan Obat Hewan Direktorat Kesehatan Hewan.. (2023). Laporan Perkembangan Pelaksanaan Kegiatan Surveilans AMR-AMU di Bidang Peternakan dan Kesehatan Hewan. Bogor, Indonesia.
- Russel, A.D., Ahonkhai, I., Rogers, D.T. (1979). Microbiological applications of the inactivation of the antibiotics and other antimicrobial agents. *Journal of Applied Bacteriology*. 46:207–245.
- Smither, R., Vaughan, D.R. (1978). An improved electrophoretic method for identifying antibiotics with special reference to animal tissues and animal feeding stuffs. *Journal of Applied Bacteriology* 44:421–429.

Validasi Metode Identifikasi DNA Anjing (*Canis Familiaris*) Menggunakan Metode *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (qPCR)

Muamar Aziz Akbar¹, Puji Rahayu^{2*}

¹ Program Sarjana Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

² Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

*Email korespondensi : puji_latif@yahoo.co.id

ABSTRACT

The consumption of dog meat in Indonesia is mostly related to certain ethnicities or regions, such as the Batak Karo and Batak Toba ethnic groups in North Sumatra and the Minahasa ethnicity in North Sulawesi. This study aimed to determine the method's validity in testing the identification of dog DNA in food of animal origin. Samples as positive control were the mixture of dog meat and chicken meat (1:9) and chicken meat as negative control. The examination on validation of DNA dog was conducted using *real-time polymerase chain reaction* (*real-time* PCR) with SYBYR green melting curve analysis. The test parameters used included repeatability, reproducibility, limit of detection, and specificity. The research on repeatability parameters showed that the positive samples were all amplified, while the negative samples were not. Testing the *t* value against the *Ct* and *Tm* values in the reproducibility test showed no significant difference in detecting dog DNA from the two repetitions using *Real-Time* PCR. The limit limit for dog DNA detection was 0.03125% and there was no cross-reaction in testing for its specificity. *Real-Time* PCR can be used as a testing method for identifying dog DNA in food products of animal origin.

Kata kunci : DNA anjing; halal; *real-time* PCR; validasi.

PENDAHULUAN

Saat ini daging anjing dapat ditemukan pada menu makanan di beberapa negara seperti Cina, Vietnam (Podberscek 2007), Korea Selatan (Podberscek 2007; Oh dan Jackson 2011), Filipina (Tan 2007), dan Indonesia (Weichart 2004). Kasus konsumsi daging anjing di Indonesia menjadi sangat menarik karena tingginya heterogenitas penduduk Indonesia dalam hal suku bangsa, sangat berbeda dengan masyarakat Korea Selatan yang relatif homogen (Podberscek 2009). Konsumsi daging anjing di Indonesia banyak dikaitkan dengan etnis ataupun wilayah tertentu. Sumatera Utara memiliki etnis Batak yang beragam. Batak Toba dan Batak Karo terkenal karena kegemaran mengonsumsi daging anjing. Di Sulawesi Utara praktik konsumsi daging anjing berasal dari etnis Minahasa (Weichart 2004), namun saat ini praktik tersebut tersebar luas di seluruh nusantara karena konsumen daging anjing tidak hanya berasal dari etnis tertentu saja. Banyaknya jumlah anjing yang tersedia, membuat daging anjing berpotensi dicampurkan ke produk pangan asal hewan. Hal tersebut menjadi masalah serius bagi penganut agama Islam terkait dengan halalnya suatu makanan. Daging babi dan hewan karnivora seperti singa, harimau, anjing, kucing, dan burung pemangsa (elang, alap-alap, osprey) adalah daging yang dilarang untuk dikonsumsi (Khattak *et al.* 2011).

Upaya dalam penjaminan pangan asal hewan dilakukan dengan cara pengembangan metode untuk identifikasi spesies terkait pemalsuan dan kehalalan suatu produk hewan. Salah satu metode uji yang digunakan saat ini untuk mendeteksi keberadaan daging dari spesies tertentu adalah DNA *hybridization* (Ballin *et al.* 2009). Metode analisis berdasarkan DNA, salah satunya adalah *polymerase chain reaction* (PCR). PCR merupakan metode identifikasi makhluk hidup yang cukup sensitif dan keakuratannya tinggi. Hal ini disebabkan karena setiap spesies memiliki sekuens DNA khasnya sendiri. Proses PCR dilakukan dengan cara melipatgandakan sekuens nukleotida tertentu secara eksponensial dengan jumlah kelipatan hingga jutaan salinan melalui *in vitro* (Bottero dan Dalmaso 2011). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan validitas metode dalam pengujian identifikasi DNA anjing pada produk pangan asal hewan.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan adalah *gloves*, pinset, gunting, cawan petri, timbangan digital, plastik sampel, *mini tube* ukuran 1,5 dan 2 mL, rak tabung, mikropipet volume 10-100 µL dan 100-1000 µL, master mix, *minispinner*, *highspeedcentrifuge*, *thermomixer*, *spiral mixer machine*, dan *real-time thermal cycler Rotor-Gene Q*.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daging anjing dan daging ayam, komersial ekstraksi *DNeasy Mericon Food Kit* (Qiagen) meliputi *lysis buffer*, proteinase K, *binding buffer*, *pre-*

wash buffer, wash buffer, elution buffer, etanol 99,8%, chloroform buffer PB, buffer AW2, buffer EB, kit komersial master mix *Sybr Select real-time PCR Kit*, *nuclease free water* (Qiagen) dan primer spesifik DNA anjing 5'-CTC CTC TTG TGT AGT TAA GTT AAT CTG-3' (*forward*) dan 5'-AAT TGA ATC GGG CCA TGA A-3' (*reverse*), serta terdapat DNA tikus, DNA sapi, DNA kambing, DNA babi ternak, DNA domba, untuk pengujian spesifisitas.

Penyiapan sampel uji

Sampel yang digunakan adalah otot bagian kaki dan dada anjing serta otot dada dari ayam. Sampel daging dihaluskan hingga sesuai standar dari *Dneasy Mericon Food Kit*. Berat daging yang dicampurkan untuk setiap sampel berbeda sesuai dengan perlakuan uji. Berat maksimal satu sampel adalah 10 g. Setelah daging halus, dilakukan penimbangan dengan menggunakan timbangan digital dengan skala 0,02 g dan neraca analitik. Kontrol positif dibuat dari 1 g daging anjing dan 9 g daging ayam, sedangkan kontrol negatif berisi 100% daging ayam sebanyak 10 g. Selanjutnya dilakukan penimbangan terhadap tiap sampel kontrol tersebut untuk diambil sebanyak 2 g dan dimasukkan kedalam *mini tube* (2 mL). Perbandingan jumlah antara daging anjing dan daging ayam dalam tiap sampel LOD dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Perbandingan jumlah antara daging anjing dan daging ayam pada sampel LOD

Sampel	Daging anjing	Daging ayam	Jumlah
LOD 1	1 %	99 %	2
LOD 2	0,5 %	99,5 %	2
LOD 3	0,25 %	99,75 %	2
LOD 4	0,125 %	99,875 %	2
LOD 5	0,0625 %	99,9375 %	2
LOD 6	0,0312 %	99,9688 %	2
LOD 7	0,0156 %	99,9844 %	2

LOD = *limit of detection*

Ekstraksi DNA

Sampel daging diekstraksi sesuai prosedur standar dari *Dneasy Mericon Food Kit*. Sebanyak 0,2 g sampel daging dimasukan ke dalam 2 ml *centrifuge tube*, ditambahkan 1 mL *food lysis buffer* dan 2,5 µL *proteinase K solution*. Sampel dihomogenkan menggunakan *spiral mixer machine* kurang lebih 15 detik, kemudian sampel diinkubasi pada *thermomixer* selama 30 menit pada suhu 60 °C dengan kecepatan 1000 rpm. Setelah diinkubasi sampel dikeluarkan dan didinginkan pada suhu ruang (15 °C-25 °C) lalu disentrifus kembali selama 5 menit dengan kecepatan 6100 rpm. Hasil sampel kemudian diambil 700 µL cairan supernatan dan dipindahkan ke dalam 2 mL tabung *microcentrifuge* yang sebelumnya telah diberi 500 µL chloroform. Sentrifuse *receiver tube* dengan spin filter pada 14.000 rpm selama 15 menit. Tambahkan 350 µL buffer PB ke dalam 2 mL tabung *microcentrifuge* baru, lalu ditambahkan sampel yang sudah disentrifus selama 15 menit sebanyak 350 µL, kemudian campur menggunakan *spiral mixer machine* selama 15 detik. Pindahkan sampel ke dalam 2 mL tabung *QIAquick spin column*, lalu disentrifus selama 2 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Setelah disentrifus, debris pada bagian bawah tabung dibuang lalu tambahkan 500 µL buffer AW dan disentrifuge kembali selama 2 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Sampel dipindahkan ke dalam 2 mL tabung *microcentrifuge* dan ditambahkan 150 µL *elution buffer*, inkubasi dalam suhu ruang selama 1 menit dan disentrifus selama 2 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Setelah disentrifus, sampel DNA yang telah diekstrak dapat digunakan untuk proses amplifikasi.

Pengujian Sampel Menggunakan Real-Time PCR

Proses amplifikasi diawali dengan penambahan *master mix* PCR menggunakan *Dog 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) 50 °C selama 2 menit, denaturasi 95 °C selama 30 detik, *annealing* 60 °C selama 30 detik dan *elongation/extension* 72 °C selama 20 detik, dengan siklus sebanyak 45 kali, *melting point* pada suhu 65 °C-95 °C selama 1 menit 30 detik pada tahap pertama dan 5 detik pada tahap selanjutnya (*Applied Biosystem*). Deteksi *melting curve* target menggunakan pewarna SYBR Green.

Analisis Data

Pengujian metode validasi dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan 4 parameter, yaitu *repeatability*, *reproducibility*, batas deteksi (*limit of detection*), dan spesifisitas (*specificity*). Interpretasi hasil positif uji *repeatability* dan uji spesifisitas adalah apabila sampel DNA menunjukkan adanya amplifikasi pada *detection system* dengan nilai *cycle threshold* (Ct) <45 dan menunjukkan nilai *melting temperature* (Tm) yang sama dengan *melt temperature* kontrol positif. Hasil dinyatakan negatif apabila sampel DNA tidak menunjukkan adanya amplifikasi pada *detection system* dan nilai

melting curve yang berbeda dengan kontrol positif. Pada parameter *reproducibility*, nilai p didapatkan dengan menggunakan perhitungan sederhana pada *analysis tools Microsoft excel*. Nilai $p > 0,05$ menyatakan tidak terdapat perbedaan secara nyata dalam mendeteksi DNA anjing pada sampel dengan dua kali pengulangan. Uji limit deteksi (LOD) dapat ditentukan dengan melihat nilai terendah LOD yang masih terdeteksi pada alat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji *Repeatability*

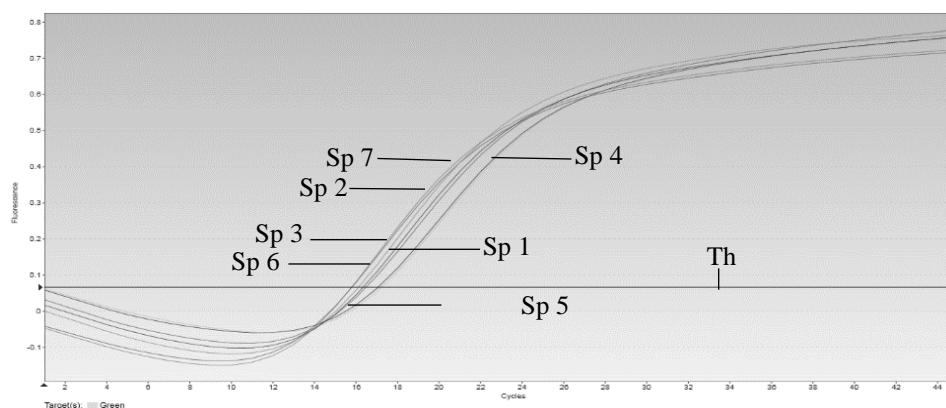
Uji *repeatability* dievaluasi dari 7 sampel DNA positif dan 7 sampel DNA negatif. Kelompok sampel positif menggunakan daging anjing, dan sampel negatif menggunakan daging ayam. Hasil uji *repeatability* dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Hasil uji *repeatability* menggunakan *Real-Time PCR*

Jenis Sampel	No. Sampel	Ct	Tm
Sampel Positif	Sampel 1	10,84	82,8
	Sampel 2	9,95	83,0
	Sampel 3	10,52	83,0
	Sampel 4	11,61	83,3
	Sampel 5	12,32	83,3
	Sampel 6	10,70	83,0
	Sampel 7	9,86	83,3
Rataan Ct/Tm \pm SD		10,828 \pm 0,8156	83,1 \pm 0,185
Min-Max Ct/Tm		9,86-12,32	82,8-83,3
Sampel Negatif	Sampel 1	No Ct	No Tm
	Sampel 2	No Ct	No Tm
	Sampel 3	No Ct	No Tm
	Sampel 4	No Ct	No Tm
	Sampel 5	No Ct	No Tm
	Sampel 6	No Ct	No Tm
	Sampel 7	No Ct	No Tm
Rataan Ct/Tm \pm SD		-	-
Min-Max Ct/Tm		-	-

