

TESIS

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI KONTAMINAN
Geobacillus stearothermophilus PADA PRODUK
DAGING KEPITING KALENG**

PENELITIAN EKSPLORATIF LABORATORIS



Oleh :

JUNianto Wika Adi Pratama

NIM. 061224253001

**PROGRAM STUDI MAGISTER
ILMU PENYAKIT DAN KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2015**

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI KONTAMINAN
***Geobacillus stearothermophilus* PADA PRODUK**
DAGING KEPITING KALENG

PENELITIAN EKSPLORATIF LABORATORIS

TESIS

Untuk memperoleh gelar Magister
Dalam Program Studi Magister Ilmu Penyakit dan Kesehatan
Masyarakat Veteriner
pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Surabaya

Oleh :

JUNIANTO WIKA ADI PRATAMA

NIM. 061224253001

PROGRAM STUDI MAGISTER
ILMU PENYAKIT DAN KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2015

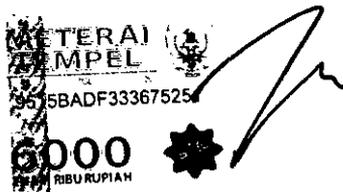
PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Tesis berjudul :

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI KONTAMINAN
***Geobacillus stearothermophilus* PADA PRODUK**
DAGING KEPITING KALENG

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar Magister di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 13 Agustus 2015



JUNianto WIKa ADI PRATAMA
NIM. 061224253001

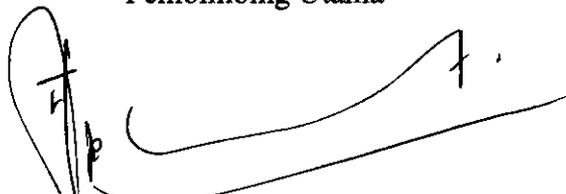
Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI

Tanggal 13 Agustus 2015

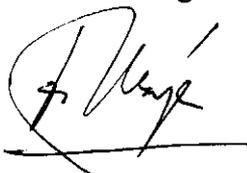
Oleh :

Pembimbing Utama



Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, Drh., MP.
NIP. 196208281989032001

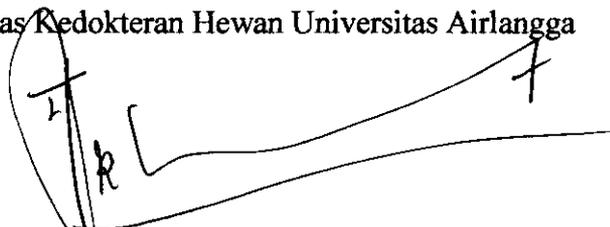
Pembimbing Serta



Dr. Thomas Valentinus Widiyatno., Drh., M.Si.
NIP. 195810171987011001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, Drh., MP.
NIP. 196208281989032001

Tesis ini telah diuji dan dinilai pada

Tanggal 13 Agustus 2015

KOMISI PENGUJI SIDANG TESIS

- Ketua : Dr. E. Bimo Aksono H., Drh., M.Kes.
Sekretaris : Dr. A. T. Soelih Estoepangestie, Drh.
Anggota : Prof. Dr. Nunuk Dyah Retno L., Drh., MS.
Pembimbing Utama : Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, Drh., MP.
Pembimbing Serta : Dr. Thomas Valentinus Widiyatno, Drh., M.Si.

Surabaya, 18 Agustus 2015
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan

Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., Ph.D.
NIP. 195312161978062001

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT yang Maha Pengasih dan Penyayang atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan Tesis dengan judul **Isolasi dan Identifikasi Bakteri Kontaminan *Geobacillus stearothermophilus* pada Produk Daging Kepiting Kaleng.**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Hj. Romziah Sidik, Drh., Ph.D. atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, Drh., MP. selaku dosen pembimbing utama dan ketua program studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner atas perwalian, saran dan bimbingannya sampai penulis menyelesaikan pendidikan Program Magister di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Dr. Thomas Valentinus Widiyatno, Drh., M.Si., selaku dosen pembimbing kedua atas bimbingan, dorongan dan saran yang telah diberikan sampai dengan selesainya tesis ini.

Dr. E. Bimo Aksono H., Drh., M.Kes. selaku dosen pembimbing penelitian dan penguji, yang dengan sabar membimbing, memberikan masukan, serta motivasi yang tiada hentinya.

Dr. A. T. Soelih Estoepangestie, Drh. dan Prof. Dr. Nunuk Dyah Retno L., Drh., MS. selaku dosen penguji yang dengan ikhlas memberikan masukan, saran dan motivasi.

Seluruh staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan, bimbingan dan dorongan semangat serta motivasi selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Kedua orang tua, Miarsono Sigit, Drh., M.P. dan Apriati Dwi Windyastuti, Drh., Mas Tyo, Arif, Citra, Eka Dian Sofiana atas dukungan moral dan doa restu, seluruh teman seperjuangan S2, Mas Ady, Mbak Bitya, Mbak Rury, Savio, Ike, Ayu, Arya, serta semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu tetapi sudah banyak membantu dalam penyusunan skripsi ini, terimakasih banyak atas bantuan kalian.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh sebab itu, kritik dan saran yang bersifat membangun sangat penulis harapkan. Semoga penelitian ini dapat menjadi informasi yang berharga bagi pembaca, dunia kedokteran hewan dan pihak yang membutuhkan.

Surabaya, 17 Agustus 2015

Penulis

RINGKASAN

**Isolasi dan Identifikasi Bakteri Kontaminan *Geobacillus stearothermophilus*
pada Produk Daging Kepiting Kaleng**

Kepiting adalah salah satu komoditas perikanan yang saat ini diminati di pasar internasional. Kepiting banyak disenangi masyarakat karena bergizi tinggi yakni mengandung berbagai nutrisi penting. Kepiting banyak dimanfaatkan baik sebagai konsumsi langsung maupun industri makanan kaleng. Pengalengan pada kepiting dimaksudkan untuk mencegah mikroba berbahaya dalam makanan karena kepiting termasuk salah satu hasil perikanan yang bersifat *perishable food* (mudah rusak/busuk). Pembusukan pada daging kepiting kaleng dapat disebabkan karena kontaminasi mikroba, terutama bakteri termofilik. Sebuah pabrik produsen produk daging kepiting kaleng mengalami masalah pembusukan pada produk daging kepiting kaleng yang diproduksi setelah dilakukan inspeksi oleh bagian *Quality Control* sebelum pemasaran. Produk daging kepiting kaleng yang busuk tersebut tidak mengalami kerusakan mekanis atau kebocoran pada kaleng dan hanya terjadi pada produk daging kepiting kaleng yang baru diproduksi dengan batch produksi yang sama. Setelah dilakukan inspeksi keseluruhan oleh pihak *Quality Control*, diduga proses sterilisasi kurang optimal dan pembusukan terjadi karena adanya kontaminasi bakteri termofilik yang masih bertahan setelah proses sterilisasi.

Geobacillus stearothermophilus merupakan bakteri termofilik pembusuk makanan kaleng yang paling banyak ditemukan. *Geobacillus stearothermophilus* telah dilaporkan dapat menyebabkan penurunan pH, pembusukan secara asam dan sedikit produksi gas pada tomat, susu, daging dan coklat sehingga produk menjadi masam, tengik, hambar. *Geobacillus stearothermophilus* merupakan kontaminan lingkungan yang umum dikenal, dapat membentuk spora, bersifat fakultatif anaerob dan tahan panas atau termofilik sehingga dapat merusak makanan kaleng apabila proses sterilisasi atau pasteurisasi tidak optimal. Karakteristik yang paling penting dari bakteri termofilik seperti *Geobacillus stearothermophilus* adalah kemampuan memproduksi enzim termostabil untuk membantu proses fermentasi atau pembusukan agar memperoleh energi untuk kelangsungan hidup bakteri tersebut. Enzim termostabil yang dihasilkan oleh *Geobacillus stearothermophilus* adalah enzim lipase, sehingga bakteri *Geobacillus stearothermophilus* tetap mampu melakukan proses fermentasi dengan bantuan enzim lipase yang tidak rusak setelah proses pemanasan yang tidak optimal pada makanan kaleng.

Tujuan utama dari penelitian ini adalah untuk mengetahui cemaran *Geobacillus stearothermophilus* pada produk daging kepiting kaleng yang mengakibatkan pembusukan dengan menggunakan uji bakteriologis dan uji PCR menggunakan primer dengan target gen lipase dari *Geobacillus stearothermophilus*. Penelitian dimulai pada Februari 2015 dan berakhir pada Juni 2015. Sampel daging kepiting kaleng didapat dari laboratorium *Tropical Disease Diagnostic Center*, Lembaga Penyakit Tropis, Universitas Airlangga. Pertama-

tama, kaleng daging kepiting diperiksa, kemudian dibuka dan diambil 20 gram untuk pemeriksaan bakteriologis dengan mengambil sampel yang dibawah permukaan secara aseptis, kemudian sisa sampel diperiksa secara organoleptik. Sampel daging kepiting untuk uji bakteriologis ditanam pada *Dextrose Tryptone Agar* dan diinkubasikan pada suhu 50°-55°C selama 48-72 jam. Setelah tumbuh, dilakukan pewarnaan gram dan pemeriksaan morfologi bakteri di bawah mikroskop dengan pembesaran 100x lensa obyektif menggunakan minyak emersi. Kemudian dilanjutkan pemeriksaan biokimia bakteri menggunakan *Oxoid Microbact™ Kit 12A* (H₂S, glucose, mannitol, xylose, indole, VP) + *Kit 12B* (*Sucrose* dan *lactose*). Setelah pemeriksaan selesai, bakteri dikultur pada *Nutrient Agar* untuk dilanjutkan pemeriksaan menggunakan PCR. DNA genom bakteri diekstraksi dari kultur *Nutrient Agar* (setelah di kultur pada *Nutrient Agar* selama 24 jam pada 60°C) dengan menggunakan *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen). Kemudian primer gen Lipase forward (5' – GCAGGAAAAAGCTGAAGCGG – 3') dan reverse (5' – TTTCGACAATGCAGCCGATATGG – 3') diamplifikasi menggunakan PCR. Primer yang digunakan untuk amplifikasi dengan panjang 1403 bp. 20 µl reaksi PCR terdiri dari 12,5 µl *master mix*, *destilated water* 0,5 µl, primer forward (1 µl), primer reverse (1 µl) dan template DNA 5 µl. Siklus PCR diprogram sesuai dengan ketentuan sebagai berikut: Pre-denaturasi 95°C selama 3 menit, Denaturasi dari 95°C selama 30 detik, *Annealing* 52°C selama 30 detik, *Extension* 72°C selama 2 menit, *final Extension* pada 72°C selama 5 menit dengan 35 siklus. Produk PCR dibaca pada 1% gel agarose dengan ethidium bromide dye dibawah UV transilluminator.