Keterangan: Ct = *cycle threshold value*, terjadi amplifikasi; Tm = *temperature melting*, terjadi amplifikasi; SD = standar deviasi; Min = nilai terkecil; Max = nilai terbesar; No Ct = tidak terjadi amplifikasi; No Tm = tidak terjadi amplifikasi

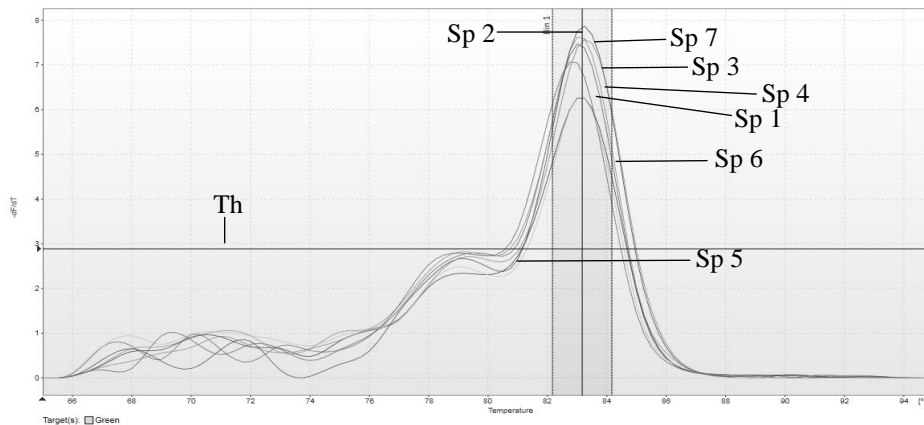
Berdasarkan Tabel 2, dapat terlihat bahwa sampel positif menunjukkan adanya amplifikasi secara keseluruhan. Rentang nilai Ct dan Tm dari amplifikasi tersebut menunjukkan perbedaan yang relatif kecil. Kelompok sampel positif teramplifikasi dengan rataannya sebesar 10,828, sedangkan sampel negatif tidak menunjukkan adanya proses amplifikasi sehingga tidak ada nilai Ct dan Tm yang dihasilkan. Kurva amplifikasi sampel positif secara keseluruhan dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kurva amplifikasi DNA *Real-Time PCR* hasil uji *repeatability*. Sp1 = sampel positif 1; Sp2 = sampel positif 2; Sp3 = sampel positif 3; Sp4 = sampel positif 4; Sp5 = sampel positif 5; Sp6 = sampel positif 6; Th = *baseline threshold*.

Selanjutnya dilakukan analisis menggunakan *melting curve analysis* dengan melihat nilai *melting temperature* (Tm) dari hasil yang telah didapatkan. Proses analisis cukup dengan menggunakan *Melting Curve Analysis* (MCA) tanpa perlu dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa (Atlas dan Bej 1994). Rataan Tm yang didapatkan adalah 83,1 °C dengan nilai *temperature melting* terendah adalah 82,8°C dan nilai tertinggi 83,3°C dengan toleransi $\pm 1^\circ\text{C}$.

Proses amplifikasi pada Gambar 1 menunjukkan ketujuh kurva mengalami kenaikan yang tidak terlalu berbeda. Salah satu penyebab dekatnya nilai Ct yang dihasilkan adalah jumlah DNA pada sampel yang relatif sama sehingga waktu amplifikasinya akan bersamaan. Selain dengan melihat nilai Ct, penentuan hasil positif juga perlu memperhatikan *peak melt curve*. *Peak melt curve* dengan analisis *melting curve* pada akhir pengujian *real-time* PCR berguna untuk membedakan satu DNA dengan DNA yang lainnya (Pestana *et al.* 2010). Kurva *melting curve* dari pengujian *repeatability* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kurva *melt curve* *real-time* PCR uji *repeatability*. Sp1 = sampel positif 1; Sp2 = sampel positif 2; Sp3 = sampel positif 3; Sp4 = sampel positif 4; Sp5 = sampel positif 5; Sp6 = sampel positif 6; Th = *baseline threshold*.

Melt peak yang hampir sama pada Gambar 2 disebabkan karena DNA primer yang digunakan merupakan DNA primer yang spesifik terhadap sampel. Penelitian ini menggunakan pelacak yang berikatan dengan DNA (DNA *binding dyes*) yaitu dengan menggunakan SYBR *green*. SYBR *green* merupakan pelacak yang berikatan dengan DNA untai ganda yang non-spesifik tetapi tidak berikatan dengan DNA untai tunggal. Pelacak SYBR *green* memberikan fluoresensi dengan intensitas yang cukup tinggi saat berikatan dengan DNA untai ganda (Pestana *et al.* 2010).

Reproducibility

Pengujian *reproducibility* ini dilakukan terhadap sampel dengan dua penguji/analisis. Pengujian ini dilakukan dengan mencari nilai p melalui uji t terhadap hasil dari dua pengujian. Hasil pengujian dari kedua analisis dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3 Uji t terhadap nilai *cycle threshold* (Ct) DNA anjing dengan *real-time* PCR

Jenis Sampel	% positif teramplifikasi	Rataan Ct \pm SD	Min-Max Ct	Nilai p
Analisis 1	100	10,83 \pm 0,82	9,86-12,32	0,3003
Analisis 2	100	10,62 \pm 0,45	10,04-11,46	

p > 0,05 tidak berbeda nyata

Persentase teramplifikasinya seluruh DNA pada sampel dari kedua analisis adalah 100%. Nilai *cycle threshold* (Ct) hasil analisis 1 sebesar 10,82, sedangkan pada analisis 2 sebesar 10,62. Nilai p yang didapatkan dari analisis perhitungan menggunakan *Microsoft Excel* adalah sebesar 0,3003. Hasil ini menunjukkan bahwa tidak adanya perbedaan yang nyata dalam pengujian oleh kedua analisis (p>0,05). Nilai Ct pada analisis 1 berkisar antara 9,8-12,3 dan pada analisis 2 berkisar antara 10-11,4. Perbedaan rentang nilai Ct yang tidak terlalu jauh dipengaruhi oleh jumlah materi genetik sampel pada tiap tabung, metode dan kit komersial yang digunakan. Selain itu uji t dilakukan pula terhadap nilai *melting temperature* (Tm). Hasil pengujiannya dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Uji t terhadap nilai *melting temperature* (Tm) DNA anjing dengan *melting curve analysis*

Jenis Sampel	n	% Genotype	Rataan Tm \pm SD	Min-Max Tm	Nilai p
Analisis 1	7	100% Anjing	83,1 \pm 0.185	82,8-83,3	0,1891
Analisis 2	7	100% Anjing	83,01 \pm 0.135	82,8-83,3	

p > 0,05 tidak berbeda nyata

Uji t terhadap nilai Tm menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) dalam mendeteksi DNA anjing pada dua pengujian dengan menggunakan metode *Real-Time* PCR. Pengujian 1 memiliki rata-rata sebesar 83,1 dan pengujian 2 sebesar 83,01 dengan nilai rentang Tm yang sama yaitu antara 82,8 sampai 83,3. Hasil dianalisis menggunakan *melting curve analysis* (MCA). *Melting curve analysis* (MCA) pada *Real-Time* PCR dapat membedakan produk yang spesifik dengan produk non-spesifik. Jika hanya dihasilkan satu *melting curve* pada hasil amplifikasi DNA, maka primer dapat dikatakan spesifik.

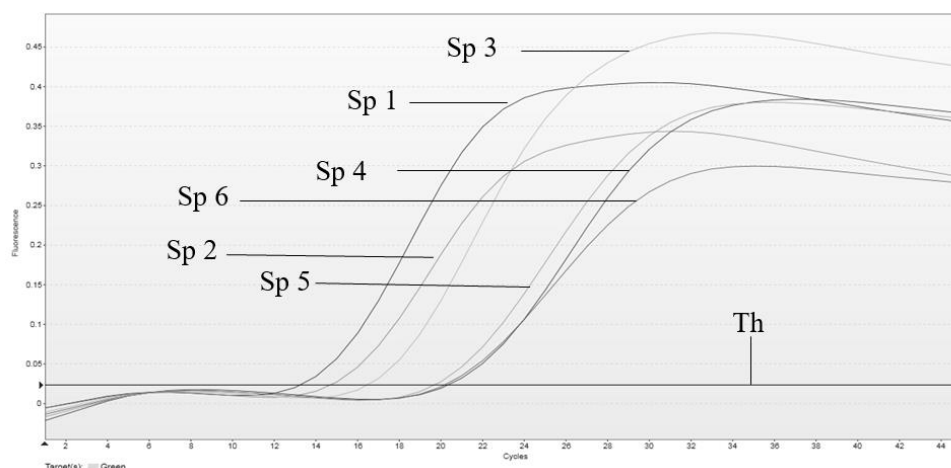
Deteksi Limit/LOD pengujian

Jumlah sampel dalam penentuan limit deteksi yang digunakan sebanyak 7 sampel dengan dilakukan dua kali pengujian. Hal ini dilakukan agar hasil yang didapatkan lebih akurat. Hasil dari pengujian LOD dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Deteksi limit/LOD pengujian

Nilai LOD	Ct	Tm
1%	13,35	82,0
0,5%	14,8	82,3
0,25%	16,56	82,3
0,125%	19,78	82,5
0,0625%	20,44	82,8
0,03125%	24,85	83,0
0,015625%	No Ct	No Tm

Hasil analisa menunjukkan bahwa nilai limit deteksi untuk PCR spesifik anjing adalah sebesar 0,03125%. Pengujian sampel dengan metode *Real-Time* PCR menunjukkan kesensitivan dalam mendeteksi DNA anjing sampai konsentrasi 0,03125%. Hasil tersebut dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kemurnian DNA hasil ekstraksi, ketepatan pemilihan primer yang digunakan serta ketepatan kondisi reaksi PCR. Kurva pengujian deteksi limit dapat dilihat pada Gambar 3.

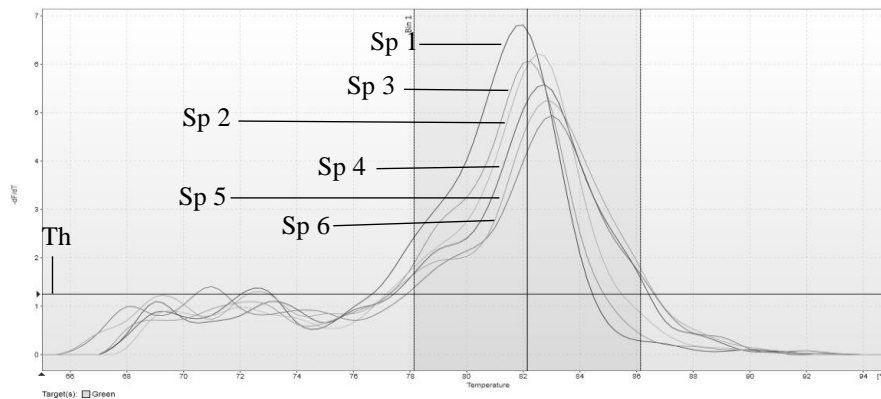


Gambar 3. Kurva amplifikasi DNA uji limit deteksi. Sp1 = sampel positif 1; Sp2 = sampel positif 2; Sp3 = sampel positif 3; Sp4 = sampel positif 4; Sp5 = sampel positif 5; Sp6 = sampel positif 6; Th = *baseline threshold*.

Ketepatan pemilihan primer juga berpengaruh untuk mendapatkan limit deteksi dengan konsentrasi yang rendah. Primer merupakan bagian penting dalam reaksi amplifikasi DNA karena merupakan inisiator pada sintesis DNA. Ketepatan kondisi pada reaksi PCR merupakan faktor utama dalam menentukan keberhasilan suatu reaksi PCR. Ketepatan kondisi reaksi ditentukan oleh

ketepatan campuran reaksi dan ketepatan kondisi suhu pada masing-masing siklus (Lelana *et al.* 2002).

Hasil analisis pengujian dengan limit deteksi dapat diperkuat dengan melihat kurva *melt curve* pada Gambar 4.



Gambar 4. Kurva *melt curve* real-time PCR uji limit deteksi. Sp1 = sampel positif 1; Sp2 = sampel positif 2; Sp3 = sampel positif 3; Sp4 = sampel positif 4; Sp5 = sampel positif 5; Sp6 = sampel positif 6; Th = *baseline threshold*.

Terlihat pada gambar tersebut *melt peak* sampel 1-6 terjadi pada suhu (T_m) yang hampir sama. Perbedaan ketinggian dan suhu *melt peak* disebabkan karena konsentrasi DNA pada tiap tabung tidak sama. Semakin tinggi konsentrasi DNA pada tabung, maka *melt peak* dari sampel tersebut akan semakin tinggi. Hal ini disebabkan karena semakin banyaknya produk hasil amplifikasi yang terdeteksi.

Spesifisitas

Uji spesifisitas bertujuan untuk mengetahui spesifisitas dari primer spesifik untuk mengkonfirmasi apakah ada kemiripan ataupun reaksi silang dengan DNA non spesifik dari primer yang digunakan. Hasil pengujian spesifisitas dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil uji spesifisitas		
DNA	Ct	Tm
Ayam	No Ct	No Tm
Kambing	No Ct	No Tm
Kerbau	No Ct	No Tm
Sapi	No Ct	No Tm
Babi	No Ct	No Tm

Berdasarkan Tabel 6 terlihat nilai Ct (*cycle threshold*) dan nilai Tm (*melting temperature*) tidak terbentuk pada pengujian dengan sampel DNA ayam, kambing, kerbau, sapi, dan babi. Hal ini disebabkan karena primer yang digunakan adalah primer spesifik terhadap anjing. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tidak terjadi reaksi silang ataupun ikatan dengan sekuens dari nukleotida gen target, serta kontaminan yang mungkin berada dalam sampel.

SIMPULAN

Berdasarkan uji *repeatability*, *reproducibility*, spesifisitas, dan LOD, pemeriksaan dengan metode Real-Time PCR memiliki validitas yang baik untuk mengidentifikasi keberadaan campuran daging anjing di dalam daging ayam. Metode uji ini bahkan mampu mendeteksi campuran tersebut hingga konsentrasi yang sangat rendah (0,03125%). Hal ini menunjukkan metode *real-time* PCR dapat digunakan untuk keperluan pengujian dalam kasus pemalsuan dengan mencampurkan daging anjing ke dalam daging ayam.

Metode Real-Time PCR yang telah divalidasi pada penelitian ini perlu didiseminasikan ke laboratorium yang memiliki tugas dan fungsi terkait di Indonesia agar dapat digunakan untuk mendeteksi pemalsuan daging anjing pada pangan asal hewan yang beredar di masyarakat.

DAFTAR PUSTAKA

- Atlas RM, Bej AK. 1994. Polymerase chain reaction. Di dalam Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR, editor. *Method for General and Molecular Bacteriology*. Washington DC (DC): American Society for Microbiology. hlm 418-435.
- Ballin NZ, Vogensen FK, Karlsson AH. 2009. Species determination – Can we detect and quantify meat adulteration?. *Meat Sci*. 83(2):165-174. doi: [10.1016/j.meatsci.2009.06.003](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.06.003).
- Bottero MT, Dalmaso A. 2011. Review animal species identification in food products: evolution of biomolecular methods. *Vet J*. 190:34-38. doi: [10.1016/j.tvjl.2010.09.024](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.09.024).
- Khattak JZK, Mir A, Anwar Z, Wahedi HM, Abbas G, Khattak HZK, Ismatullah H. 2011. Concept of halal food and biotechnology. *Adv J Food Sci Technol*. 3(5):385-389.
- Lelana NE, Sutarno, Nita E. 2002. Identifikasi polimorfisme pada fragmen nd-5 dna mitokondria sapi benggala dan madura dengan teknik PCR-RFLP. *Biodiversitas*. 4(1):1-6. doi:10.13057/biodiv/d040101.
- Oh M, Jackson J. 2011. Animal rights vs. cultural rights: Exploring the dogmeat debate in South Korea from a world polity perspective. *J Intercult Stud*. 32 (1):31-56. doi: [10.1080/07256868.2010.491272](https://doi.org/10.1080/07256868.2010.491272).
- Pestana EA, Belak S, Diallo A, Crowther JR, Viljoen GJ. 2010. *Early Rapid and Sensitive Veterinary Molecular Diagnostics Real-time PCR Application*. Dordrecht: Springer Science & Bussiness Media.
- Podberscek AL. 2007. Animals as food: dogs and cats as food in Asia. Di dalam: Bekoff M, editor. *Encyclopedia of Human Animal Relationships: A Global Exploration of Our Connections with Animals*. Volume 1: Animal Assistance to Humans: Animal Assisted Intervension. Westport (CT): Greenwood Pr. hlm 24-34.
- Podberscek AL. 2009. Good to pet and eat: The keeping and consuming of dogs and cats in South Korea. *J Soc Issues*. 65(3):615–632. doi:10.1111/j.1540-4560.2009.01616.x.
- Tan ML. 2007. Animals as food: dog eating in the Philippines. Di dalam Bekoff M, editor. *Encyclopedia of Human Animal Relationships: A Global Exploration of Our Connections with Animals*. Volume 1: Animal Assistance to Humans: Animal Assisted Intervension. Westport (CT): Greenwood Press. hlm 23-24.
- Weichart G. 2004. Minahasa identity: a culinary practice. *Antropologi Indonesia*. Special volume: 55-74. doi: 10.7454/ai.v0i74.3583

Titik Kritis Pengujian *Total Plate Count* pada Sampel Pangan Asal Hewan di BPMSPH Bogor

Mohammad Gaody¹, Kanti Puji Rahayu², Ika Kartika Syarifah³

Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan (BPMSPH), Bogor¹

e-mail: gaodymohammad@gmail.com

ABSTRAK

Pengujian mikrobiologi pangan asal hewan merupakan salah satu upaya untuk menjamin keamanan pangan. Penetapan kriteria mikrobiologis pangan asal hewan diatur dalam Standar Nasional Indonesia (SNI). SNI terbaru mengenai kriteria mikrobiologis pangan asal hewan telah ditetapkan pada tahun 2023. Perubahan kriteria mikrobiologis ini menuntut adanya peningkatan kualitas pengujian mikrobiologi pangan asal hewan. Salah satu pengujian mikrobiologi pangan asal hewan yang penting adalah pengujian *Total Plate Count* (TPC). Pengujian TPC bertujuan untuk menentukan jumlah total mikroorganisme yang terdapat dalam suatu sampel. Pengujian TPC dilakukan di Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan (BPMSPH) Bogor. Studi ini bertujuan untuk mengidentifikasi titik kritis pengujian TPC pada sampel pangan asal hewan di BPMSPH Bogor. Penelitian ini menggunakan metode *Failure Mode and Effect Analysis* (FMEA). Hasil penelitian menunjukkan bahwa titik kritis pengujian TPC pada sampel pangan asal hewan di BPMSPH Bogor adalah sterilitas peralatan, pembuatan media, persiapan sampel, dan personel pengujian. Penelitian ini memberikan informasi penting mengenai titik kritis pengujian TPC pada sampel pangan asal hewan. Hasil penelitian ini dapat digunakan untuk meningkatkan kualitas pengujian TPC dan menjamin proses pengujian mutu pada produk pangan asal hewan.

Kata kunci :

Failure Mode and Effect Analysis; Titik kritis; Total Plate Count.

PENDAHULUAN

Standar Nasional Indonesia (SNI) 9159 tahun 2023 tentang kriteria mikrobiologis pangan asal hewan merupakan revisi dari SNI 01-6366-2000. SNI ini menetapkan definisi, kriteria mikrobiologis, cara pengambilan contoh, dan cara pengujian untuk pangan segar asal hewan dan pangan asal hewan yang sudah diolah yang masih berpotensi membawa agen penyakit hewan menular dan zoonosis. SNI merupakan acuan penting dalam mengatur kriteria mikrobiologis pangan asal hewan di Indonesia (BSN, 2023).

SNI terbaru mengenai kriteria mikrobiologis pangan asal hewan telah mengatur batasan jumlah TPC yang diperbolehkan dalam satu sampel pangan. Pengujian TPC merupakan metode yang digunakan untuk mengukur jumlah total mikroorganisme dalam satu sampel pangan. Hal ini dilakukan dengan mengisolasi dan menghitung koloni bakteri yang ada pada sampel tersebut. Pengujian ini memberikan informasi mengenai kebersihan dan kondisi sanitasi pangan tersebut (Fitriana, 2012). Tujuannya adalah untuk memastikan bahwa produk pangan asal hewan yang beredar aman dan memenuhi standar kualitas yang ditetapkan. Pengujian TPC dilakukan dengan menggunakan media pertumbuhan yang sesuai. Sampel pangan asal hewan biasanya ditempatkan pada media agar seperti Plate Count Agar. Media PCA ini baik untuk pertumbuhan semua jenis mikroba (Yonast, 2021). Setelah proses inkubasi, koloni-koloni mikroorganisme yang muncul akan dihitung dan hasilnya dinyatakan dalam satuan jumlah koloni per gram atau per mililiter sampel.

Hasil pengujian TPC harus dibandingkan dengan batasan yang ditetapkan oleh SNI terbaru mengenai kriteria mikrobiologis pangan asal hewan. Jika jumlah TPC dalam sampel melebihi batasan yang ditetapkan, maka pangan tersebut dianggap tidak memenuhi standar keamanan dan kualitas yang ditetapkan. Pengujian TPC merupakan bagian penting dari pengendalian mutu pangan (Fitriana, 2012). Dengan melakukan pengujian ini secara berkala, produsen pangan dapat memastikan bahwa produk mereka bebas dari kontaminasi mikroorganisme berbahaya. Selain itu, pengujian ini juga membantu produsen dalam menjaga kebersihan dan sanitasi produksi pangan serta mengidentifikasi masalah yang mungkin timbul dalam proses produksi. Pengujian ini juga memberikan gambaran mengenai kebersihan, sanitasi, dan keamanan pangan yang harus dijaga oleh produsen. Dengan mematuhi SNI terbaru, produsen dapat memastikan bahwa produk mereka memenuhi standar kualitas dan aman untuk dikonsumsi oleh masyarakat.

Pengujian TPC merupakan salah satu parameter penting dalam pengawasan mutu pangan asal hewan. Pengujian ini memiliki beberapa titik kritis yang perlu diperhatikan untuk mendapatkan hasil pengujian yang akurat. Oleh karena itu, agar mendapatkan hasil yang akurat dan terjamin, pengujian TPC harus memiliki keterampilan dan kompetensi yang sesuai dengan tata cara yang berlaku. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui dan memberi perhatian kepada titik kritis pengujian TPC, diharapkan

dapat meminimalisir kesalahan dalam melakukan pengujian TPC sehingga hasil yang didapat adalah hasil yang tepat, akurat, dan dapat dipertanggung-jawabkan.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode *Failure Mode and Effect Analysis* (FMEA). FMEA merupakan metode yang digunakan untuk mengidentifikasi potensi kegagalan dan efeknya pada suatu proses (Rina, 2020).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel *Failure Mode and Effect Analysis* (FMEA) adalah alat yang digunakan untuk mengidentifikasi dan mengevaluasi potensi kegagalan dalam suatu proses atau sistem (Rina, 2020). Tabel FMEA pengujian TPC dapat digunakan untuk mengidentifikasi potensi kegagalan dalam proses pengujian TPC, serta untuk menentukan dampak dan kemungkinan terjadinya kegagalan tersebut. Berikut adalah uraian tabel FMEA pengujian TPC:

Tabel 1. Tabel FMEA Pengujian TPC

Proses	Potensi Kegagalan	Keparahan	Kemungkinan	Tindakan Pencegahan	Efektivitas
Sterilisasi peralatan	Alat tidak steril	Sangat tinggi	Sangat tinggi	Pemilihan metode sterilisasi yang tepat	Tinggi
Pembuatan media	Autoklaf untuk pembuatan media malfungsi	Tinggi	Tinggi	Monitoring pada autoklaf dengan menggunakan sterikon	Tinggi
Transportasi dan penyiapan sampel	Sampel terkontaminasi	Tinggi	Tinggi	Pemilihan kemasan dan metode transportasi yang tepat	Tinggi
Personel Pengujian	Hasil pengujian tidak akurat	Tinggi	Tinggi	Preparasi sampel dengan metode yang baik dan benar Meningkatkan kompetensi penguji	Tinggi

Untuk memahami tabel FMEA, berikut adalah penjelasan singkat mengenai masing-masing kolom:

- Proses adalah tahapan-tahapan yang dilakukan dalam proses pengujian TPC pada sampel pangan asal hewan.
- Potensi Kegagalan adalah kemungkinan terjadinya suatu kegagalan pada proses tersebut.
- Keparahan adalah tingkat dampak yang ditimbulkan oleh kegagalan tersebut.
- Kemungkinan adalah tingkat kemungkinan terjadinya kegagalan tersebut.
- Tindakan Pencegahan adalah tindakan yang dapat dilakukan untuk mengurangi atau menghilangkan potensi kegagalan tersebut.
- Efektivitas adalah tingkat efektivitas tindakan pencegahan tersebut dalam mengurangi atau menghilangkan potensi kegagalan tersebut.

Berdasarkan Tabel 1, potensi kegagalan yang paling kritis adalah alat tidak steril dan pembuatan media yang tidak sesuai ketentuan. Hal ini dikarenakan alat yang tidak steril dapat menyebabkan kontaminasi bakteri patogen, sedangkan media yang tidak sesuai ketentuan dapat menyebabkan hasil pengujian tidak akurat. Tindakan pencegahan yang dapat dilakukan untuk mengurangi potensi kegagalan ini adalah dengan memilih metode sterilisasi, dan melakukan monitoring peralatan dan bahan yang digunakan untuk membuat media.