Hasil penelitian ini menunjukkan tidak ada kerusakan pada kaleng dan tanggal kadaluarsa masih lama tetapi pada daging kepiting terjadi pembusukan. Hasil pemeriksaan pewarnaan Gram dan morfologi lebih mengarah ke Genus *Geobacillus*, serta menunjukkan prosentase kemiripan sifat biokimia 75% dengan *Geobacillus stearothermophilus*. Hasil dari elektroforesis PCR menunjukkan band 727 bp. Hal ini menunjukkan bahwa adanya kontaminasi *Geobacillus stearothermophilus* daging kepiting kaleng, ditunjukan adanya gen Lipase. Perbedaan panjang band yang muncul kemungkinan dapat disebabkan perbedaan strain sehingga perlu dilakukan sekuensing untuk mengetahui strain yang terdapat pada produk daging kepiting kaleng.

Penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat cemaran atau kontaminasi bakteri *Geobacillus stearothermophilus* pada produk daging kepiting kaleng. Hal tersebut dapat menjadi informasi penting untuk produsen dan konsumen produk daging kaleng tentang cemaran *Geobacillus stearothermophilus* terhadap kesehatan masyarakat veteriner. Untuk mengatasi kontaminasi ulang dari bakteri tersebut perlu pengawasan yang lebih ketat oleh bagian *Quality Control* dari pihak produsen pada proses pra-produksi hingga akhir produksi produk daging kepiting kaleng dan kemungkinan perlu melakukan kalibrasi ulang secara berkala pada alat sterilisasi.

SUMMARY

Isolation and Identification of *Geobacillus stearothermophilus* Contaminant Bacteria in Crab Meat Canned Product

The crab meat is one of the commodity that are currently in demand in the international market. Many people like crab because of high nutritious that contains a variety of important nutrients. Crab widely used as direct consumption or canned food industry. The crab canning intended to prevent harmful microbes in food because the crab is one of the fishery product which are perishable food. Spoilage in crab meat canned can be caused microbial contamination, especially thermophilic bacteria. A manufacturer of crab meat canned products having problems of decay in crab meat canned products are produced after inspection by the Quality Control division before marketing. Crab meat canned products that are spoilage, not mechanical damage or leaks in the cans and only occurs in crab meat canned products newly produced by the same production batch. After overall inspection by the Quality Control, suspected sterilization process is less than optimal and spoilage occur because of contamination thermophilic bacteria that still survive after the sterilization process.

Geobacillus stearothermophilus is thermophilic bacteria spoilage of canned foods most commonly found. *Geobacillus stearothermophilus* has been reported to cause a decrease in pH, acid spoilage and slightly gas production in tomato, milk, meat and chocolate, so that the product becomes sour, rancid, tasteless. *Geobacillus stearothermophilus* is an environmental contaminant that is commonly known, can form spores, facultative anaerobic and heat resistance or thermophilic, which can damage canned food if sterilization or pasteurization process not optimal. The most important characteristic of a thermophilic bacterium like *Geobacillus stearothermophilus* is the ability to produce thermostable enzymes to assist the process of fermentation or spoilage in order to obtain energy for the survival of the bacteria. Thermostable enzymes produced by *Geobacillus stearothermophilus* is a lipase enzyme, so that the bacteria *Geobacillus stearothermophilus* still capable of doing the fermentation process with the help of the enzyme lipase that was not broken after the heating process is not optimal on canned foods.

The main objective of this study was to determine the contamination *Geobacillus stearothermophilus* on crab meat canned products resulting spoilage using bacteriological test and PCR test using a primer with a target is lipase gene of *Geobacillus stearothermophilus*. The research began in February 2015 to June 2015. Samples of crab meat canned obtained from laboratory Tropical Disease Diagnostic Center, Institute of Tropical Disease, Airlangga University. Firstly, crab meat canned is checked, then opened and 20 grams were taken for bacteriological examination by taking samples in aseptic below the surface, and then the rest of the samples were examined by organoleptic. Crab meat samples for bacteriological test are planted on Dextrose Tryptone Agar and incubated at

50°-55°C for 48-72 hours. After growing, Gram staining and morphological examination of bacteria under a microscope with a magnification of 100x objective lens using immersion oil. Then continued bacterial biochemical examination using *Oxoid Microbact*TM Kit 12A (H₂S, glucose, mannitol, xylose, indole, VP) + Kit 12B (Sucrose and lactose). After the inspection is completed, the bacteria were cultured on Nutrient Agar for continued examination using PCR. Genomic DNA was extracted from bacterial cultures Nutrient Agar (after culture on Nutrient Agar for 24 hours at 60°C) using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen). Lipase gene forward primer (5'-GCAGGAAAAGCTGAAGCGG-3') and reverse (5'-TTTCGACAATGCAGCCGATATGG-3') was amplified using PCR. Primers used for amplification with a length of 1403 bp. A 20 µl PCR reaction consisted of 12.5 µl of the *master mix*, 0.5 µl destilated water 0.5 µl , primer of forward (1 µl), primer of reverse A2 (1 µl) with 5 µL of the template DNA. The cycling conditions were as follows: Predenaturation at 95° C for 3 minutes, denaturation at 95°C for 30 seconds, Annealing at 52°C for 30 seconds, extension at 72°C for 2 minute and the final extension step at 72°C for 5 minutes followed by 35 cycles. The PCR products were visualized on an 1% agarose gel with ethidium bromide dye under a UV transilluminator.

The results showed there was no damage to the cans and the expiration date is still long but the crab meat occurs spoilage. Results of the examination Gram staining and morphology leads to genus *Geobacillus*, and shows the percentage of similarity of 75% of biochemical properties with *Geobacillus stearothermophilus*. Results of electrophoresis of PCR showed 727 bp band. This suggests that the contamination of *Geobacillus stearothermophilus* canned crab meat, indicated the existence of Lipase gene. The difference in length band which appears likely to be due to differences strain in the sequencing that needs to be done to determine the strain found in crab meat canned products.

This study shows that there *Geobacillus stearothermophilus* bacterial contamination in crab meat canned products. This can be important information for producers and consumers crab meat canned products about the contamination of *Geobacillus stearothermophilus* on veterinary public health. To resolve bacterial recontamination, need for closer scrutiny by the Quality Control division of the producers in the process of pre-production to final production of crab meat canned products and the possible need to periodically recalibrate the sterilizer.

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *Geobacillus stearothermophilus*
CONTAMINANT BACTERIA IN CRAB MEAT CANNED PRODUCT**

Junianto Wika Adi Pratama

ABSTRACT

The aim of this study was to detect the contamination of *Geobacillus stearothermophilus* in crab meat canned product by using bacteriological test and Polymerase Chain Reaction (PCR). The sample used in this study was commercial crab meat product in the laboratory of Tropical Disease Diagnostic Center, Airlangga University. The isolation and identification of *Geobacillus stearothermophilus* used in the study were include bacteriological method and PCR test. The characteristics of this bacteria were identified as *Geobacillus stearothermophilus* by their morphological characteristics, Grram staining, and biochemical test (H₂S, glucose, xylose, sucrose, lactose, mannitol, indole and Voges-Proskauer) by using *Oxoid Microbact™ Kit (12A + 12B)* within 75% biochemical properties similarity to *Geobacillus stearothermophilus*, while it's lipase gene was amplified in a band of 727 bp.

Keyword: *Geobacillus stearothermophilus*, crab meat canned product, lipase gene.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPEL DALAM	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
HALAMAN PENETAPAN PANITIA PENGUJI.....	v
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vi
RINGKASAN	viii
SUMMARY	x
ABSTRACT	xii
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Permasalahan.....	4
1.3 Tujuan Utama.....	4
1.4 Tujuan Khusus.....	4
1.5 Manfaat Teoritis	4
1.6 Manfaat Praktis	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 <i>Foodborne Disease</i>	6
2.2 Makanan Kaleng	8
2.3 Bakteri Anaerob	13
2.4 <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	14
2.5 HACCP (<i>Hazard Analysis and Critical Control Points</i>)	15
2.6 Metode Pemeriksaan	21
2.6.1 Pemeriksaan Kaleng dan Pemeriksaan Organoleptik Daging Kaleng.....	21
2.6.2 Pemeriksaan Bakteriologis	22
2.6.3 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	23
2.6.2.1 Prinsip Kerja PCR	23
2.6.2.2 Jenis PCR	26
2.6.2.3 Identifikasi Makanan menggunakan PCR.....	27
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL.....	30
3.1 Kerangka Konseptual	30
BAB 4 MATERI DAN METODE.....	33
4.1 Jenis Penelitian.....	33
4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	33

4.3 Materi Penelitian	33
4.3.1 Bahan Penelitian	33
4.3.2 Alat Penelitian	33
4.4 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data	34
4.4.1 Sampel Penelitian	34
4.4.2 Pengumpulan Data	34
4.4.2.1 Pemeriksaan Kaleng Utuh dan Organoleptik	34
4.4.2.2 Pemeriksaan Bakteriologis	35
4.4.2.3 Pemeriksaan PCR	36
4.5 Kerangka Operasional	37
BAB 5 HASIL PENELITIAN	37
5.1 Hasil Pemeriksaan Kaleng Utuh dan Organoleptik Sampel	38
5.1 Hasil Isolasi dan Identifikasi <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	38
5.2 Hasil Identifikasi gen Lipase dengan PCR	42
BAB 6 PEMBAHASAN	43
6.1 Identifikasi <i>Geobacillus stearothermophilus</i> dengan Uji Bakteriologis pada Makanan Kaleng Produk Kepiting	43
6.2 Gen Lipase pada Sampel Makanan Kaleng Produk Kepiting	45
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	48
7.1 Kesimpulan	48
7.2 Saran	48
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN	54

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Primer yang digunakan untuk PCR	36
5.1 Hasil identifikasi <i>Geobacillus sterothermophilus</i> pada uji biokimia.....	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
3.1 Kerangka konseptual	30
4.5 Kerangka operasional	37
5.1 Daging kepiting kaleng yang telah dibuka, warna daging tidak berubah	38
5.2 Uji mikroskopik <i>Geobacillus sterothermophilus</i> dengan pewarnaan Gram, pembesaran 100x lensa obyektif dengan minyak emersi	39
5.3 Pemeriksaan biokimia bakteri menggunakan Oxoid Microbact™ Kit dengan <i>well</i> yang digunakan diberi tanda merah	40
5.4 Hasil elektroforesis product PCR, gen Lipase ditunjukkan dengan adanya pita band pada 727 bp pada sampel <i>G. Stearothermophilus</i> ..	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Pemeriksaan Mikroskopis dengan Pewarnaan Gram	53
2. Pemeriksaan Biokimia dengan menggunakan Oxoid Microbact™ Kit (12A+12B)	54
3. Prosedur Ekstraksi DNA	55
4. Foto kultur murni <i>Geobacillus stearothermophilus</i> dari sampel makanan kaleng produk kepiting pada media <i>Nutrient Agar</i>	56
5. Letak penempelan primer forward gen Lipase <i>Geobacillus stearothermophilus</i> dari sampel kultur produk daging kepiting kaleng.....	57
6. Letak penempelan primer reverse gen Lipase <i>Geobacillus stearothermophilus</i> dari sampel kultur produk daging kepiting kaleng.....	58

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

ATP	= <i>Adenosine Triphosphate</i>
bp	= base pair
CO ₂	= <i>Carbon dioxyde</i>
DNA	= <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	= <i>Deoxynucleotide Triphosphate</i>
g	= Gram
H ₂ O	= <i>Dihydrogen Oxide (Air)</i>
H ₂ S	= <i>Hydrogen Sulfide</i>
Kb	= kilo base
mM	= milimolar
NaCl	= <i>Natrium Chloride</i>
O ₂	= <i>Dioxygen</i>
PCR	= <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pfu	= <i>plague-forming unit</i>
pH	= <i>Power of Hydrogen</i>
™	= Trade Mark
VP	= <i>Voges-Proskauer</i>
X	= kali
μL	= mikroliter
μM	= mikromolar
°C	= derajat celcius
±	= kurang lebih
%	= persen

BAB 1
PENDAHULUAN

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kepiting adalah salah satu komoditas perikanan yang saat ini diminati di pasar internasional. Kepiting banyak disenangi masyarakat karena bergizi tinggi yakni mengandung berbagai nutrien penting. Kepiting banyak dimanfaatkan baik sebagai konsumsi langsung maupun industri makanan kaleng (Catacutan, 2002). Makanan kaleng adalah kemasan kontainer bersegel yang kedap udara dan steril secara komersial. Pengalengan pada kepiting dimaksudkan untuk mencegah mikroba berbahaya dalam makanan karena kepiting termasuk salah satu hasil perikanan yang bersifat *perishable food* (mudah rusak/busuk). Pembusukan pada daging kepiting kaleng dapat disebabkan karena kontaminasi mikroba, terutama bakteri termofilik (Indriyani, 2006; Oranusi *et al.*, 2012). Sebuah pabrik produsen produk daging kepiting kaleng mengalami masalah pembusukan pada produk daging kepiting kaleng yang diproduksi setelah dilakukan inspeksi oleh bagian *Quality Control* sebelum pemasaran. Produk daging kepiting kaleng yang busuk tersebut tidak mengalami kerusakan mekanis atau kebocoran pada kaleng dan hanya terjadi pada produk daging kepiting kaleng yang baru diproduksi dengan batch produksi yang sama. Setelah dilakukan inspeksi keseluruhan oleh pihak *Quality Control*, diduga proses sterilisasi kurang

optimal dan pembusukan terjadi karena adanya kontaminasi bakteri termofilik yang masih bertahan setelah proses sterilisasi.

Bakteri termofilik yang menyebabkan pembusukan pada makanan kaleng yang telah dilaporkan ada beberapa genus, seperti *Clostridium*, *Desulfotomaculum* dan *Geobacillus* (Oranusi *et al.*, 2012). *Geobacillus stearothermophilus* merupakan bakteri termofilik pembusuk makanan kaleng yang paling banyak ditemukan. Menurut Oomus *et al.* (2007), Taormina and Dorsa (2004) dan William *et al.* (2006), *Geobacillus stearothermophilus* telah dilaporkan dapat menyebabkan penurunan pH, pembusukan secara asam dan sedikit produksi gas pada tomat, susu, daging dan coklat sehingga produk menjadi masam, tengik, hambar. *Geobacillus stearothermophilus* merupakan kontaminan lingkungan yang umum dikenal, dapat membentuk spora, bersifat fakultatif anaerob dan tahan panas atau termofilik sehingga dapat merusak makanan kaleng apabila proses sterilisasi atau pasteurisasi tidak optimal (Bhunia, 2008; Oranusi *et al.*, 2012; Oomus *et al.*, 2007). Bakteri *Geobacillus stearothermophilus* yang terdapat dalam kaleng yang tidak bocor dapat dikarenakan kualitas bahan baku yang jelek, kontaminasi saat pra-proses dan tingkat pengawasan mutu yang kurang saat proses produksi (Oranusi *et al.*, 2012).

Karakteristik yang paling penting dari bakteri termofilik seperti *Geobacillus stearothermophilus* adalah kemampuan memproduksi enzim termostabil untuk membantu proses fermentasi atau pembusukan agar

memperoleh energi untuk kelangsungan hidup bakteri tersebut. Enzim termostabil yang dihasilkan oleh *Geobacillus stearothermophilus* adalah enzim lipase, sehingga bakteri *Geobacillus stearothermophilus* tetap mampu melakukan proses fermentasi dengan bantuan enzim lipase yang tidak rusak setelah proses pemanasan yang tidak optimal pada makanan kaleng (Sifour *et al.*, 2010).

Geobacillus stearothermophilus pada makanan kaleng dapat di deteksi menggunakan metode kualitatif, yaitu uji bakteriologis dan uji PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Metode kualitatif pada uji bakteriologis dilakukan dengan beberapa tahapan, meliputi pengkayaan, isolasi, identifikasi dengan reaksi biokimia, morfologis. Metode PCR dapat dilanjutkan setelah pengujian secara bakteriologis. Metode PCR memungkinkan proses analisis DNA menjadi lebih cepat dan lebih spesifik. Urutan DNA dapat digandakan (amplifikasi) dengan PCR hanya dalam waktu beberapa jam sampai kuantitasnya cukup untuk sebuah proses analisis. Metode ini sangat sensitif dan spesifik dalam identifikasi bakteri karena menggunakan primer dengan target gen spesifik bakteri (BPOM, 2008).

Berdasarkan uraian tersebut, peneliti bermaksud ingin mengetahui cemaran *Geobacillus stearothermophilus* pada produk daging kepiting kaleng yang mengakibatkan pembusukan dengan menggunakan uji bakteriologis dan uji PCR menggunakan primer dengan target gen lipase dari *Geobacillus stearothermophilus*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan suatu masalah yaitu, apakah terdapat bakteri kontaminan *Geobacillus stearothermophilus* pada produk daging kepiting kaleng?

1.3 Tujuan Utama

Untuk mengetahui adanya kontaminasi dari *Geobacillus stearothermophilus* pada produk daging kepiting kaleng.

1.4 Tujuan Khusus

1. Mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri kontaminan *Geobacillus stearothermophilus* pada produk daging kepiting kaleng dengan metode uji bakteriologis.
2. Mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri kontaminan *Geobacillus stearothermophilus* pada produk daging kepiting kaleng dengan metode PCR.

1.5 Manfaat Teoritis

Memberikan informasi pentingnya kemasan produk daging kepiting kaleng terhadap kontaminasi *Geobacillus stearothermophilus* setelah diuji menggunakan uji bakteriologis dan PCR.

1.6 Manfaat Praktis

Diharapkan masyarakat lebih teliti dalam memilih produk daging kepiting kaleng yang beredar di pasaran dan pihak produsen produk daging kepiting kaleng melakukan pengawasan yang ketat pada proses pra produksi hingga akhir produksi serta selalu mengkalibrasi berbagai alat produksi secara rutin.

BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Foodborne Disease*

Foodborne disease merupakan penyakit yang disebabkan mengkonsumsi makanan yang mengandung patogen seperti bakteri, virus, parasit atau makanan yang terkontaminasi oleh bahan kimia beracun atau bio-racun (WHO, 2007). Penyakit ini berspektrum luas dengan morbiditas dan mortalitas yang cukup besar di seluruh dunia. *Foodborne disease* merupakan masalah kesehatan masyarakat di negara-negara berkembang dan negara-negara maju. Sulit untuk menentukan data kematian yang tepat terkait dengan penyakit ini (Helms *et al.*, 2003). Lebih dari 250 *foodborne disease* yang berbeda disebabkan oleh berbagai patogen atau toksin (Linscott, 2011). Sebagian besar kasus *foodborne disease* ini ringan dan dapat sembuh sendiri, tetapi kasus yang parah dapat terjadi pada kelompok berisiko tinggi mengakibatkan mortalitas dan morbiditas yang tinggi seperti pada bayi, anak-anak, orang tua dan orang-orang dengan gangguan sistem imunitas (Fleury *et al.*, 2008).

Foodborne disease berdampak pada kesehatan masyarakat serta perekonomian suatu negara (Helms *et al.*, 2003). *Foodborne disease* memiliki dampak negatif pada perdagangan dan industri dari negara-negara yang terkena wabah. *Foodborne disease* dapat menyebabkan penutupan industri makanan yang mengakibatkan hilangnya pekerjaan bagi pekerja, yang berdampak pada perekonomian individu maupun

masyarakat. Selain itu, *foodborne disease* lokal dapat menjadi ancaman global. Kesehatan masyarakat di negara-negara dapat dipengaruhi oleh mengkonsumsi produk makanan yang terkontaminasi, dan dapat memberikan dampak negatif pada industri pariwisata negara itu. Wabah penyakit karena makanan yang terkontaminasi ini sering dilaporkan di tingkat nasional maupun internasional, sehingga pentingnya pengawasan dalam keamanan pangan (WHO, 2007).

Foodborne disease juga memainkan peran penting dalam infeksi baru (*emerging disease*) dan infeksi yang muncul kembali (*re-emerging disease*). Berbagai patogen baru telah muncul karena perubahan dinamika industri makanan. Diperkirakan bahwa selama 60 tahun terakhir, sekitar 30% dari semua infeksi yang muncul terdiri dari patogen ditularkan melalui makanan (Kuchenmüller *et al.*, 2009). Hal ini penting untuk memantau dan menyelidiki *foodborne disease* untuk mengontrol dan mencegahnya. Kontaminasi makanan dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti fisik, kimia, biologi dan dapat terjadi di mana saja di sepanjang rantai makanan. Produsen atau pabrik makanan perlu menerapkan langkah pencegahan kontaminasi. Konsumen juga harus mengambil tindakan pencegahan untuk pencegahan *foodborne disease*. Oleh karena itu, penting bahwa langkah-langkah kebersihan pribadi yang ketat harus diterapkan selama persiapan makanan seperti memasak makanan pada suhu yang tepat dan mengikuti langkah-langkah kebersihan baku, penyimpanan dan pencegahan kontaminasi silang dari makanan. Strategi intervensi terpadu

juga diperlukan untuk mencegah *foodborne disease* di tingkat masyarakat. Keberhasilan pelaksanaan intervensi ini membutuhkan kerjasama lintas sektoral termasuk industri pertanian, industri makanan dan sektor kesehatan (Jahan, 2012).