Potensi kegagalan yang lainnya juga perlu diperhatikan, seperti sampel terkontaminasi dan kompetensi penguji sehingga hasil pengujian menjadi tidak akurat. Tindakan pencegahan yang dapat

dilakukan untuk mengurangi potensi kegagalan ini adalah dengan memilih kemasan dan metode transportasi yang tepat, melakukan preparasi sampel dengan baik dan benar, serta meningkatkan kompetensi penguji. Tabel FMEA ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi potensi kegagalan dan tindakan pencegahan yang perlu dilakukan untuk meningkatkan kualitas pengujian TPC. Berikut adalah beberapa contoh tindakan pencegahan yang dapat dilakukan untuk mengurangi atau menghilangkan potensi kegagalan pada proses pengujian TPC:

1. Sterilisasi Peralatan

a. Metode Sterilisasi Basah

Menurut Wulandari et al. (2021), metode sterilisasi basah adalah metode yang dilakukan dengan menggunakan autoklaf dan dioperasikan dengan uap air di bawah tekanan. Metode ini digunakan terutama untuk sterilisasi media, cairan dan peralatan laboratorium. Peralatan laboratorium yang dapat disterilisasi menggunakan metode ini adalah sebagai berikut:

- Peralatan yang terbuat dari plastik berkualitas baik seperti *polypropylene*, *polymethylpentene*, *polyallomer*, *Tefzel*, *polytetrafluoroethylene* (PTFE), dan *Teflon FEP*.
- Peralatan yang terbuat dari kaca seperti botol kultur, gelas beker, dan pipet. Suhu dan tekanan standar yang dibutuhkan pada proses sterilisasi menggunakan autoklaf dilakukan pada suhu tinggi untuk periode waktu yang singkat lebih banyak digunakan dibandingkan dengan suhu yang lebih rendah untuk waktu yang lebih lama. Beberapa suhu atau tekanan standar yang digunakan adalah 115°C/10 psi, 121°C/15 psi, dan 132°C/27psi. Akan tetapi, pada umumnya suhu dan tekanan yang digunakan adalah 121°C/15 psi. Pengaturan waktu yang biasa digunakan dengan metode sterilisasi basah ini adalah 10–15 menit (Wulandari et al., 2021).

b. Metode Sterilisasi Kering

Oven pengering laboratorium merupakan peralatan yang digunakan dalam sterilisasi kering. Pada metode ini digunakan suhu yang sangat tinggi selama beberapa jam dengan tujuan untuk membunuh atau menghilangkan agen yang menjadi penyebab kontaminasi pada kultur jaringan (seperti spora jamur dan bakteri). Periode pemanasan oven untuk sterilisasi peralatan laboratorium dilakukan sekitar satu jam hingga suhu sterilisasi yang dibutuhkan telah tercapai. Rekomendasi temperatur dan lamanya waktu oven pengering laboratorium untuk sterilisasi peralatan laboratorium adalah suhu 160°C dibutuhkan waktu 45 menit, suhu 170°C dibutuhkan waktu 18 menit, suhu 180°C dibutuhkan waktu 7,5 menit, dan suhu 190°C dibutuhkan waktu 1,5 menit (Ikenganyia et al., 2017). Peralatan yang akan disterilisasi sebaiknya dibungkus terlebih dahulu. Pada cawan petri, dibungkus dengan menggunakan kertas yang tahan panas seperti pada gambar 1 kiri, sedangkan untuk peralatan gelas kaca, dibungkus pada bagian tutupnya menggunakan alumunium foil seperti pada gambar 1 kanan. Oven bekerja menggunakan proses konduksi panas dengan terlebih dahulu memanaskan permukaan bagian luar peralatan, kemudian menyerap panas dan memindahkannya ke bagian tengah alat tersebut. Menurut Wulandari et al. (2021), oven yang digunakan harus memiliki kipas yang terpasang di dalamnya dengan tujuan agar sirkulasi udara panas dapat berjalan dengan baik. Peralatan yang akan disterilisasi dianjurkan agar tidak terlalu banyak sehingga kinerja oven dapat maksimal. Metode sterilisasi kering biasanya digunakan pada peralatan laboratorium yang tidak dapat basah dan peralatan yang tidak akan meleleh, terbakar ataupun berubah bentuk jika terkena suhu tinggi. Peralatan yang terbuat dari kaca (*glassware*) seperti cawan petri, pipet, tabung reaksi, botol kultur dapat disterilisasi dengan metode ini.

2. Pembuatan Media

a. Autoklaf yang digunakan

Menurut Kurniawansyah (2014), sistem indikator biologis dirancang untuk memberikan validasi bahwa proses autoklaf berhasil membunuh mikroorganisme. Hal ini dicapai dengan menunjukkan keefektifan aktual pada spora bakteri, yang umumnya dianggap sulit untuk dibunuh. Secara khusus, spora *Geobacillus stearothermophilus* sangat tahan terhadap uap dan hidrogen peroksida yang diuapkan. Oleh karena itu, spora ini paling sering digunakan dalam uji indikator biologis. Spora *G. stearothermophilus* tidak aktif ketika terpapar pada suhu 121°C selama setidaknya 20 menit sehingga dapat digunakan sebagai indikator suhu yang dicapai maupun lamanya waktu suhu minimum bertahan. Jika sterilisasi berhasil, spora bakteri ini akan mati dan tidak akan dapat tumbuh (tetap berwarna ungu seperti pada gambar 2). Sebaliknya, jika sterilisasi gagal, spora bakteri ini akan tetap hidup dan tumbuh, sehingga menyebabkan perubahan warna pada indikator (menjadi berwarna kuning seperti pada gambar 2).



Gambar 1. Contoh sterilisasi kering pada cawan petri (kiri) dan sterilisasi glassware (kanan)



Gambar 2. Indikator autoklaf yang telah diuji

Selain indikator biologis, terdapat juga indikator kimia pada autoklaf (Syah, 2016). Indikator label kimia biasanya muncul pada selotip kertas berpererekat atau pada kantong sterilisasi, di mana area tersebut menjadi gelap setelah mencapai suhu tertentu untuk membentuk garis diagonal gelap dan mungkin menampilkan kata-kata, seperti "steril" atau "diautoklaf". Tanda-tanda ini hanya muncul jika selotip telah terpapar selama beberapa menit pada suhu dekontaminasi autoklaf normal. Indikator pita harus digunakan pada semua bahan yang didekontaminasi dengan autoklaf untuk menunjukkan bahwa bahan tersebut telah diproses. Pita autoklaf sepanjang tiga hingga empat sentimeter yang diletakkan di bagian luar wadah autoklaf, kantong, atau wadah individual sudah cukup. Jika selotip yang peka terhadap suhu tidak menunjukkan perubahan, dapat diartikan bahwa suhu minimal 121°C belum tercapai selama proses sterilisasi sehingga limbah biomedis dianggap belum didekontaminasi. Seperti pada gambar 3, *tape* yang belum disteril garisnya berwarna agak pudar sedangkan *tape* yang sudah melalui proses steril garisnya menjadi tebal menghitam.



Gambar 3. Indikator *tape* yang belum disteril (kiri) dan indikator *tape* yang sudah disteril (kanan)

b. *Distilled Water (DW)*

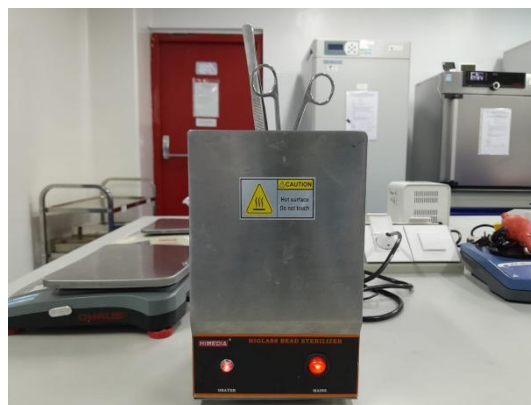
Kondisi DW pada saat sebelum membuat media harus selalu diperhatikan. Oleh karena itu, diperlukan adanya monitoring DW. Menurut BSN (2014), air yang digunakan untuk media kultur harus memenuhi persyaratan berikut:

- Kemurnian mikrobiologi: Air harus bebas dari mikroorganisme hidup, termasuk bakteri, jamur, dan virus. Kontaminasi mikroba tidak boleh melebihi 10^3 koloni/ml. Lebih disarankan untuk menggunakan air dengan kontaminasi mikroba di bawah 10^2 koloni/ml.
- Konduktivitas: Konduktivitas air harus tidak lebih dari $25 \mu\text{Scm}^{-1}$ (setara dengan resistivitas $\geq 0,04 \text{ M}\Omega\text{cm}$) pada 25°C . Konduktivitas yang tinggi dapat mengganggu pertumbuhan mikroorganisme tertentu.
- pH: pH air harus berada dalam kisaran 5,0-7,0 (d disesuaikan dengan kebutuhan dan petunjuk pembuatan media). pH yang tidak sesuai dapat mengganggu pertumbuhan mikroorganisme tertentu.

3. Persiapan sampel

a. Peralatan yang digunakan untuk pemotongan sampel

Peralatan logam selain dapat disterilisasi menggunakan api juga dapat disterilisasi dengan menggunakan *glass bead sterilizer*. Alat sterilisasi ini memiliki panas 275°C – 350°C sehingga mampu membunuh spora jamur dan bakteri yang menempel pada permukaan peralatan yang kita gunakan (Wulandari et al, 2021). Peralatan yang digunakan hanya perlu dimasukkan ke dalam manik-manik (*glass bead*) seperti pada gambar 4, kemudian didinginkan terlebih dahulu sebelum digunakan dengan aseptis dan steril. Untuk sampel padat seperti daging, dapat dilakukan pemotongan menggunakan gunting bedah yang tajam atau menggunakan scalpel. Sedangkan jika sampel cair seperti susu, apabila menggunakan pipet, pipet yang digunakan harus dalam keadaan yang sudah disteril dan satu pipet hanya bisa digunakan untuk satu sampel.



Gambar 4. Sterilisasi peralatan menggunakan *High Temperature Glass Bead Sterilizer*

b. Bekerja secara aseptis

Salah satu faktor penting dalam keberhasilan praktikum mikroorganisme adalah ketersediaan alat dan bahan yang steril yang dilakukan dalam ruang kerja yang aseptis. Pengertian dari teknik aseptis adalah suatu sistem cara bekerja yang menjaga sterilitas ketika menangani pengkulturan mikroorganisme untuk mencegah kontaminasi terhadap kultur mikroorganisme yang diinginkan (Baruno, 2021). Kelalaian dalam hal ini dapat menyebabkan hasil yang tidak akurat. Seperti contoh, tidak membersihkan meja dengan alkohol 70% sebelum bekerja, menggunakan gunting yang sama untuk memotong kemasan sampel dan sampel, ujung pipet tersentuh bagian yang bukan untuk pengujian (mengenai jas lab, lengan), tangan menyentuh bagian dalam sampel. Selain itu, plastik wadah yang digunakan untuk sampel juga harus disterilisasi terlebih dahulu menggunakan autoklaf agar plastik wadah yang digunakan tidak mengandung kontaminan.

c. Penyimpanan sampel dan transportasi sampel

Sampel yang didapatkan harus dilindungi dari kontaminasi luar yang dapat berasal dari udara, wadah sampel, dan peralatan sampel. Wadah sebaiknya berisi sampel tidak lebih dari tiga-perempatnya untuk mencegah kebocoran dari tutup dan dapat memudahkan dalam penghomogenan. Selain itu suhu juga sebaiknya dicatat saat pengambilan sampel dan saat kedatangan sampel di laboratorium. Sampel harus dikirimkan ke laboratorium sesuai aslinya tanpa dibuka. Jika sampel terlalu

besar atau dengan wadah yang terlalu lebar, maka pindahkan sebagian secara aseptik ke wadah sampel steril. Pemindahan sampel harus dilakukan sesegera mungkin dan dapat menjamin isi sampel berada dalam kondisi yang meminimalkan gangguan terhadap jumlah mikroorganisme di dalamnya. Sebaiknya tidak menggunakan es untuk mendinginkan sampel dalam boks karena air dapat mengkontaminasi sampel jika terdapat kebocoran atau wadah sampel yang sobek. Jika terpaksa menggunakannya, maka lebih baik memakai bungkus terpisah atau ganda. *Dry ice* dapat menjadi pilihan alternatif untuk menjaga suhu dingin tetapi tanpa adanya tetesan air (Pradhika, 2019).

4. Pengujian

a. Metode Pengenceran Bertingkat

Total Plate Count (TPC) dimaksudkan untuk menunjukkan jumlah mikroba yang terdapat dalam suatu produk dengan cara menghitung koloni bakteri yang ditumbuhkan pada media agar. Tambahkan 225 ml larutan *Buffered Peptone Water* (BPW) 0.1 % steril ke dalam kantong steril yang berisi sampel, homogenkan dengan stomacher selama 1 menit sampai dengan 2 menit (kecuali untuk contoh susu cair). Ini merupakan larutan dengan pengenceran 10^{-1} . Pindahkan 1 ml suspensi pengenceran 10^{-1} tersebut dengan pipet steril ke dalam larutan 9 ml BPW untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} . Buat pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} dan seterusnya dengan cara yang sama seperti pada sebelumnya, sesuai kebutuhan. Selanjutnya masukkan sebanyak 1 ml suspensi dari setiap pengenceran ke dalam cawan petri secara duplo (BSN, 2008). Vortex dengan sempurna yaitu dengan waktu 5-10 detik pada setiap pengenceran agar bakteri menjadi homogen sehingga diharapkan bakteri yang didapat mewakili pada setiap pengencerannya. BPW yang digunakan juga harus dipastikan steril dengan cara diinkubasi terlebih dahulu di inkubator 35°C selama kurang lebih 24 jam. Pada gambar 5, dapat terlihat bahwa BPW yang terkontaminasi menjadi keruh, sedangkan BPW yang masih steril tetap bening. Kontrol untuk pengencer dan media yang digunakan juga harus dibuat setelah selesai melakukan rangkaian pengujian.



Gambar 5. BPW yang sudah diinkubasi (kiri terkontaminasi, kanan bersih)

b. Teknik *Pipetting*

Berdasarkan ISO 6887:2017, pemindahan cairan saat pengenceran sebaiknya menggunakan pipet ukur 1 ml dan 10 ml dengan skala 0,1 ml dan 0,5 ml. Untuk hasil yang presisi dan optimal, jangan masukkan pipet lebih dari 1 cm ke dalam suspensi awal dan hindari menarik partikel sampel di dalam inokulum. Berhati-hatilah saat mengambil pipet, jangan sampai ujung pipet terkena bagian yang dianggap tidak steril (jas lab, lengan, meja kerja, dan yang lainnya).

c. *Pour plate*

Menurut Pradhika (2019), *heat shock* dapat terjadi ketika media cair yang mengandung inokulum dituangkan ke dalam cawan petri yang telah berisi media agar. *Heat shock* dapat menyebabkan kematian sel mikroorganisme, terutama sel mikroorganisme yang sensitif terhadap panas. Oleh karena itu, dalam metode *pour plate*, PCA yang ditambahkan sebanyak 15-20 ml ini didinginkan terlebih dahulu hingga mencapai suhu $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pada masing-masing cawan yang sudah berisi suspensi. Supaya larutan contoh dan media PCA tercampur seluruhnya, lakukan pemutaran cawan ke depan dan ke belakang atau membentuk angka delapan dan diamkan sampai menjadi padat (BSN, 2008).

SIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa titik kritis pengujian TPC pada sampel pangan asal hewan di BPMSPH Bogor adalah sterilitas peralatan, pembuatan media, persiapan sampel, dan personel pengujian. Titik kritis ini dapat menjadi fokus untuk meningkatkan kualitas pengujian TPC dan menjamin keamanan pangan asal hewan.

DAFTAR PUSTAKA

- [ISO] International Organization for Standardization. (2017). *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony counting by spread plate technique*. Geneva, Swiss.
- Badan Standardisasi Nasional. (2008). *Standar Nasional Indonesia (SNI) 2897 tentang Cara uji mikrobiologi pangan*. Jakarta, Indonesia.
- Badan Standardisasi Nasional. (2014). *Standar Nasional Indonesia (SNI) 11133. tentang Mikrobiologi bahan pangan, pakan dan air - Persiapan, produksi, penyimpanan dan pengujian kinerja media kultur*. Jakarta, Indonesia.
- Badan Standardisasi Nasional. (2023). *Standar Nasional Indonesia (SNI) 9159 tentang Kriteria mikrobiologi pangan asal hewan*. Jakarta, Indonesia.
- Baruno, A. (2021). Modifikasi Laminar sebagai Alat Pembelajaran Biologi SMA Materi Mikroorganisme. *Ideguru: Jurnal Karya Ilmiah Guru*, 6(1), 1-10.
- Fitriana, F. I. (2012). Pengaruh Kenaikan Suhu Makanan Terhadap Kenaikan Jumlah TPC pada Makanan Penerbangan. *Skripsi, Universitas Indonesia, Depok*.
- Ikenganyia, M., Mwangi, F. M., Njoroge, D., & Okello, C. O. (2017). Effect of heat shock on the growth of microorganisms in agar-based media. *Journal of Food Science and Technology*, 54(2), 401-411.
- Kurniawansyah, I. S. (2016). Penentuan Tingkatan Jaminan Sterilitas pada Autoklaf dengan Indikator Biologi Spore Strip. *Farmaka*, 14(1), 1-10.
- Rina, W. K., Kurniawan, W., & Siregar, J. G. (2020). Pengendalian kualitas pangan dengan penerapan good manufacturing practices (GMP) pada proses produksi dodol betawi (studi kasus UKM MC). *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*, 30(1), 1-10.
- Syah, I. S. K. (2016). Effectiveness of Internal Chemical Indicator Strips for Class IV and V. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 2(2), 131-137.
- Pradhika, I. (2019). *Laboratorium Mikrobiologi Standar - Teori dan Praktik Laboratorium Mikrobiologi yang Baik*. laboratoriumstandard.com. Diakses pada 24 November 2023.
- Wulandari, S., Nisa, Y. S., Taryono, T., Indarti, S., & Sayekti, R. S. (2021). Sterilisasi peralatan dan media kultur jaringan. *Pusat Inovasi Agroteknologi, Universitas Gadjah Mada*.
- Yonast, B., Rosyidah, R. A., & Rahmatullah, W. (2021). Identifikasi tingkat kontaminasi bakteri di udara ruang penyadapan darah (AFTAP) unit donor darah PMI kota Yogyakarta. *Jurnal Ilmu Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*, 1(1), 1-7.

Prevalensi dan Validasi *Staphylococcus Aureus* Pada Isolat *Staphylococci* Koagulasi Positif Dari Sampel Susu Segar di Tiga Provinsi Di Indonesia

Ika Kartika Syarifah¹; Kanti Puji Rahayu¹;
Agnes Swasti Anindya¹; Monika Danaparamitha Andriani¹

¹Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan (BPMSPH), Bogor
email: ika.syarifah@gmail.com

ABSTRAK

Milk-borne diseases merupakan masalah yang harus dikendalikan di bidang kesehatan masyarakat, karena tidak hanya berdampak pada kesehatan manusia tetapi juga berdampak pada sektor ekonomi. Intoksikasi atau keracunan makanan yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* dapat menimbulkan gangguan pada sistem pencernaan manusia. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya cemaran bakteri *Staphylococcus* koagulasi positif dan *S. aureus* pada susu segar yang diambil di unit usaha pengumpulan susu yang tersebar di kota/kabupaten di 3 provinsi di Indonesia. Berdasarkan penelitian ini dari total 160 sampel susu segar diperoleh prevalensi *Staphylococcus* koagulasi positif adalah sebesar 46,25%, dan prevalensi *S. aureus* adalah sebesar 38,125%. Sedangkan hasil validasi isolat *Staphylococcus* koagulasi positif diperoleh 82,43% adalah *S. aureus*.

Kata kunci:

Koagulase positif; Prevalensi; *Staphylococcus aureus*; Susu segar.

PENDAHULUAN

Milk-borne diseases (MBD) atau penyakit yang diakibatkan karena mengonsumsi susu merupakan masalah yang sangat penting dalam bidang kesehatan masyarakat yang dapat disebabkan oleh berbagai bakteri patogen, salah satunya adalah *Staphylococcus aureus*. Patogen oportunistik *S. aureus* yang sering ditemukan pada manusia dan hewan, dapat menyebabkan spektrum penyakit yang beragam mulai dari infeksi kulit ringan hingga sistemik seperti pneumonia dan meningitis (Jangra dan Singh 2010). Beberapa peneliti berpendapat bahwa *S. aureus* dapat ditularkan ke manusia melalui kontaminasi susu seperti susu segar yang tidak diolah, dan produk olahan susu (Swetha *et al.* 2017). *Staphylococcus aureus* banyak ditemukan pada kulit dan mukosa hewan ruminansia yang menderita mastitis subklinis atau klinis, dan merupakan sumber kontaminasi pada produk susu (Sasidharan *et al.* 2011).

Staphylococcus aureus dapat memproduksi toksin dan dapat menyebabkan *Staphylococcus Food Poisoning* (SFP). Intoksikasi atau keracunan makanan yang disebabkan oleh *S. aureus* tersebut dapat menimbulkan gangguan pada sistem pencernaan manusia. Susu merupakan sumber utama dari kejadian SFP. Toksin *S. aureus* yang terdapat pada susu tidak dapat dihilangkan meskipun telah melewati proses pasteurisasi atau pemanasan (CDC 2018; Dai *et al.* 2019).

Milk-borne diseases merupakan masalah yang harus dikendalikan di bidang kesehatan masyarakat, karena tidak hanya berdampak pada kesehatan manusia tetapi juga berdampak pada sektor ekonomi. Penelitian tentang *S. aureus* melaporkan bahwa kontaminasi pada produk susu tidak hanya terbatas di negara berkembang tetapi juga terjadi di negara maju. Beberapa peneliti melaporkan bahwa *outbreak S. aureus* pada susu dan produk susu di berbagai negara sekitar 2-6% (Sasidharan *et al.* 2011).

Menurut Zalizar (2018) persentasi sapi perah di Indonesia yang menderita mastitis mencapai angka 60%. Sapi yang mengalami mastitis sub klinik tidak menunjukkan gejala klinis yang jelas sehingga peternak tetap melakukan pemerahan susu. Hal ini memungkinkan kontaminasi oleh bakteri patogen terhadap bahan baku susu. Bakteri *S. aureus* dimungkinkan terbawa pada saat pemerahan susu hingga pada proses pengolahan

Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya cemaran bakteri *Staphylococci* koagulasi positif dan *S. aureus* pada susu segar yang diambil di unit usaha pengumpulan susu yang tersebar di kota/kabupaten di 3 provinsi di Indonesia. Selanjutnya dilakukan uji lanjutan terhadap isolat *Staphylococcus* koagulasi positif untuk mengidentifikasi adanya bakteri *S. aureus*. Hasil dari penelitian ini diharapkan akan memberikan gambaran langsung kondisi susu segar yang diambil dan dapat menjadi perhatian dari pemangku kebijakan di wilayah sampel tersebut diperoleh.

MATERI DAN METODE

Jenis dan Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan melalui Program Monitoring Surveilans Residu dan Cemaran (PMSRCM) Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan (BPMSPH) pada bulan Maret sampai dengan April tahun 2021. Sebanyak 160 sampel susu segar diambil dengan teknik *random sampling*. Sampel susu dikoleksi dari unit usaha pengumpulan susu yang tersebar di 9 kota/kabupaten di 3 provinsi di Indonesia. Sampel diambil di Provinsi DI Yogyakarta (25 sampel), Jawa Barat (105 sampel) dan Jawa Tengah (30 sampel). Penjabaran lebih rinci dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Jumlah dan lokasi pengambilan sampel susu sapi di 3 provinsi di Indonesia

No	Asal Provinsi/Total Sampel	Kota/Kabupaten	Jumlah Sampel Susu Segar Sapi
1	DI Yogyakarta/25 sampel	Kab Sleman	25
2	Jawa Barat/105 sampel	Kab Ciamis	15
		Kab Garut	15
		Kab Sukabumi	15
		Kab Tasik Malaya	15
		Kab Sumedang	15
		Kota Cimahi	30
3	Jawa Tengah/30 sampel	Kab Boyolali	15
		Kota Salatiga	15
Total keseluruhan sampel			160

Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan adalah *Buffer peptone water* (BPW), *Baird-Parker* agar (BPA), *nutrient agar* (NA agar), plasma kelinci, *Mannitol Salt Agar* (MSA), agar darah 5% dan biakan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Peralatan yang digunakan adalah timbangan, plastik steril, *stomacher*, *incubator*, *autoclave*, *waterbath*, gelas ukur steril, pipet steril, cawan petri steril, ose, tabung reaksi steril, *vortex*, dan *hockey stick*.

Metode Uji *Staphylococcus* Koagulasi - Positif

Metode uji pada penelitian ini berdasarkan pada SNI ISO 6888-1:2012 tentang Mikrobiologi rantai pangan dan pakan - Metode horizontal untuk enumerasi *Staphylococci* koagulasi positif (*Staphylococcus aureus* dan spesies lainnya) bagian 1: Teknik menggunakan media Baird-Parker agar (BPA). Sampel susu segar ditimbang sebanyak 25 ml dan ditambahkan dengan 225 ml *buffered peptone water* (BPW) kedalam plastik steril, lalu dihomogenkan dengan *stomacher* selama 1 menit dengan kecepatan 230 rpm (suspensi pengenceran pertama). Selanjutnya dibuat pengenceran kedua dengan menambahkan 1 ml suspensi pengenceran pertama ke dalam 9 ml BPW.

Sampel dipipet sebanyak 0,1 ml pada permukaan 2 cawan BPA agar dari setiap suspensi pengenceran (pangkat 1 sampai 2). Kemudian suspensi sampel dipermukaan agar BPA diratakan menggunakan *hockey stick* steril dan biarkan mengering. Inkubasi di inkubator pada suhu 35 °C selama 48 ± 2 jam dengan posisi tutup cawan petri berada dibawah.

Karakteristik koloni terduga *Staphylococcus* koagulasi-positif adalah koloni khas berwarna hitam atau abu-abu, bersinar dan cembung (diameter 1,5 – 2,5 mm), dikelilingi zona bening yang mungkin sebagian buram dan terbentuk lingkaran *opalescent* di sekitar zona bening. Koloni yang menunjukkan karakteristik tersebut kemudian dilanjutkan ke uji koagulasi menggunakan plasma kelinci. Koloni dengan hasil koagulasi positif kemudian disimpan didalam cryotube berisi media steril *Tryptic Soya Broth* (TSB) ditambah dengan 10% gliserol pada suhu -20 °C.