2.2 Makanan Kaleng

Makanan dalam ilmu kesehatan adalah substrat yang dapat dipergunakan untuk proses di dalam tubuh, terutama untuk membangun dan memperoleh tenaga bagi kesehatan sel tubuh (Irianto dan Kusno, 2004). Berdasarkan cara perolehannya, makanan dapat dibedakan menjadi tiga bagian yaitu (Saparinto dan Hidayati, 2006): (1) Makanan segar, yaitu makanan yang belum mengalami pengolahan yang dapat dikonsumsi langsung ataupun tidak langsung (bahan baku pengolahan pangan), contoh: pisang, apel dan jeruk. (2) Makanan olahan, yaitu makanan hasil proses pengolahan dengan cara atau metode tertentu, dengan atau tanpa bahan tambahan. Makanan olahan bisa dibedakan lagi menjadi makanan olahan siap saji seperti pisang goreng dan tidak siap saji seperti makanan kaleng. (3) Makanan olahan tertentu, adalah pangan olahan yang diperuntukkan kelompok tertentu dalam upaya memelihara dan meningkatkan kualitas kesehatan, contoh: susu rendah lemak untuk orang yang menjalani diet lemak.

Kepiting kaleng merupakan produk laut yang telah melalui proses pengemasan dalam kaleng kedap udara dan diberikan panas untuk mematikan bakteri di dalam serta untuk proses pematangan. Pengalengan

merupakan salah satu jenis metode pengawetan makanan yang mampu memperpanjang usia simpan makanan hingga lima tahun. Ikan, kepiting dan produk hasil laut lainnya merupakan jenis makanan yang memiliki tingkat keasaman yang rendah (pH cenderung tinggi, lebih dari 4.6) sehingga bakteri dapat tumbuh dengan mudah, maka dibutuhkan sterilisasi dengan temperatur tinggi (116 – 130°C) untuk memastikan bakteri yang tumbuh pada produk laut yang dikalengkan. Sumber panas dan cara memanaskan bervariasi, mulai dari penggunaan mulai dari panci bertekanan tinggi hingga paparan uap panas saat pemindahan dengan konveyor (Hendren *et al.*, 2010).

Sterilisasi kaleng dapat mencegah mikroorganisme masuk dan berkembang biak di dalam. Tidak ada metode yang sempurna diandalkan sebagai pengawet selain sterilisasi. Misal, mikroorganisme *Clostridium botulinum*, hanya dapat dihilangkan pada suhu di atas titik didih. Sterilisasi dapat dilakukan sebelum maupun setelah kaleng ditutup. Teknik pengawetan tersebut diperlukan untuk mencegah pembusukan dan memperpanjang umur simpan produk kaleng. Teknik tersebut dirancang untuk menghambat aktivitas bakteri pembusuk dan perubahan metabolik yang menyebabkan hilangnya kualitas dari produk kaleng. Produk kaleng yang membusuk dikarenakan keberadaan bakteri yang mencerna serta mengeluarkan aroma dan rasa yang tidak sedap pada produk kaleng (FAO, 2014).

Nicolas Appert merupakan orang yang mengawali pengalengan bahan makanan dengan yang dimulainya pada tahun 1795. Ketika itu ia bereksperimen dengan mengawetkan makanan di dalam toples kaca tertutup dan merebus toples tersebut (McNeil *and* Day, 1996). Awal masa peperangan Napoleon, pemerintah Prancis menawarkan hadiah kepada mereka yang dapat menemukan cara yang efektif dalam mengawetkan sejumlah besar makanan sebagai suplai dalam peperangan. Nicolas Appert memenangkan hadiah tersebut. Meski Appert memulai metode pengalengan makanan, namun ia sama sekali belum mengetahui apa yang menyebabkan makanan membusuk. 50 tahun kemudian setelah itu, Louis Pasteur menemukan bahwa mikroba menjadi penyebab membusuknya makanan. Gelas yang menjadi bahan pengalengan ketika itu merupakan hambatan dalam transportasi karena mudah pecah, sehingga inventor Peter Durand mengganti toples kaca dengan timah sebagai bahan kaleng dan memulai awal baru pengawetan makanan (Klooster, 2009).

Pengalengan didefinisikan sebagai suatu cara pengawetan bahan pangan yang dikemas secara baik, yaitu kedap terhadap udara, air, mikroba dan benda asing lainnya dalam suatu wadah, yang kemudian disterilkan secara komersial untuk membunuh semua mikroba pathogen penyebab penyakit dan pembusuk. Dalam industri pengalengan makanan, yang diterapkan adalah sterilisasi komersial artinya, walaupun produk tersebut tidak 100% steril, tetap cukup bebas dari bakteri pembusuk dan pathogen (penyebab penyakit), sehingga tahan untuk disimpan selama satu tahun

atau lebih dalam keadaan yang masih layak untuk dikonsumsi (Sitorus, 2010).

Pengalengan bertujuan untuk menghancurkan mikroba berbahaya dalam makanan, namun dengan penanganan yang tidak tepat, kaleng menjadi tempat berkembang biak bagi mikroba. Beberapa makanan kaleng diproses dengan panas yang rendah, dengan demikian makanan kaleng akan rentan terhadap kontaminasi oleh beberapa jenis mikroorganisme berbeda. Kaleng yang rusak dapat terjadi karena kesalahan dalam pembuatan, tidak bisa ditutup dengan benar, bahan pembuatan kaleng yang jelek atau kaleng yang telah dipakai, digunakan kembali (Oranusi *et al.*, 2012). Kejadian pembusukan dalam makanan kaleng cukup rendah, namun hal ini harus diselidiki dengan benar. Selama pembusukan, kaleng dapat berkembang dari kondisi *flat* ke kondisi *flipper*, kemudian ke kondisi *springer*, lalu ke kondisi *soft swell* dan akhirnya ke kondisi *hard swell*. Pembusukan produk karena mikroba dan gas hidrogen, yang dihasilkan oleh interaksi asam dalam produk makanan dengan logam kaleng, adalah penyebab utama penggembungan. Suhu musim panas yang tinggi dan dataran tinggi juga dapat meningkatkan penggembungan pada kaleng. Beberapa mikroorganisme yang tumbuh dalam makanan kaleng, tidak menghasilkan gas dan tidak menyebabkan kaleng mengembang, namun menyebabkan pembusukan pada produk makanan kaleng. Pembusukan biasanya disebabkan oleh pertumbuhan mikroorganisme karena kebocoran

kaleng pada saat diproses. Kebocoran terjadi karena kerusakan kaleng, terkena tusukan atau penanganan yang kasar (Landry *et al.*, 2001).

Kerusakan makanan kaleng dibagi menjadi 5 bagian yaitu, *flat* apabila permukaan kaleng tetap datar dan tidak mengalami kerusakan apapun, tetapi produk di dalam kaleng tersebut sudah rusak dan berbau asam. *Flipper* apabila dilihat sekilas, bentuk kaleng terlihat normal tanpa kerusakan, tetapi bila salah satu ujung kaleng ditekan, maka ujung yang lainnya akan terlihat cembung. *Springer* apabila salah satu ujung kaleng tampak rata dan normal, sedangkan ujung yang lain tampak cembung permanen. *Soft swell* apabila kedua ujung kaleng yang sudah cembung tetapi belum begitu keras sehingga masih bisa ditekan sedikit ke dalam. *Hard Swell* apabila kedua ujung permukaan kaleng sudah cembung dan begitu keras sehingga tidak bisa lagi ditekan ke dalam (Landry *et al.*, 2001).

Penanganan yang tidak tepat pada makanan kaleng yang rusak dapat menyebabkan *foodborne disease*, yaitu gejala penyakit yang timbul akibat mengkonsumsi makanan yang mengandung bahan/senyawa beracun atau organisme patogen (Nurheti, 2007). Keracunan makanan kaleng oleh bakteri dapat berupa intoksifikasi atau infeksi. Intoksifikasi disebabkan oleh toksin bakteri yang terbentuk di dalam makanan pada saat bakteri bermultiplikasi, sedangkan keracunan pangan berupa infeksi disebabkan oleh masuknya bakteri ke dalam tubuh melalui makanan yang terkontaminasi dan tubuh memberikan reaksi terhadap bakteri tersebut.

2.4 *Geobacillus stearothermophilus*

Geobacillus stearothermophilus merupakan bakteri termofilik pembentuk spora yang tumbuh optimal antara 55°C dan 65°C. Bakteri ini berbentuk batang atau basil, dengan rantai pendek atau tunggal dan bersifat motil dengan menggunakan flagella *peritrichous*. Struktur dinding sel gram positif (+), tetapi reaksi pewarnaan gram dapat bervariasi antara positif dan negatif. Spora berbentuk ellipsoidal atau endospora silinder per sel, terletak pada terminal atau subterminal. *Geobacillus stearothermophilus* bersifat fakultatif anaerobik dengan O₂ sebagai akseptor electron. Termofilik obligat dengan kisaran suhu pertumbuhan 37-75°C dan tumbuh optimal pada suhu 55-65°C. Bakteri ini tumbuh normal pada kisaran pH 6,0-8,5 dan optimal pada pH 6,2-7,5 (Nazina *et al.*, 2001).

Klasifikasi bakteri *Geobacillus stearothermophilus* yang sampai saat ini digunakan berdasarkan “*Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli*” oleh Nazina *et al.*, pada tahun 2001 adalah sebagai berikut:

Klasifikasi *Geobacillus stearothermophilus* :

Kingdom : *Bacteria*
Phylum : *Firmicutes*
Class : *Bacilli*
Ordo : *Bacillales*
Family : *Bacillaceae*
Genus : *Geobacillus*
Spesies : *Geobacillus stearothermophilus*

Geobacillus stearothermophilus mempunyai kepentingan di beberapa sektor industri, misalnya sumber enzim dengan stabilitas suhu tinggi, produksi komponen antiviral, indikator biologis untuk kontrol sterilisasi dan penyebab utama pembusukan makanan (Cheng *et al.*, 2009; Guizelini *et al.*, 2012; Rivero *et al.*, 2012). *Geobacillus stearothermophilus* bertanggung jawab pada pembusukan “flat sour” dari makanan kaleng berasam rendah pada temperatur tinggi diatas 40°C. Flat sour dihasilkan dari fermentasi sakarida menjadi asam organik tanpa produksi gas (Durand *et al.*, 2015). Spora *Geobacillus stearothermophilus* dapat bertahan pada pemanasan makanan kaleng dan dapat germinasi serta tumbuh pada produk makanan kaleng (Andre *et al.*, 2013). *Geobacillus stearothermophilus* telah dideteksi pada beberapa bahan mentah dan makanan yang telah diproses serta pada fasilitas proses produksi makanan kaleng (Postollec *et al.*, 2012).

2.5 HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*)

Masalah keamanan pangan masih menjadi masalah penting dalam bidang pangan dan perlu mendapat perhatian khusus dalam program pengawasan pangan. Penyakit yang ditimbulkan melalui makanan (*foodborne disease*) sampai saat ini masih tinggi, walaupun prinsip-prinsip pengendalian untuk berbagai penyakit tersebut pada umumnya telah diketahui. Pengawasan pangan yang mengandalkan pada uji produk akhir tidak dapat mengimbangi kemajuan yang pesat dalam industri pangan dan tidak dapat menjamin keamanan makanan yang beredar di pasaran.

Pengawasan dan pengendalian mutu merupakan faktor penting bagi suatu perusahaan untuk menjaga konsistensi mutu produk yang dihasilkan, sesuai dengan tuntutan pasar, sehingga perlu dilakukan manajemen pengawasan dan pengendalian mutu untuk semua proses produksi. Pengawasan dan pengendalian mutu harus dilakukan sejak awal proses produksi sampai saluran distribusi untuk meningkatkan kepercayaan konsumen, meningkatkan jaminan keamanan produk, mencegah banyaknya produk yang rusak dan mencegah pemborosan biaya akibat kerugian yang ditimbulkan (Rinto dkk., 2009).

Pengawasan mutu adalah kegiatan yang dilakukan untuk menjamin bahwa proses yang terjadi akan menghasilkan produk sesuai dengan tujuan yang diinginkan. Kegiatan pengawasan mutu adalah mengevaluasi kinerja nyata proses dan membandingkan kinerja nyata proses dengan tujuan. Hal tersebut meliputi semua kegiatan dalam rangka pengawasan rutin mulai dari bahan baku, proses produksi hingga produk akhir. Pengawasan mutu bertujuan untuk mencapai sasaran dikembangkannya peraturan di bidang proses sehingga produk yang dihasilkan aman dan sesuai dengan keinginan masyarakat dan konsumen. Pengendalian mutu merupakan alat bagi manajemen untuk memperbaiki mutu produk bila diperlukan, mempertahankan mutu produk yang sudah tinggi dan mengurangi jumlah produk yang rusak. jangka panjang perusahaan yaitu mempertahankan pasar yang telah ada atau menambah pasar perusahaan (Puspitasari, 2004).

Pengawasan dan pengendalian mutu merupakan faktor penting bagi suatu perusahaan untuk menjaga konsistensi mutu produk yang dihasilkan, sesuai dengan tuntutan pasar, sehingga perlu dilakukan manajemen pengawasan dan pengendalian mutu untuk semua proses produksi. Pengawasan dan pengendalian mutu harus dilakukan sejak awal proses produksi sampai saluran distribusi untuk meningkatkan kepercayaan konsumen, meningkatkan jaminan keamanan produk, mencegah banyaknya produk yang rusak dan mencegah pemborosan biaya akibat kerugian yang ditimbulkan. Bahan baku perikanan merupakan produk pangan yang bersifat sensitive terhadap bahaya mikrobiologi, mempunyai resiko sebagai penyebab penyakit dan keracunan karena sangat mudah terkontaminasi oleh mikroorganisme pathogen serta mudah rusak karena komponen penyusunnya yang sangat baik bagi pertumbuhan mikroorganisme sehingga diperlukan penanganan yang baik untuk mencegah resiko ini (Junais dkk., 2011).

Penerapan Sistem Manajemen Keamanan Pangan (SMKP) di perusahaan perlu diwujudkan, karena berkaitan dengan proses menghasilkan produk yang bermutu. Salah satu pendekatan yang digunakan guna mencapai sasaran tersebut adalah dengan menerapkan konsep *Hazard Analysis Critical Control Point* (HACCP) dalam upaya perbaikan serta meningkatkan mutu hasil produksi. Titik kritis pengolahan produk perlu diketahui untuk memberikan jaminan keamanan yang memadai. Sistem HACCP bersifat preventif dan inovatif yang

mengutamakan tindakan pencegahan dari bahan baku, proses produksi, produk jadi hingga distribusi, merupakan pedoman untuk menjamin mutu yang sehat dan aman untuk dikonsumsi (Junais dkk., 2011).

HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) adalah suatu sistem jaminan keamanan pangan yang mendasarkan kepada suatu kesadaran bahwa bahaya (hazard) berpeluang timbul pada berbagai titik atau tahap produksi, dan harus dikendalikan untuk mencegah terjadinya bahaya-bahaya tersebut. Kunci utama HACCP adalah antisipasi bahaya dan identifikasi titik pengawasan yang mengutamakan pada tindakan pencegahan dan tidak mengandalkan pada pengujian produk akhir. Sistem HACCP bukan merupakan sistem jaminan keamanan pangan yang tanpa resiko. HACCP dirancang untuk meminimumkan risiko bahaya keamanan pangan dalam suatu proses produksi pangan. Sistem HACCP juga merupakan suatu alat manajemen risiko yang digunakan untuk melindungi rantai pasokan pangan dan proses produksi terhadap kontaminasi bahaya-bahaya mikrobiologis, kimia dan fisik (Koswara, 2009).

Penerapan HACCP di industri pangan bersifat spesifik untuk setiap jenis produk, setiap proses dan setiap pabrik. Disamping itu diperlukan prasyarat dasar berupa penerapan GMP dan SSOP. Faktor penting untuk suksesnya penerapan HACCP dalam industri pangan adalah sangat ditentukan oleh komitmen manajemen untuk menyediakan makanan aman. *Good Manufacturing Practices* (GMP) adalah suatu pedoman cara berproduksi makanan yang bertujuan agar produsen memenuhi

persyaratan-persyaratan yang telah ditentukan untuk menghasilkan produk makanan bermutu, baik dan aman secara konsisten. GMP adalah persyaratan minimal sanitasi dan pengolahan yang harus diaplikasikan oleh produksi pangan. GMP merupakan titik awal untuk mengendalikan resiko keamanan pangan (Junais dkk., 2011). *Sanitation Standard Operating Procedure* (SSOP) adalah prosedur tertulis yang harus digunakan oleh pemroses pangan untuk memenuhi kondisi dan praktek sanitasi. SSOP merupakan bagian penting dari program prasyarat untuk sistem *Hazard Analysis Critical Control Point* (CAC,2003). *Hazard Analysis Critical Control Point* (HACCP) adalah suatu pendekatan produksi pangan yang higienis dengan pencegahan masalah. Proses produksi dievaluasi terhadap bahaya dan resiko yang terkait (Hayes dan Forsythie, 2001). Sistem HACCP merupakan suatu sistem yang mengidentifikasi bahaya spesifik yang mungkin timbul dalam mata rantai produksi makanan dan tindakan pencegahan untuk mengendalikan bahaya tersebut dengan tujuan untuk menjamin keamanan pangan dan menetapkan sistem pengendaliannya yang diarahkan pada tindakan pencegahan dan tidak bergantung pada pengujian produk akhir (Muhandri dan Kadarisman, 2006).

Untuk setiap bahaya yang signifikan maka harus ditetapkan apakah suatu Titik Kendali Kritis atau bukan. Titik kendali kritis adalah suatu tahap atau prosedur dimana pengendalian dapat diterapkan dan bahaya keamanan pangan dapat dicegah, dihilangkan atau dikurangi sampai

tingkat yang dapat diterima sehingga resiko dapat diminimalkan. Apabila tahap ini tidak dapat dikendalikan maka dapat menimbulkan bahaya keamanan pangan. Tim HACCP menetapkan dimana bahaya-bahaya yang tinggi risikonya dapat dikendalikan. CCP dapat diidentifikasi dengan menggunakan pengetahuan tentang proses produksi dan semua potensi bahaya dan signifikasi bahaya dari analisa bahaya serta tindakan pencegahan yang ditetapkan. Untuk membantu menemukan dimana seharusnya CCP yang benar, dapat digunakan Diagram Pohon Keputusan CCP (*CCP Decision Tree*). Diagram pohon keputusan adalah seri pertanyaan logis yang menanyakan setiap bahaya. Jawaban dari setiap pertanyaan akan memfasilitasi dan membawa Tim HACCP secara logis memutuskan apakah CCP atau bukan (Koswara, 2009).

Langkah-langkah dalam metode HACCP antara lain adalah (1) Pembentukan tim HACCP, (2) Pendeskripsian produk dan cara distribusinya, (3) pengidentifikasian pengguna yang dituju, (4) pembuatan diagram alir, (5) konfirmasi diagram alir di lapangan, (6) analisis bahaya dan cara pencegahannya, (7) penetapan *Critical Control Point* (CCP), (8) penetapan batas kritis atau *Critical Limit* untuk setiap CCP, (9) pemantauan atau monitoring CCP, (10) tindakan koreksi terhadap penyimpangan, (11) penetapan dokumentasi dan pemeliharaan. Tahapan terakhir metode HACCP adalah penetapan prosedur verifikasi terhadap produk pangan tersebut (Gaspersz, 2002).

Penerapan HACCP sebagai alat pengatur keamanan pangan dapat memberikan keuntungan, yaitu mencegah terjadinya bahaya sebelum mencapai konsumen, meminalkan risiko kesehatan yang berkaitan dengan konsumsi makanan, meningkatkan kepercayaan akan keamanan makanan olahan sehingga secara tidak langsung mempromosikan perdagangan dan stabilitas usaha makanan (Sudarmaji, 2005). *Hazard Analysis and Critical Control Points* (HACCP) merupakan salah satu cara dari perusahaan produsen penghasil produk pangan untuk menjalankan keamanan pangan agar sesuai dengan keinginan konsumen yang mengerti pentingnya mutu produk dan keamanan pangan serta mendapatkan haknya sebagai pengonsumsi produk aman dan terjamin mutunya (Sutrisno dkk, 2013).

2.6 Metode Pemeriksaan

2.6.1 Pemeriksaan Kaleng dan Pemeriksaan Organoleptik Daging Kaleng

Pemeriksaan kaleng pada umumnya meliputi pemeriksaan secara fisik dari luar kaleng, seperti ada atau tidak kebocoran, menggelembung, berkarat, penyok atau melelekan ke dalam, warna kaleng. Pada makanan kaleng, perlu juga diperiksa tanggal kadaluarsa dan komposisi dari makanan kaleng tersebut. Sedangkan untuk pemeriksaan organoleptik dari daging kaleng dilakukan secara aseptis dengan lingkungan yang steril, dianjurkan menggunakan *vertical laminar flow hood*. Pemeriksaan daging kaleng meliputi bau, tekstur, konsistensi, warna dan tidak boleh merasakan produk untuk uji rasa. Segera ambil sampel di bagian bawah yang belum

terkena oksigen setelah kaleng dibuka untuk pemeriksaan bakteriologis (Landry *et al.*, 2001).