Identifikasi *Staphylococcus aureus*

Metode pengujian identifikasi *Staphylococcus aureus* dilaksanakan berdasarkan hasil penelitian Effendi *et al.* (2019). Isolat *Staphylococcus* koagulasi-positif selanjutnya di subkultur pada media MSA dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18 - 20 jam. Kemudian koloni bakteri di subkultur pada media agar darah 5% dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18 - 20 jam. *Staphylococcus aureus* tumbuh pada media MSA, dapat memfermentasi mannitol, koagulasi positif, dan membentuk aktivitas beta hemolisis pada agar darah.

Analisis Data

Data yang dihasilkan dari hasil penelitian ini dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Susu segar adalah cairan yang berasal dari ambing sapi atau ruminansia lainnya yang sehat dan bersih, diperoleh dengan cara pemerahan yang benar, dengan kandungan alaminya tidak dikurangi atau ditambah sesuatu apapun dan belum mendapat perlakuan apapun kecuali pendinginan. Untuk meningkatkan peran susu segar dalam negeri dan perlindungan terhadap produsen dan konsumen, ditetapkan standar nasional mengenai persyaratan susu segar yang baik. Salah satu persyaratan yang ditetapkan adalah keberadaan bakteri *Staphylococcus* koagulasi positif pada batas tertentu yang diperbolehkan ada di dalam susu segar (BSN, 2011).

Staphylococcus aureus merupakan bakteri penyebab mastitis dengan tingkat kejadian tinggi dan merugikan peternak. Patogenesitas *S. aureus* dipengaruhi oleh kemampuannya menghasilkan koagulasi, yaitu protein menyerupai enzim yang dapat menggumpalkan plasma oksalat atau sitrat. Selain bakteri *S. aureus*, *Staphylococcus intermedius* juga menghasilkan koagulasi positif (Linda dan Wahyuni, 2014).

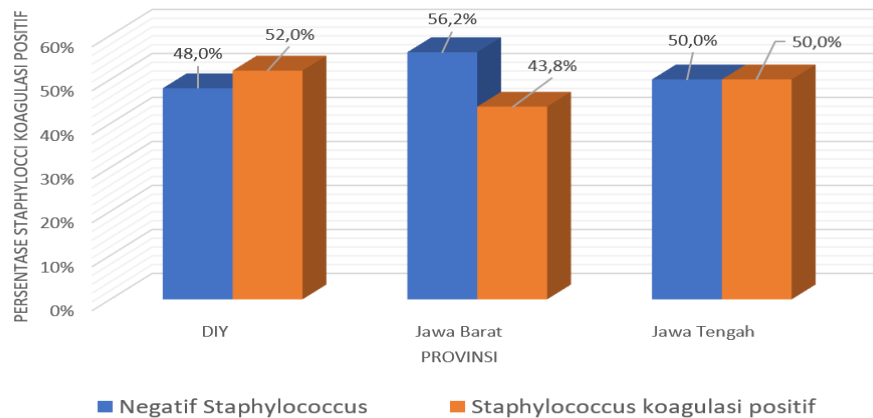
Berdasarkan hasil penelitian terhadap 160 sampel susu segar yang berasal dari Provinsi DI Yogyakarta (26 sampel), Jawa Barat (105 sampel) dan Jawa Tengah (30 sampel), diperoleh sebanyak 74 sampel susu segar mengandung *Staphylococcus* koagulasi positif dan 61 sampel diidentifikasi sebagai *S. aureus*. Hasil perbandingan jumlah sampel dengan *Staphylococcus* koagulasi positif dan *S. aureus* tersebut dijabarkan pada Tabel 2. Sedangkan perhitungan prevalensi *Staphylococcus* koagulasi positif pada sampel susu segar di tiga provinsi di Indonesia adalah sebesar 46,25%, dan prevalensi *S. aureus* adalah sebesar 38,125% (Grafik 1).

Tabel 2 Hasil uji konfirmasi *Staphylococcus aureus* sampel susu segar dari 3 Provinsi di Indonesia

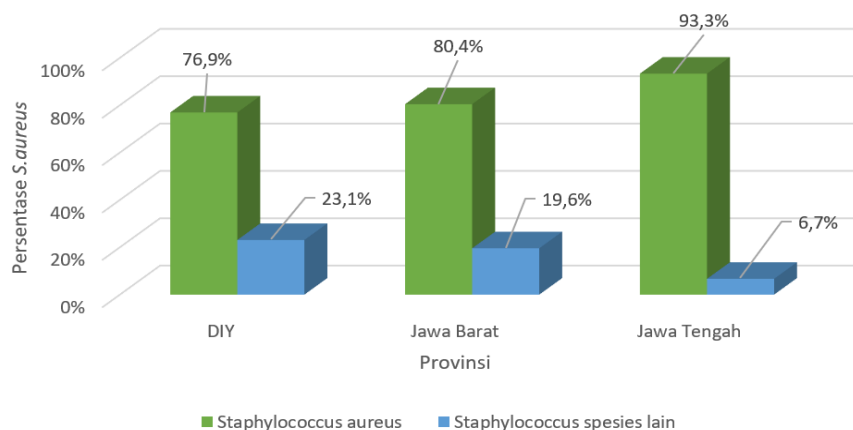
Asal Provinsi/Total Sampel	Kota/Kabupaten	Jumlah Sampel	<i>Staphylococcus</i> koagulasi positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	Keterangan
DI Yogyakarta/25 sampel	Kab Sleman	25	13	10	(-) zona hemolisis
Jawa Barat/105 sampel	Kab Ciamis	15	5	4	(-) zona bening
	Kab Garut	15	8	8	
	Kab Sukabumi	15	8	7	(-) zona bening
	Kab Tasikmalaya	15	1	0	(-) zona hemolisis
	Kab Sumedang	15	11	9	(-) zona hemolisis, (-) MSA
	Kota Cimahi	30	13	9	(-) zona hemolisis, (-) MSA
Jawa Tengah/30 sampel	Kab Boyolali	15	15	14	(-) zona hemolisis
	Kota Salatiga	15	0	0	
		160	74	61	

Pada Grafik 1. dijabarkan bahwa presentasi terhadap jumlah sampel yang berasal dari Provinsi DI Yogyakarta paling tinggi mengandung *Staphylococcus* koagulasi positif yaitu sebanyak 52% (13/25). Selanjutnya Provinsi Jawa Tengah sebanyak 50% (15/30), dan Jawa Barat sebanyak 43,8% (46/105). Berdasarkan hasil identifikasi isolat *Staphylococcus* koagulasi positif diperoleh hasil 61 isolat adalah *S. aureus* (Tabel 2). Pada Grafik 2, Isolat *Staphylococcus* koagulasi positif yang berasal dari Provinsi DI Yogyakarta 76,9% (10/13) adalah *Staphylococcus aureus* (80,4%(37/46) berasal dari Jawa Barat dan 93,3% (14/15) dari Jawa Tengah.

Bakteri *Staphylococcus aureus* memproduksi toksin dan enzim *invasive* yang dapat ditemukan pada sejumlah produk pangan. Susu merupakan sumber utama dari *Staphylococcal food poisoning* (SFP). Setelah proses pasteurisasi, mikroorganisme ini atau enterotoksinya tetap tertinggal di dalam susu (Dai *et al.* 2019). Susu merupakan sumber utama penyebab SFP. Terdapat beberapa laporan kasus *foodborne outbreak* yang disebabkan oleh toksin *S. aureus* yang dihubungkan dengan mengonsumsi susu yang terkontaminasi (Fetsch *et al.* 2014). Sebagai tambahan, susu segar mentah dan produk susu dari susu mentah seringkali terkontaminasi dengan *strain S. aureus* yang berbeda di seluruh dunia (Riva *et al.* 2015). Susu merupakan substrat yang baik untuk pertumbuhan *S. aureus* dan memproduksi enterotoksin. Enterotoksin dapat mempertahankan aktivitas biologisnya setelah pasteurisasi (Rall *et al.*, 2008).



Grafik 1. Hasil uji konfirmasi *Staphylococcus koagulasi positif* pada sampel susu segar di Provinsi DIY, Jawa Tengah, Jawa Barat



Grafik 2. Hasil Validasi *Staphylococcus aureus* pada sampel susu segar di Provinsi DIY, Jawa Tengah, Jawa Barat

Staphylococcus aureus memproduksi beberapa toksin dan invasive enzim seperti *Staphylococcal enterotoxins* (SEs), *hemolysins*, *Panton-Valentine leukocidin* (PVL), *toxic shock syndrome toxin-1* (TSST-1), *plasma coagulase*, dan *deoxyribonuclease* (Spanu *et al.* 2012). Perbedaan antara virulen dan non virulen strain sangat signifikan untuk mengevaluasi potensi implikasi dari keberadaan mikroorganisme ini untuk keamanan pangan dan kesehatan masyarakat. Di mana, SEs dapat aktif pada konsentrasi mulai dari nanogram tinggi hingga jumlah mikrogram rendah (Larkin *et al.* 2009) dan tahan terhadap kondisi perlakuan panas dan pH rendah, dan dapat mempertahankan aktivitasnya di saluran pencernaan setelah dikonsumsi (Argudín *et al.* 2010).

Kemampuan *Staphylococcus aureus* membentuk biofilm membantu bakteri tersebut untuk bertahan hidup di lingkungan yang tidak bersahabat di dalam inang dan dianggap bertanggung jawab atas infeksi kronis atau persisten. Kemampuan tersebut dapat meningkatkan patogenesitas karena biofilm dapat mentoleransi *antimicrobial agents*, dimana membuat bakteri tersebut secara ekstrim sulit dimusnahkan (Zmantar *et al.* 2010).

Pada penelitian yang dilakukan Ramandinianto *et al.* (2020) terhadap 150 sampel susu yang diambil di Provinsi Jawa Timur ditemukan sebanyak 61% terdeteksi adanya kontaminasi *Staphylococcus aureus*, persentase ini lebih tinggi dibandingkan dengan Swetha *et al.* (2017) di Andhra Pradesh India yang mengisolasi 57% strain *Staphylococcus koagulasi positif*, dimana 73,6% di antaranya adalah *Staphylococcus aureus*. Selain itu, penelitian VyletëloVá *et al.* (2011) yang mengisolasi strain *Staphylococcus koagulasi positif* sebanyak 47,5% pada susu sapi perah, sedangkan strain yang dominan adalah *S. aureus* dengan jumlah 46,4%. Penelitian tersebut mempunyai desain yang sama dengan yang dilakukan pada penelitian ini yaitu untuk mendeteksi keberadaan strain *Staphylococcus koagulasi positif* pada peternakan sapi perah yang higienitas pemerahannya rendah sampai sedang sehingga meningkatkan potensi kontaminan pada susu sapi. Sejalan dengan hal tersebut, perbedaan jumlah isolat yang ditemukan dapat dipengaruhi oleh perbedaan desain penelitian seperti populasi dan sebaran geografis sampel, jenis antibiotik yang digunakan, dan praktik pengendalian infeksi (Oberoi *et al.* 2012).

Berdasarkan hasil penelitian ini diperoleh sebanyak 74 sampel (46,25%) susu segar mengandung *Staphylococcus* koagulasi positif dan 61 sampel (38,125%) diidentifikasi sebagai *Staphylococcus aureus*. Konfirmasi dari *Staphylococcus* koagulase positif perlu dilakukan untuk dapat mengidentifikasi *Staphylococcus aureus* dengan menambahkan pengujian lain pada media darah domba agar yang bertujuan untuk melihat *Beta-hemolysis*. Serta penggunaan media Manitol Salt Agar (MSA) untuk melihat fermentasi manitol. Berdasarkan hasil validasi isolat *Staphylococcus* koagulasi positif diperoleh 82,43% (61/74) adalah *Staphylococcus aureus*.

SIMPULAN

Sebagian besar sampel susu segar yang berasal dari 3 provinsi di Indonesia mengandung 46,25% *Staphylococcus* koagulasi positif dengan jumlah *Staphylococcus aureus* sebesar 38,125%. Berdasarkan hasil validasi isolat *Staphylococcus* koagulasi positif diperoleh 82,43% adalah *Staphylococcus aureus*. Data dari hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada pelaku usaha, pemerintah pusat maupun daerah untuk dapat melakukan pengendalian terhadap bakteri ini di susu segar.