2.6.2 Pemeriksaan Bakteriologis

Pemeriksaan bakteriologis meliputi pemeriksaan secara kuantitatif dan kualitatif. Pada pemeriksaan secara kuantitatif dilakukan penghitungan jumlah bakteri pada suatu sampel. Contoh dari pemeriksaan secara kuantitatif adalah Angka Lempeng Total (ALT) dan Most Probable Number (MPN). Penanaman bakteri pada ALT dengan menggunakan cara tetes, cara tuang dan cara sebar di media padat dengan hasil akhir berupa koloni yang dapat diamati secara visual dan dihitung dengan interpretasi hasil berupa angka dalam koloni (cfu) per ml/g atau koloni/100ml. Terdapat 2 cara pada MPN yaitu metode 3 tabung dan metode 5 tabung, kemudian menggunakan media cair dengan tiga replikasi dengan hasil akhir berupa kekeruhan atau perubahan warna dan atau pembentukan gas yang juga dapat diamati secara visual dan interpretasi hasil merujuk pada tabel MPN. Pada pemeriksaan secara kualitatif dilakukan perbanyakan terlebih dahulu dari bakteri. Beberapa tahap pada metode kualitatif yang dilakukan yaitu tahap pengkayaan (*enrichment*), tahap isoasi pada media selektif dan pewarnaan gram, tahap identifikasi dengan reaksi biokimia, dan dilanjutkan dengan analisa antigenik atau serologis atau imunologis (BPOM, 2008).

2.6.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Reaksi berantai polimerase (Polymerase Chain Reaction, *PCR*) adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuens nukleotida tertentu dengan cara *in vitro*. Metode ini pertama kali dikembangkan pada tahun 1985 oleh Kary B. Mullis seorang peneliti di perusahaan *CETUS Corporation*. Metode ini sekarang telah banyak digunakan untuk berbagai macam manipulasi dan analisis genetik. Pada awal perkembangannya metode ini hanya digunakan untuk melipatgandakan molekul *DNA*, tetapi kemudian dikembangkan lebih lanjut sehingga dapat digunakan pula untuk melipatgandakan kuantitas molekul *mRNA* (Yuwono, 2006).

PCR adalah teknologi canggih yang dapat mendeteksi *DNA* dengan cara amplifikasi *DNA*. Hasil pemeriksaan *PCR* dapat membantu untuk menegakkan diagnosa sepanjang pemeriksaan tersebut dikerjakan dengan cara yang benar dan sesuai dengan standar internasional. Amplifikasi *DNA* pada *PCR* dapat dicapai bila menggunakan primer oligonukleotida yang disebut amplimers. Primer *DNA* suatu sekuens oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai *DNA*. *PCR* memungkinkan dilakukannya pelipatgandaan suatu fragmen *DNA*. Umumnya primer yang digunakan pada *PCR* terdiri dari 20-30 nukleotida (Yusuf, 2010).

2.6.3.1 Prinsip Kerja *PCR*

Reaksi pelipatgandaan suatu fragmen *DNA* dimulai dengan melakukan denaturasi *DNA* template (cetakan) sehingga rantai *DNA* yang

berantai ganda akan terpisah menjadi rantai tunggal. Denaturasi *DNA* dilakukan dengan menggunakan panas (95°C) selama 1-2 menit, kemudian suhu diturunkan menjadi 55°C sehingga primer akan “menempel” (annealing) pada cetakan yang telah terpisah menjadi rantai tunggal. Primer akan membentuk jembatan hidrogen dengan cetakan pada daerah sekuen yang komplementer dengan sekuen primer. Suhu 55°C yang digunakan untuk penempelan primer pada dasarnya merupakan kompromi. Amplifikasi akan lebih efisien jika dilakukan pada suhu yang lebih rendah (37°C) tetapi biasanya akan terjadi misspriming yaitu penempelan primer pada tempat yang salah. Pada suhu yang lebih tinggi (55°C) spesifisitas reaksi amplifikasi akan meningkat, tetapi secara keseluruhan efisiensinya akan menurun. Reaksi ini dilakukan berulang-ulang sampai 25-30 kali (siklus) sehingga pada akhir siklus akan didapatkan molekul-molekul *DNA* rantai ganda yang baru hasil polimerasi dalam jumlah yang jauh lebih banyak dibandingkan jumlah *DNA* cetakan yang digunakan (Yuwono, 2006).

Proses pelipatgandaan *DNA* oleh *PCR* ini meliputi tiga tahapan proses utama, yaitu (Sudjadi, 2008): **(1) Proses pertama** melepaskan rantai ganda *DNA* menjadi dua rantai tunggal *DNA* melalui proses denaturasi. Proses denaturasi *DNA* dilakukan dengan cara menaikkan suhu sampai 95°C . Sebelum proses denaturasi ini, biasanya diawali dengan proses denaturasi inisial untuk memastikan rantai *DNA* telah terpisah sempurna menjadi rantai tunggal. **(2) Proses kedua** adalah *annealing* atau

pemasangan 2 rantai primer pada kedua rantai *DNA* tersebut. Primer berfungsi sebagai pancingan awal dalam pelipatgandaan segmen *DNA*. Primer terdiri dari 18 - 24 deret basa nukleotida pengode *DNA* [adenin (A), guanin (G), sitosin (C), dan timin (T)] yang disintesis secara artifisial dan biasanya dapat dipasangkan dengan *DNA* yang akan dideteksi. Proses pemasangan primer dengan *DNA* yang akan dideteksi ini membutuhkan suhu optimum sesuai kebutuhan primer tersebut. Biasanya dengan cara menurunkan suhu antara 37°C-60°C. (3) **Proses ketiga** disebut ekstension atau perpanjangan. Pada proses ini deoksinukleotida trifosfat (*dNTP*), yang sebelumnya telah ditambahkan dalam pereaksi, menyebabkan primer yang tadinya hanya 18 sampai 24 deret basa nukleotida akan memperoleh tambahan basa nukleotida yang terdapat di *dNTP* dan kemudian menjadi sepanjang segmen *DNA* yang dilipatgandakan itu. Proses ini dibantu oleh adanya enzim *DNA* polimerase dan enzim ini bekerja optimum pada suhu 72°C. *dNTP* merupakan kumpulan 4 jenis basa nukleotida (A,G,C, dan T) yang terikat pada 3 gugus fosfat dan masing-masing berdiri bebas sampai enzim *DNA* polimerase mengkatalis pengikatan nya pada primer. Setelah siklus *PCR* berakhir, proses *final extension* dilakukan selama 5-15 menit pada suhu yang sama dengan proses ekstensi untuk menjamin semua rantai tunggal *DNA* telah penuh terbentuk. Ketiga proses ini dilakukan berulang-ulang sampai jumlah kelipatan segmen *DNA* sesuai dengan kebutuhan.

2.6.3.2 Jenis *PCR*

Produk *PCR* dapat diidentifikasi melalui ukurannya dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. Keunggulan *PCR* dikatakan sangat tinggi. Hal ini didasarkan atas spesifitas, efisiensi dan keakuratannya. Teknik *PCR* dapat dimodifikasi ke dalam beberapa jenis (Yusuf, 2010): (1) *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP); metode ini digunakan untuk membedakan bakteri berdasarkan analisis model derivat dari perbedaan *DNA*. (2) *Inverse-PCR*, metode ini digunakan ketika hanya satu sekuen internal yang diketahui. Template didigesti dengan enzim restriksi yang memotong bagian luar daerah yang akan diamplifikasi, fragmen restriksi yang dihasilkan ditempelkan dengan ligasi dan diamplifikasi dengan menggunakan sekuen primer yang memiliki titik ujung yang memiliki jarak yang jauh satu sama lain dengan segmen eksternal yang telah tergabung. Metode ini khusus digunakan untuk mengidentifikasi "sekuen antara" dari beragam gen. (3) *Nested-PCR*, proses ini memungkinkan untuk mengurangi kontaminasi pada produk selama amplifikasi dari penyatuan primer yang tidak diperlukan. Dua set primer digunakan untuk mendukung metode ini, set kedua mengamplifikasi target kedua selama proses pertama berlangsung. Sekuens *DNA* target dari satu set primer yang disebut *primer inner* disimpan di antara sekuens target set kedua dari primer yang disebut sebagai *outer primer*. Pada prakteknya, reaksi pertama dari *PCR* menggunakan *outer primer*, lalu reaksi *PCR* kedua dilakukan dengan *inner*

primer atau *nested primer* menggunakan hasil dari produk reaksi yang pertama sebagai target amplifikasi. *Nested primer* akan menyatu dengan produk *PCR* yang pertama dan menghasilkan produk yang lebih pendek daripada produk yang pertama. (4) *Quantitative-PCR*; digunakan untuk pengukuran berulang dari hasil produk *PCR*. Metode ini secara tidak langsung digunakan untuk mengukur kuantitas, dimulai dari jumlah *DNA*, *cDNA*, atau *RNA*. Hasil dari metode ini juga menampilkan copy dari sampel. (5) *Reverse Transcriptase (RT-PCR)*; metode ini digunakan untuk amplifikasi, isolasi atau identifikasi sekuen dari sel atau jaringan *RNA*. Metode ini dibantu oleh *reverse transcriptase* (mengubah *RNA* menjadi *cDNA*), mencakup pemetaan, menggambarkan kapan dan dimana gen diekspresikan. (6) *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)* bertujuan untuk mendeteksi *polimorfisme* pada tingkat *DNA*. Metode ini dikembangkan oleh Welsh and Mc Clelland (1990) dengan cara mengkombinasikan teknik *PCR* menggunakan primer-primer dengan sequens acak untuk keperluan amplifikasi lokus acak dari genom.

2.6.3.3 Identifikasi Makanan menggunakan *PCR*

Ketersediaan amplifikasi *DNA* dan metode sekuensing cepat, akurat dan nyaman telah membuat analisis *DNA* menjadi pilihan yang layak untuk berbagai jenis identifikasi. Di bidang pengujian makanan, *qPCR* dan metode sekuensing canggih telah diterapkan untuk mengembangkan metode yang sensitif untuk identifikasi yang akurat dari komponen makanan dan deteksi yang tepat dari kontaminan. Kemajuan

dalam kedua teknik selama dekade terakhir telah memungkinkan untuk mengidentifikasi bahan pada karakterisasi tingkat-molekul dengan tepat dari setiap *DNA-based* yang dipresentasikan dalam bahan makanan (Promega, 2013).

Selama beberapa tahun terakhir, analisis *qPCR* berbasis *DNA* telah berhasil digunakan untuk berbagai pengujian makanan termasuk pengujian *GMO* (Mazza *et al.*, 2005) identifikasi spesies dalam produk campuran daging dan pakan ternak (Fumière *et al.*, 2006; Cammà *et al.*, 2012), dan deteksi kontaminan mikroba (Malorny *et al.*, 2004; Heller *et al.*, 2003). Pada Maret 2013, para peneliti di *Johannes Gutenberg University, Mainz* mengumumkan metode pengujian makanan baru berbasis sekuensing "*All food seq*" yang menggunakan sekuensing genom utuh/bioinformatika untuk mencoba untuk mengidentifikasi semua *DNA* dalam makanan. Dibandingkan dengan metode yang lebih tua seperti pemeriksaan mikroskopis, analisis protein dan kultur mikroba, *qPCR* dan metode pengujian makanan berbasis sekuensing memberikan keuntungan seperti penghematan waktu, spesifisitas, sensitivitas dan kesesuaian untuk otomatisasi (Promega, 2013).

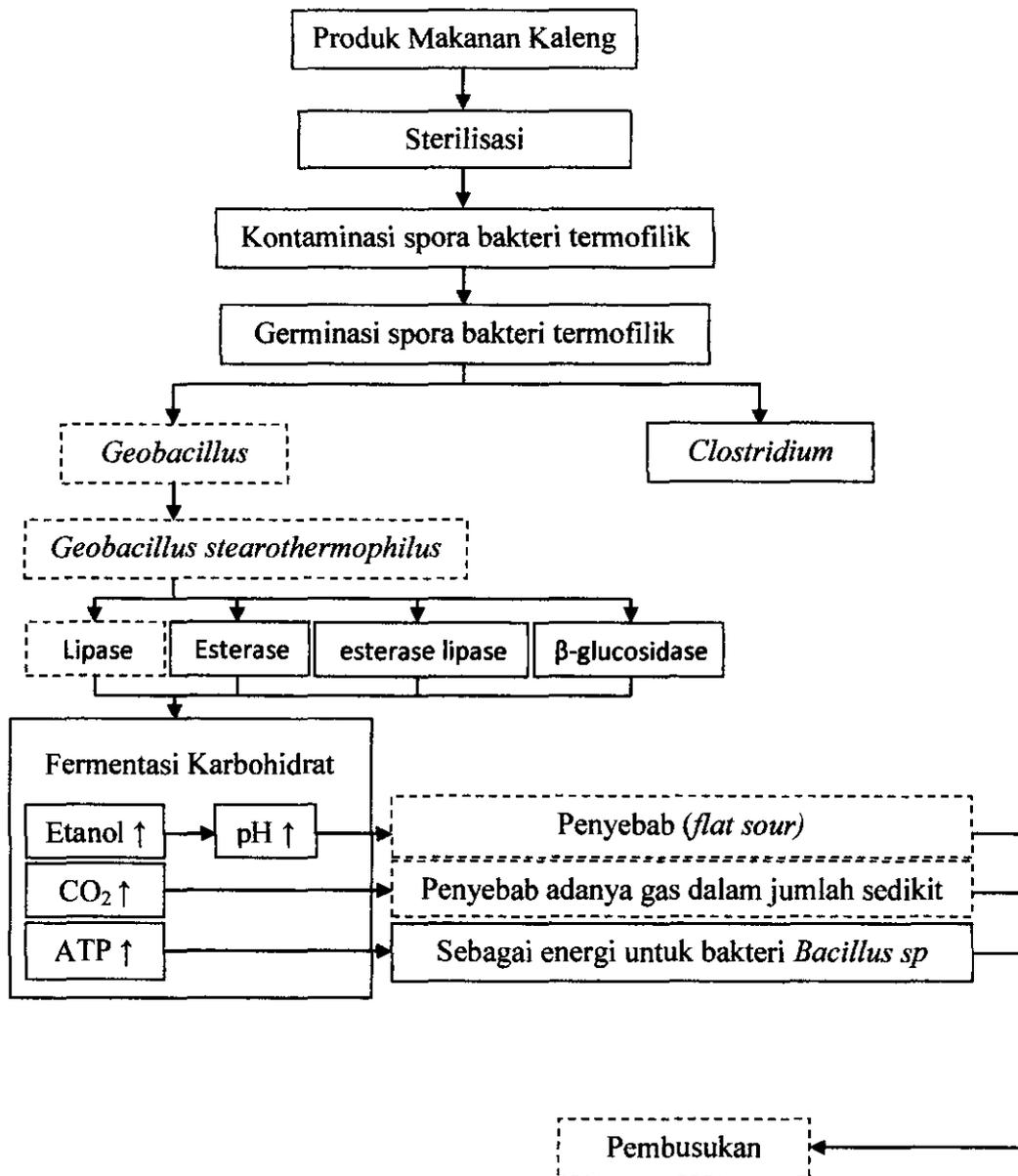
Isolasi *DNA* dari makanan menggunakan protokol tradisional dapat menjadi proses yang panjang dan berpotensi berbahaya. Ketersediaan metode cepat yang menghindari paparan pelarut berbahaya dan memungkinkan isolasi *DNA* yang lebih efisien dan sukses dari makanan dan memberikan kontribusi untuk keberhasilan analisis *qPCR*. Metode

pemurnian *DNA* harus mampu memurnikan *DNA* dari potensi inhibitor *PCR* yang dipresentasikan dalam bahan makanan, dan juga harus mampu memurnikan *DNA* yang mungkin telah terfragmentasi selama pengolahan makanan, seperti memasak, pengawetan atau sterilisasi (Bauer *et al.*, 2004; Elke *et al.*, 2002). Oleh karena itu, pilihan metode pemurnian *DNA*, serta pilihan target *PCR* dapat sangat mempengaruhi keberhasilan dalam analisis makanan, tergantung pada bahan makanan tertentu dan *DNA* target yang terlibat (Promega, 2013).

BAB 3
KERANGKA KONSEPTUAL

BAB III KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN

3.1 Diagram Kerangka Konseptual Penelitian



Makanan kaleng adalah kemasan kontainer bersegel yang kedap udara dan steril secara komersil (Oranusi *et al*, 2012). Pengalengan merupakan salah satu cara untuk menyelamatkan bahan makanan, terutama ikan dan hasil perikanan lainnya dari pembusukan. Produk makanan kaleng merupakan produk yang paling diminati dan bisa disimpan dalam waktu yang lama. Makanan kaleng membutuhkan penanganan yang lebih intensif serta ditunjang dengan peralatan yang serba otomatis. Salah satu kelemahan dari produk makanan kaleng adalah terjadi kontaminasi bakteri yang menyebabkan makanan kaleng menjadi rusak apabila proses sterilisasi atau pasteurisasi tidak optimal yang dapat menyebabkan pembusukan. Bakteri yang sering ditemukan dalam pembusukan makanan kaleng adalah bakteri termofilik seperti *Clostridium sp.* dan *Geobacillus sp.* (Oranusi *et al.*, 2012).

Umumnya bahan pangan hewani mengandung protein yang cukup. Selain itu juga mengandung karbohidrat, asam laktat dan vitamin. Sehingga komponen-komponen tersebut dapat dengan cepat digunakan oleh mikroba dalam metabolismenya. Salah satu akibat dari proses metabolisme tersebut adalah pembusukan (BPOM, 2008).

Geobacillus stearothermophilus merupakan salah satu spesies dari genus *Geobacillus* yang berspora dan bersifat termofilik dan dapat menyebabkan pembusukan pada makanan kaleng serta sering digunakan sebagai indikator biologis untuk kontrol sterilisasi (Guizelini *et al.*, 2012; Rivero *et al.*, 2012). Produk makanan kaleng sering menyebabkan spora

bakteri pembusuk genus *Geobacillus stearothermophilus* mengalami germinasi, hal tersebut dikarenakan oleh perlakuan panas yang tidak cukup. Suhu pertumbuhan optimal pada *Geobacillus stearothermophilus* sekitar 55-65°C. Pembusukan terjadi karena *Geobacillus stearothermophilus* memfermentasikan karbohidrat yang ada pada makanan kaleng dan memproduksi asam serta menghasilkan sedikit gas. Pada proses fermentasi karbohidrat, *Geobacillus stearothermophilus* memproduksi beberapa enzim seperti *lipase*, *esterase*, *esterase lipase* dan *β-glucosidase* untuk pemecahan karbohidrat dan menghasilkan asam serta energi untuk *Geobacillus stearothermophilus* sendiri (Nazina *et al.*, 2001; Ledenbach *and* Marshall, 2009).

BAB 4

MATERI DAN METODE

BAB IV MATERI DAN METODE

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini termasuk penelitian eksploratif laboratorik yaitu penelitian yang bertujuan untuk memperdalam pengetahuan mengenai dugaan yang sifatnya masih baru dengan memanfaatkan alat-alat laboratorik.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pengujian dilakukan di laboratorium Biologi Fakultas Sains Teknologi dan laboratorium *Tropical Disease Diagnostic Center*, Lembaga Penyakit Tropis, Universitas Airlangga. Penelitian dilakukan pada Februari 2015 – Juni 2015.

4.3 Materi Penelitian

4.3.1 Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini berupa daging kepiting kaleng. Bahan lainnya adalah *Dextrose Tryptone Agar*, *Nutrient Agar*, NaCl fisiologis, pewarna Gram, proteinase K, PCR buffer, larutan dNTP, DNA polymerase, Primer PCR *Geobacillus stearothermophilus* lipase gene, DNA *template*, *Master Mix*, aquades, gel agarose, dan ethidium bromide.

4.3.2 Alat penelitian

Peralatan yang digunakan untuk isolasi bakteri adalah *autoclave*, *vertical laminar flow hood*, *Bacti-Disc cutter*, timbangan, Erlenmeyer,

pipet steril, pipet Mohr, inkubator, mikroskop, *Oxoid Microbact™ Kit (12A + 12B)*. Peralatan yang digunakan untuk ekstraksi DNA, amplifikasi dengan *Polymerase Chain Reaction*, dan elektroforesis meliputi cawan Petri, tabung reaksi, thermal cycler PCR (*eppendorf*), sentrifus, transluminator-UV, vortex, gel electrophoresis apparatus (Biorad), inkubator, dan *autoclave*.

4.4 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data

4.4.1 Sampel Penelitian

Sampel diperoleh dari laboratorium *Tropical Disease Diagnostic Center*, Lembaga Penyakit Tropis, Universitas Airlangga.

4.4.2 Pengumpulan Data

4.4.2.1 Pemeriksaan Kaleng Utuh dan Organoleptik

Kondisi kaleng diperiksa dahulu sebelum dibuka dengan cara melihat keseluruhan permukaan kaleng, dimulai dengan melihat tanggal kadaluarsa, komposisi dari makanan kaleng, warna kaleng, kondisi fisik kaleng termasuk tanda kebocoran, berkarat, mengembung ataupun melekok. Setelah itu kaleng dibuka pada *vertical laminar flow hood* agar didapatkan lingkungan aseptis dan sampel untuk uji bakteriologis diambil terlebih dulu sebelum diperiksa organoleptik dengan mengambil bagian daging dibawah permukaan dan semua dilakukan secara aseptis. Kemudian sampel diperiksa secara organoleptik yaitu dengan cara sampel daging kepiting dicium untuk mengetahui aroma, daging kepiting sampel

diambil sedikit untuk mengetahui perubahan warna, tekstur dan konsistensi pada sampel daging kepiting.