DAFTAR PUSTAKA

- Argudin, M. Á., Mendoza, M. C., Rodicio, M. R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, (2):1751–1773. doi: 10.3390/toxins2071751
- Badan Standardisasi Nasional. (2011). *Standar Nasional Indonesia (SNI) No. 3141.1-2011 tentang Susu Segar - Bagian 1: Sapi*. Jakarta.
- Badan Standardisasi Nasional. (2012). *Standar Nasional Indonesia (SNI) ISO No. 6888.1-2012 tentang Mikrobiologi bahan pangan dan pakan-Metode horizontal untuk enumerasi staphylococci koagulase positif (Staphylococcus aureus dan spesies lain)-Bagian 1: Teknik menggunakan media Baird-Parker agar*. Jakarta.
- [CDC] *Centers of Disease Control and Prevention*. 2018. *Staphylococcal (Staph) Food Poisoning*. Diakses tanggal 02 Maret 2022. Diunduh pada: <https://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/staphylococcal.html>
- Dai, J., Wu, S., Huang, J., Wu, Q., Zhang, F., Zhang, J., Wang, J., Ding, Y., Zhang, S., Yang, X., Lei, T., Xue, L. and Wu, H. (2019). Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated From Pasteurized Milk in China. *Front Microbio*, (10):641.
- Effendi, M. H., Hisyam, M. A. M., Hastutiek, P., Tyasningsih, W. (2019). Detection of coagulase gene in *Staphylococcus aureus* from several dairy farms in East Java, Indonesia, by polymerase chain reaction. *Vet World*, 12 (1): 68-71. doi: 10.14202/vetworld.2019.68-71.
- Fetsch, A., Contzen, M., Hartelt, K., Kleiser, A., Maassen, S., Rau, J., et al. (2014). *Staphylococcus aureus* food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream. *Int J Food Microbiol*, 187:1. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.017
- Jangra, P., Singh, A. (2010). *Staphylococcus aureus* β -hemolysin neutralizing single domain antibody isolated from phage display library of Indian desert camel. *Asian Pacific J Trop Med*, 3 (1): 1-7. doi: 10.1016/S1995-7645(10)60020-X
- Larkin, E. A., Carman, R. J., Krakauer, T., and Stiles, B. G. (2009). *Staphylococcus aureus*: the toxic presence of a pathogen extraordinaire. *Curr Med Chem*, 16, 4003–4019. doi: 10.2174/092986709789352321
- Linda, I., Wahyuni, A. E. T. H. (2014). Deteksi *Staphylococcus aureus* Koagulase Positif dan *Staphylococcus aureus* Koagulase Negatif dari Susu serta Analisis Gen Koagulase (coa). Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.
- Oberoi, L., Kaur, K., Aggarwal, A. (2012). Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a rural tertiary care hospital in North India. *Intl J Appl Biol Pharm Technol*, 3: 200-205.
- Rall, V. L., Vieira, F. P., Rall, R., Vieitis, R. L., Fernandes, A. Jr., Candeias, J. M., et al. (2008). PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Vet Microbiol*, 132, 408–413. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.05.011
- Ramandinianto, S. C., Khairullah, A. R., Effendi, M. H. (2020). *MecA* gene and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from dairy farms in East Java, Indonesia. *Biodiversitas* 21 (8): 3562-356. doi: 10.13057/biodiv/d210819
- Riva, A., Borghi, E., Cirasola, D., Colmegna, S., Borgo, F., Amato, E., et al. (2015). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw milk: prevalence, SCCmec typing, enterotoxin characterization, and antimicrobial resistance patterns. *J Food Protect*, 78:1142. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-531

- Sasidharan, S., Prema, B., Yoga, Latha, L. L. (2011). Antimicrobial drug resistance of *Staphylococcus aureus* in dairy products. *Asian Pac J Trop Biomed*, 1 (2): 130-132. doi: 10.1016/S2221-1691(11)60010-5
- Spanu, V., Spanu, C., Viridis, S., Cossu, F., Scarano, C., and De Santis, E. P. (2012). Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. *Int J Food Microbiol*, 153, 53–57. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.015
- Swetha, C. S., Supriya, R. A., Goud, S. S., Babu, A. J., Rao, T. M. (2017). A study on the prevalence of zoonotic important methicillin-resistant and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA & VRSA) and coagulase-negative *Staphylococci* (MR-CNS & VR-CNS) in raw milk samples of Tirupati, Andhra Pradesh. *Pharma Innov Intl J*, 6 (9): 17-24.
- VyletělóVá, M., VlkoVá, H., Manga, I. (2011). Occurrence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci* in raw milk manufacturing. *Czech J Food Sci*, 29: S11-S16. doi: 10.17221/4443-CJFS
- Zalizar, Lili. (2018). Kasus mastitis subklinis pada sapi perah laktasi di Kecamatan Pujon Kabupaten Malang. Fakultas Pertanian dan Peternakan Universitas Muhammadiyah Malang. ISSN 0852 – 3681.
- Zmantar, T., Chaieb, K., Makni, H., Miladi, H., Abdallah, F. B., Mahdouani, K., et al. (2010). Detection by PCR of adhesins genes and slime production in clinical *Staphylococcus aureus*. *J Basic Microbiol*, 48, 308–314. doi: 10.1002/jobm.200700289

Validasi Metode Pengujian Hydroxymetilfurfural (HMF) menggunakan Instrumen *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) pada Sampel Madu

Puji Rahayu, Hanif Anisatun, Innes Maulidya, Elok Kania Suryaningsih, Dini Tri Mardiani

Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan, Bogor

e-mail: h.anisatun@pertanian.go.id

ABSTRAK

Madu merupakan salah satu komoditas yang diminati masyarakat. Salah satu persyaratan mutu yang harus dipenuhi madu berdasarkan SNI 8664:2018 adalah kadar hidroksimetilfurfural (HMF) dengan batas maksimal 40 mg/kg. Metode pengujian HMF tertera pada SNI 8664:2018 dan laboratorium BPMSPH melakukan validasi metode uji tersebut untuk memastikan bahwa prosedur memenuhi standar dan sesuai dengan tujuan yang diharapkan. Hasil dari validasi metode yang telah dilakukan menunjukkan bahwa untuk parameter akurasi, presisi, linearitas, LOD, dan LOQ metode analisis penentuan kadar HMF pada madu dengan instrumen HPLC di BPMSPH telah memenuhi persyaratan sebagai suatu metode yang valid.

Kata kunci : Madu; HPLC; Hydroxymethylfurfural; Validasi Metode

PENDAHULUAN

Madu merupakan cairan alami yang umumnya manis, berasal dari nektar bunga yang dikumpulkan oleh lebah madu (Evahelda *et al.*, 2017). Menurut *Codex Alimentarius* (2001), madu adalah zat manis yang dihasilkan oleh lebah madu, yang berasal dari nektar bunga atau dari sekresi tanaman yang dikumpulkan oleh lebah. Madu dapat mengalami perubahan bentuk dan mengandung senyawa tertentu yang berasal dari tubuh lebah, kemudian disimpan pada sarang madu hingga mengalami proses pematangan. Madu merupakan salah satu komoditas yang diminati masyarakat karena dipercaya memiliki banyak khasiat. Madu yang baik harus memenuhi standar mutu sesuai dengan SNI 8664:2018 tentang madu, salah satunya terkait dengan kadar hidroksimetilfurfural (HMF) dalam madu maksimal sebesar 40 mg/kg.

Senyawa HMF pada dasarnya adalah pecahan dari sukrosa dan fruktosa (Koesprimadisari *et al.*, 2016). Pengujian HMF dilakukan untuk mengetahui kemurnian dan kesegaran dari madu serta untuk menentukan keaslian dan kesegaran madu (Syuhriatin, 2019). Kadar HMF dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain pH, suhu, waktu pemanasan, kondisi penyimpanan, serta sumber nektar (Zakaria, 2014). Semakin lama penyimpanan, kadar HMF akan semakin meningkat karena adanya dekomposisi glukosa, fruktosa, dan monosakarida lain yang memiliki enam atom C dalam suasana asam dan dipercepat dengan bantuan panas (Evahelda *et al.*, 2017). Reaksi ini selanjutnya akan menghasilkan asam format dan levulinat (Anjana *et al.*, 2014). Warna madu juga akan semakin gelap seiring meningkatnya kadar HMF karena oksigen dari udara mengoksidasi HMF (Bogdanov *et al.*, 2004). Tingginya kadar HMF dalam madu akan menurunkan kualitas madu karena kandungan HMF dalam memiliki keterkaitan dengan beberapa karakteristik kimia madu lainnya seperti kadar air, pH, kadar asam bebas, kadar gula pereduksi, serta aktivitas enzimatis dalam madu (Kowalski *et al.*, 2013). Selain itu pada beberapa penelitian disebutkan bahwa HMF memiliki sifat toksisitas, mutagenik dan karsinogenik (Chi *et al.*, 1998). Salah satu alat yang dapat digunakan untuk mendeteksi HMF adalah *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC).

Sehubungan dengan meningkatnya permintaan pengujian HMF pada madu, maka perlu dilakukan validasi terhadap uji tersebut. Validasi merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004). Dengan menggunakan sampel yang telah diketahui (atau setidaknya telah dihitung sebelumnya) nilai parameter suatu produk validasi dapat memberikan informasi yang berguna mengenai akurasi, presisi, linearitas, dan karakteristik lainnya dari kinerja suatu metode yang sehari-hari digunakan pada sampel yang tidak diketahui. Parameter validasi yang ditetapkan pada penelitian ini antara lain: linearitas, akurasi, presisi, Limit of detection (LOD), dan Limit of Quantitation (LOQ).

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan dalam pengujian ini antara lain instrument HPLC (Agilent®) dengan kondisi *flow rate* 1.0 ml/min, kolom C-18, neraca analitik, pipet 0.5 ml, mikropipet 1000 µl, mikropipet 100 µl, corong

kecil, stirer, labu ukur 25 ml dan 50 ml, gelas ukur 25 ml dan 50 ml, auto sampler vial HPLC 2 ml, microtips 100 µl dan 1000 µl.

Bahan

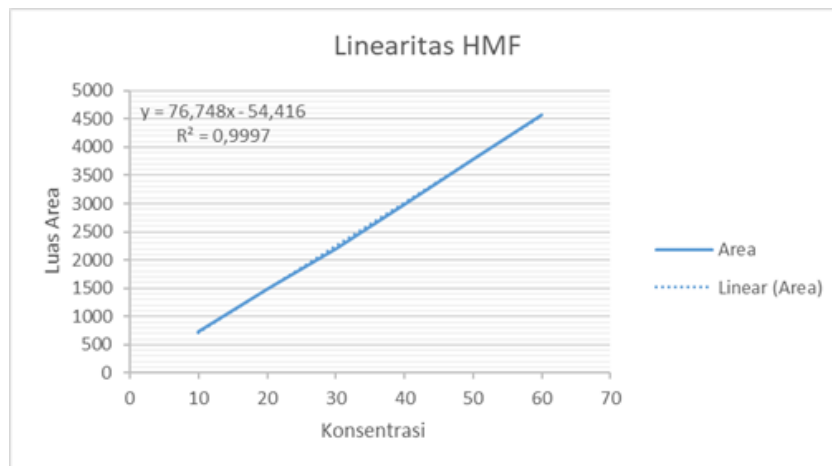
Madu, aquades, methanol, larutan Carrez I, larutan Carrez II, membran filter Nylon 0.45 µm, standar HMF, dan fase gerak (methanol:air 90:10).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Linearitas

Linearitas adalah kemampuan metode analisis untuk memperoleh hasil percobaan yang berbanding lurus dengan konsentrasi analit di dalam sampel. Parameter ini merupakan taraf ukur kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon (y) dengan konsentrasi (x). Linearitas dapat diukur dengan melakukan pengukuran tunggal pada konsentrasi yang berbeda dan selanjutnya ditentukan nilai kemiringan (*Slope*) dan intersep, serta koefisien korelasi (Harmita, 2004).

Pengujian linearitas pada HMF ditetapkan dengan membuat deret standar sebanyak 6 konsentrasi pada rentang 10 ppm sampai dengan 40 ppm pada panjang gelombang 280 nm. Berdasarkan uji linearitas menunjukkan bahwa adanya hubungan yang berbanding lurus antara konsentrasi standar dengan luas area puncak. Semakin tinggi konsentrasi suatu standar, maka semakin besar pula luas area puncak yang dihasilkan. Suatu metode dapat dikatakan linear apabila menghasilkan nilai koefisien korelasi > 0,9900 (AOAC:2012).



Gambar 1. Kurva standar untuk validasi metode HMF beserta persamaan regresi dan koefisien korelasinya

Persamaan linear yang diperoleh dari pengujian HMF pada madu adalah $y = 76,748x - 54,416$ dengan koefisien korelasi 0,9997 (Gambar 1). Nilai koefisien korelasi (0,9997) > 0,9900 sehingga dapat dikatakan linear. Hal ini menunjukkan bahwa metode penentuan HMF dalam madu dengan HPLC memiliki linearitas yang baik karena memenuhi syarat penerimaan koefisien korelasi (r).

Tabel 1. Parameter dan nilai pengujian linearitas metode analisis HMF pada madu

Parameter	Nilai
Linearitas (Rentang (ppm))	10 - 60 ppm
Koefisien Korelasi (r)	0,9997
Intercept (a)	54,416
Kemiringan (b)	76,748

Uji Akurasi

Pengujian akurasi dilakukan dengan menambahkan (spike) standar HMF pada 7 ulangan sampel hingga diperoleh konsentrasi sampel sebesar 10 ppm, setelah itu diinjeksikan ke dalam HPLC. Data yang diperoleh ditentukan dengan nilai % *recovery* atau persen perolehan kembali analit yang ditambahkan (Harmita, 2004). Adapun rumus nilai perolehan kembali (% *Recovery*), yaitu:

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

C_t merupakan konsentrasi HMF setelah diberi *spike*. C_u adalah konsentrasi HMF pada sampel sedangkan C_s merupakan standar HMF. Suatu metode analisis dapat dikatakan memiliki nilai akurasi yang baik apabila nilai % *recovery* berkisar antara 75- 120% (AOAC, 2012). Rata-rata % *recovery* pada pengujian HMF ini adalah 106.67%. Nilai ini menunjukkan bahwa % *recovery* pengujian memiliki akurasi yang baik (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil perhitungan % *recovery* HMF pada madu

No	Ulangan	Konsentrasi (ppm)	Luas Area (mAU)	% Recovery
	Blanko	0,50	14,07	
1	Madu 1	11,15	1065,40	106,50
2	Madu 2	11,12	1061,77	106,20
3	Madu 3	11,15	1065,41	106,50
4	Madu 4	11,11	1061,01	106,10
5	Madu 5	11,20	1069,76	107,00
6	Madu 6	11,28	1077,88	107,80
7	Madu 7	11,16	1066,27	106,60

Uji Presisi Repeatabilitas

Pengujian presisi atau uji keseksamaan dengan parameter repeatabilitas dilakukan terhadap 7 sampel madu yang mewakili 7 kali ulangan yang diberi *spike* standar HMF dengan konsentrasi 10 ppm. Kemudian dianalisis sebanyak 20 µL kedalam HPLC. Setelah didapat hasil pengukuran luas area puncak pada kromatogram, ditentukan simpangan baku (SD) dan simpangan baku relatifnya (RSD). Adapun rumus untuk menghitung simpangan baku (SD) dan simpangan baku relatifnya (% RSD) adalah sebagai berikut:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

x_i adalah luas area puncak dari setiap sampel, \bar{x} merupakan rata-rata dari luas area puncak dari tujuh sampel yang digunakan, dan n adalah jumlah ulangan dari sampel yang diuji.

Tabel 3. Hasil perhitungan konsentrasi HMF, SD, dan % RSD pada madu

No	Ulangan	Konsentrasi (ppm)
	Blanko	0,50
1	Madu 1	11,15
2	Madu 2	11,12
3	Madu 3	11,15
4	Madu 4	11,11
5	Madu 5	11,20
6	Madu 6	11,28
7	Madu 7	11,16
Σ		78,17
Rata-rata		11,16714286
SD		0,057652489
%RSD		0,516268933
Recovery		106,6714286
CV Horwitz		1,390909896
2/3 CV Horwitz		0,93190963

Hasil yang ditunjukkan pada Tabel 3 memenuhi persyaratan % RSD < 2/3 CV Horwitz. Hal ini menunjukkan bahwa sistem pengujian, alat, dan analisis memiliki nilai presisi yang baik terhadap metode dengan respon yang relatif konstan sehingga hasil pengukuran memiliki nilai presisi yang memenuhi persyaratan dan dapat dikatakan valid.

Intra Reproducibilitas

Uji presisi intra reproducibilitas dilakukan dengan menganalisis sesuai dengan metode uji di atas, dengan 7 kali ulangan, menggunakan contoh yang sama, laboratorium dan peralatan yang sama, analisis yang berbeda, dan waktu yang berbeda. Penghitungan intra reproducibilitas menggunakan *paired - sample t-test*. *Paired - sample t-test* adalah analisis dengan melibatkan dua pengukuran pada subjek yang sama terhadap suatu pengaruh atau perlakuan tertentu. Apabila suatu perlakuan tidak memberi pengaruh, maka perbedaan rata-rata adalah nol. Penarikan kesimpulan *Paired - sample t-test* dilakukan dengan membandingkan hasil *t-test* dengan α . Nilai α yang digunakan yaitu 0.05 apabila hasil *t-test* lebih besar dari 0.05 ($t\text{-test} > 0.05$) maka hasil dinyatakan tidak berbeda nyata. Selanjutnya, apabila nilai *t-test* lebih kecil dari 0.05 ($t\text{-test} < 0.05$) maka dinyatakan hasil berbeda nyata. Pengujian ini dapat dilakukan dengan menggunakan perhitungan excel, spss, maupun manual. Nilai 0.05 didapat dari nilai tingkat kepercayaan 95%.

Tabel 4. Hasil pengukuran konsentrasi HFD pada madu 2 analisis

No	Ulangan	Konsentrasi (ppm)	
		Analisis 1	Analisis 2
	Blanko	0,50	0,50
1	Madu 1	11,27	11,15
2	Madu 2	11,13	11,12
3	Madu 3	11,15	11,15
4	Madu 4	11,20	11,11
5	Madu 5	11,28	11,20
6	Madu 6	11,22	11,28
7	Madu 7	11,27	11,16

Tabel 5. Hasil pengukuran luas area (mAU) pada madu 2 analisis

No	Ulangan	Konsentrasi (ppm)	
		Analisis 1	Analisis 2
	Blanko	15,08	14,07
1	Madu 1	1077,35	1065,40
2	Madu 2	1062,66	1061,77
3	Madu 3	1065,49	1065,41
4	Madu 4	1069,74	1061,01
5	Madu 5	1078,15	1069,76
6	Madu 6	1071,70	1077,88
7	Madu 7	1076,69	1066,27

t-Test: Paired Two Sample for Means

	Analisis 1	Analisis 2
Mean	11,16714286	11,21714286
Variance	0,00332381	0,003657143
Observations	7	7
Pearson Correlation	0,351014294	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	6	
t Stat	-1,96476312	
P(T<=t) one-tail	0,048526103	
t Critical one-tail	1,943180281	
P(T<=t) two-tail	0,097052206	
t Critical two-tail	2,446911851	

Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Larutan blanko madu dengan 7 kali ulangan dianalisis dengan menggunakan HPLC. Setelah dianalisis dihitung respon simpangan standarnya menggunakan rumus:

$$Q = \frac{k + SD}{Slope}$$

Q adalah batas deteksi dan batas kuantitasi dengan k adalah koefisien yang bernilai 3 untuk batas deteksi (LOD) dan 10 untuk batas kuantitasi (LOQ). SD atau simpangan baku residual dari luas puncak ke 7 sampel dan *slope* (kemiringan).

Tabel 6. Hasil perhitungan LOD dan LOQ HMF madu

No	Ulangan	Konsentrasi (ppm)	Luas Area (mAU)
1	Blanko 1	0,5	15,08
2	Blanko 2	0,49	15,01
3	Blanko 3	0,48	18,99
4	Blanko 4	0,5	15,08
5	Blanko 5	0,51	15,21
6	Blanko 6	0,47	14,96
7	Blanko 7	0,53	15,32
		SD	1,4715
		LOD	0,0590
		LOQ	0,1968

Berdasarkan dari hasil perhitungan, didapatkan nilai LOD dari HMF, yaitu 0.0590 ppm dan LOQ 0.1968 ppm. Limit deteksi dan limit kuantifikasi yang diperoleh sudah bagus.

Robustness

Robustness adalah kemampuan suatu metode analisis untuk tidak terpengaruh oleh perubahan atau variasi kecil parameter metode. Pengujian *robustness* dilakukan dengan cara membandingkan hasil pada kondisi normal dengan kondisi yang telah dimodifikasi. Pengujian *robustness* merupakan pengujian suatu metode analisis normal dengan metode analisis yang telah mengalami perubahan menggunakan *paired - sample t-test*. *Paired - sample t-test* adalah analisis dengan melibatkan dua pengukuran pada subjek yang sama terhadap suatu pengaruh atau perlakuan tertentu. Apabila suatu perlakuan tidak memberi pengaruh, maka perbedaan rata-rata adalah nol. Penarikan kesimpulan *paired - sample t-test* dilakukan dengan membandingkan hasil *t-test* dengan α . Nilai α yang digunakan, yaitu 0.05. Apabila hasil *t-test* lebih besar dari 0.05 ($t\text{-test} > 0.05$) maka metode masih dapat mempertahankan hasil dari perlakuan yang diberikan. Selanjutnya, apabila nilai *t-test* lebih kecil dari 0.05 ($t\text{-test} < 0.05$) maka metode analisis tidak dapat mempertahankan hasil dari perlakuan yang diberikan. Pengujian ini dapat dilakukan dengan menggunakan perhitungan excel, spss, maupun manual. Nilai 0.05 didapat dari nilai tingkat kepercayaan 95%.

Pengujian *robustness* dilakukan dengan menggunakan sampel uji, metode analisis dan alat analisis dengan spesifikasi yang sama. Namun pengujian ini dilakukan dengan mengganti fase gerak yang terdiri dari campuran asetonitril LC dengan water LC (10:90% v/v), diganti dengan menggunakan asetonitril LC dengan water LC (50:50% v/v). Pemilihan modifikasi ini dilakukan untuk mengurangi biaya pengujian dengan mengurangi penggunaan water LC khusus kromatografi. Hasil analisis membandingkan antara sampel yang diuji dengan fase gerak normal dengan sampel yang diuji dengan fase gerak termodifikasi. Berdasarkan pengolahan data menggunakan spss didapatkan nilai *t-test* sebagai berikut:

Tabel 7. Hasil pengolahan data menggunakan spss

Sampel	Konsentrasi sampel dengan fase gerak termodifikasi (ppm)	Konsentrasi sampel dengan fase gerak normal (ppm)
1	9,9704	9,7543
2	9,9088	9,7222
3	9,9386	9,7308
4	9,8570	9,7001
5	9,9969	9,8934
6	10,014	9,7896
7	9,9754	9,7426

t-Test: Paired Two Sample for Means

	Fase Gerak Normal	Fase Gerak Modifikasi
Mean	9,776555556	9,966422222
Variance	0,0069057	0,004171177
Observations	9	9
Pearson Correlation	0,842213943	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	8	
t Stat	-12,62192633	
P(T<=t) one-tail	7,287E-07	
t Critical one-tail	1,859548038	
P(T<=t) two-tail	0,00000146	
t Critical two-tail	2,306004135	

P<0.05 berbeda nyata

Hasil perbandingan konsentrasi fase gerak normal dengan konsentrasi fase gerak termodifikasi dihasilkan nilai dari *paired - sample t-test* sebesar 0.00000146. Nilai *t-test* yang didapat < 0.05, maka metode tidak dapat mempertahankan hasil yang baik dengan adanya modifikasi perlakuan yang diberikan. Metode sebaiknya tidak dimodifikasi untuk mendapatkan hasil yang valid.

SIMPULAN

Hasil dari validasi yang telah dilakukan menunjukkan bahwa untuk parameter akurasi, presisi, linearitas, LOD dan LOQ metode analisis penentuan kadar HMF pada madu dengan HPLC di BPMSPH telah memenuhi persyaratan sebagai suatu metode yang valid. Namun, pada parameter robustness tidak memberikan hasil yang robust (tangguh) dikarenakan tidak memenuhi kriteria (nilai *t-test* > 0,05). Dari hasil validasi tersebut diatas disarankan untuk tidak melakukan penggantian metode atau melakukan modifikasi metode supaya didapatkan hasil yang valid.

DAFTAR PUSTAKA

- Anjana, F., Oktaviani, R.W. dan Roesyadi, A. (2014). Studi kinetika dekomposisi glukosa pada temperatur tinggi. *Jurnal Teknik Pomits* 3 (2): 2301–2304.
- Bogdanov, S. 2011. *Honey as Nutrient and Food Function Food*. Bee Product Science.
- Chi, W., C. B. Zhang, Y. H. Lao, L. Y. Guo. 1998. Investigation of the Restriction on The Formation of HMF. *J.Pharm.* 14(1): 101-104.
- Codex Alimentarius Commission (2001). *Revised Standards for Honey*. Codex Standard 12-1981. Rome: FAO.
- Evahelda, E., Pratama, F., Malahayati, M., Santoso, B. 2017. Sifat Fisik dan Kimia Madu dari Nektar Pohon Karet di Kabupaten Bangka Tengah, Indonesia . *AGRITECH, Vol. 37, No. 4, November 2017. Pp. 363-368*
- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian, vol. 1, no. 3, pp.117-120*.
- Koesprimadisari, A. R., Arrisujaya, D. and Syafdaningsih, R. 2018. Uji Kandungan Hidroksimetilfurfural (HMF) sebagai Parameter Kualitas Madu. *Jurnal Sains Natural*, 6(2), pp. 44–51. doi: 10.31938/jsn.v6i2.159.
- Kowalski, S., M. Lukasiewicz, A. DudaChodak, G. Ziec. 2013. 5- Hydroxymethyl-2-Furfural Heat Induced Formation Occurance in Food and Biotransformation: a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*. 63 (4): 207-225.
- Standar Nasional Indonesia (2013). SNI 8664:2018.
- Syuhriatin. 2019. Uji Kemurnian Madu yang Dihasilkan Lebah Spesies *Cerana* sp. dan *Trigona* sp. dengan Metode HMF (Hidroksi Methyl Furfural). *Avesina Vol.13 No.1/Juni 2019* <http://e-journal.unizar.ac.id>.
- Zakaria. 2014. Analisis Kadar HMF (Hidroxy Methyl Furfural) pada Madu Bone. *Al-Kimia*, 2(1), pp. 1-10. doi: 10.24252/al-kimia.v2i1.1627.



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

PERTANIAN

ISBN 977-250-204-601-5



9 772502 046015