4.4.2.2 Pemeriksaan Bakteriologis

Setelah pemeriksaan organoleptik, sampel makanan kaleng dimasukkan ke dalam Erlenmeyer steril ukuran 20 ml sebanyak 250 gram. Kemudian air ditambahkan sampai volume 100 ml dan dikocok hingga larutan menjadi homogen. Larutan diambil sebanyak 10 ml dengan pipet dan dipindahkan ke dalam Erlenmeyer 300 ml yang berisi 10 ml *Dextrose Tryptone Agar* di dalam penangas air pada suhu 50°-60°C. Erlenmeyer digoyang-goyangkan di dalam penangas air selama 3 menit supaya larutan menjadi kental. Kemudian Erlenmeyer dimasukkan di dalam *autoclave* dan dipanaskan pada suhu 108,4°C selama 10 menit. Sesudah dipanaskan, Erlenmeyer digoyangkan pelan-pelan dan didinginkan segera. Larutan dituangkan ke dalam 5 Petri dan ditunggu hingga menjadi padat, kemudian permukaannya dilapisi dengan agar steril 2%. Setelah agar memadat, Petri diinkubasikan secara terbalik pada suhu 50°-55°C selama 48-72 jam. Setelah tumbuh, dilakukan pewarnaan gram dan pemeriksaan morfologi bakteri di bawah mikroskop dengan pembesaran 100x lensa obyektif menggunakan minyak emersi. Kemudian dilanjutkan pemeriksaan biokimia bakteri menggunakan *Oxoid Microbact™ Kit 12A* (H₂S, *glucose*, *mannitol*, *xylose*, *indole*, VP) + *Kit 12B* (*Sucrose* dan *lactose*). Setelah pemeriksaan selesai, bakteri dikultur pada *Nutrient Agar* untuk dilanjutkan pemeriksaan menggunakan PCR.

4.4.2.3 Pemeriksaan PCR

a. Ekstraksi DNA

DNA genom bakteri diekstraksi dari kultur *Nutrient Agar* (setelah di kultur pada *Nutrient Agar* selama 24 jam pada 60°C) dengan menggunakan *DNeasy Blood and Tissue Kit* (QIAGEN, Hilden Jerman), digunakan sesuai instruksi manufaktur (QIAGEN, 2006).

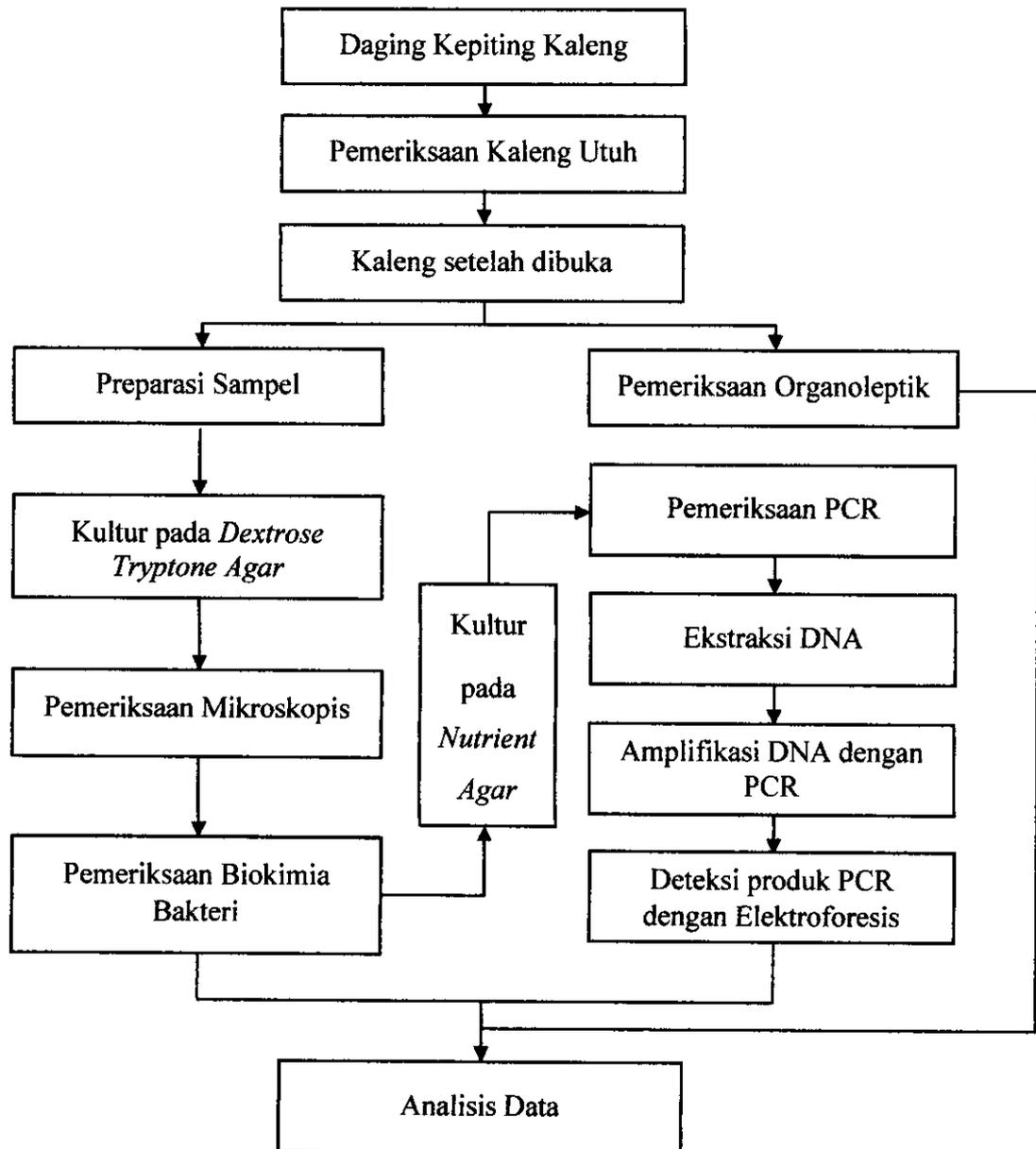
b. Reaksi PCR dan Elektrophoresis

Gen Lipase diamplifikasi dalam 50 μL dari larutan campuran reaksi yang mengandung 0.5 μL dari 2U/ μL *pfu DNA polymerase*, 1 μL dari 20 μM primer *forward/reverse*, 1.5 μL DNA kromosom *Geobacillus stearothermophilus* yang digunakan sebagai *template*, 5 μL 10mM campuran *deoxynucleotide triphosphate* (dNTP), 5 μL 10X PCR *reaction buffer*, dan 36 μL aquades. Siklus PCR diprogram sesuai dengan ketentuan sebagai berikut: denaturasi awal pada 95°C selama 3 menit, diikuti oleh 35 siklus masing-masing terdiri dari 95°C selama 30 detik, 52°C selama 30 detik dan 72°C selama 2 menit dengan langkah ekstensi akhir pada 72°C selama 5 menit dalam Eppendorf thermal cycler. Produk amplifikasi dianalisis dengan elektroforesis melalui 1% gel agarose selama 30 menit (Kadhim *et al.*, 2013).

Tabel 4.1 Primer yang digunakan untuk PCR (Kadhim *et al.*, 2013)

Primer	Sekuen (‘5-3’)	Panjang Nukleotida
Forward	5’ – GCAGGAAAAAGCTGAAGCGG – 3’	1403
Reverse	5’ – TTTCGACAATGCAGCCGATATGG – 3’	

4.5 Kerangka Operasional



BAB 5
HASIL PENELITIAN

BAB V HASIL PENELITIAN

5.1. Hasil Pemeriksaan Kaleng Utuh dan Organoleptik Sampel

Berdasarkan pemeriksaan kaleng utuh, tidak ditemukan adanya kerusakan fisik, tidak mengembung, tidak berkarat, tidak bocor dan tanggal kadaluarsa masih lama serta komposisi dari daging kepiting mengandung *sodium acid pyrophosphates*, sedangkan pemeriksaan organoleptik pada sampel didapatkan daging kepiting dengan aroma yang busuk, warna daging tidak berubah, konsistensi dan tekstur yang normal serta adanya sedikit gas, sehingga kaleng tidak mengembung. Gambar daging kepiting kaleng dapat dilihat pada gambar 5.1

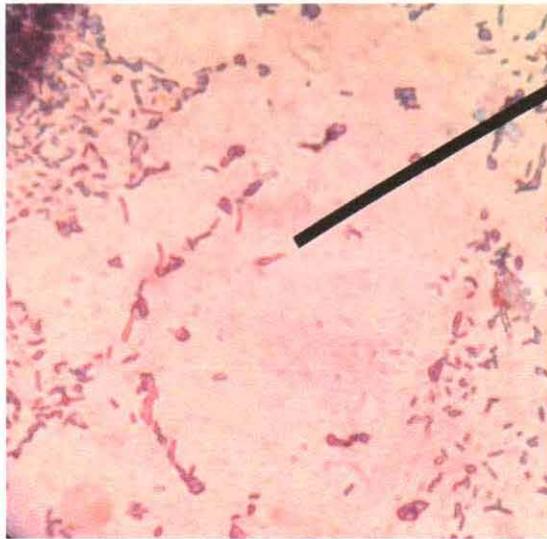


Gambar 5.1 Daging kepiting kaleng yang telah dibuka, warna daging tidak berubah.

5.2. Hasil Isolasi dan Identifikasi *Geobacillus stearothermophilus*

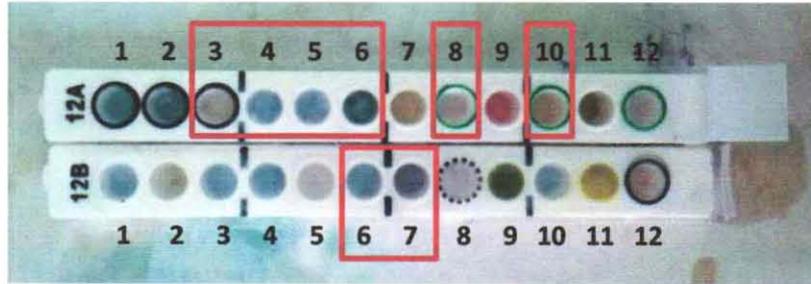
Setelah dilakukan isolasi pada media agar dengan suhu 50°-55°C dengan keadaan anaerob selama 48-72 jam, berhasil diisolasi bakteri *Geobacillus stearothermophilus*, kemudian dilanjutkan dengan pemeriksaan mikroskopik dengan pewarnaan gram. Berdasarkan uji

mikroskopik pada sampel, *Geobacillus stearothermophilus* memiliki bentuk basil atau batang, rantai pendek atau tunggal, memiliki endospora pada terminal atau subterminal dan berwarna ungu atau gram positif (+) pada perwarnaan gram. Gambar hasil dari pewarnaan Gram dapat dilihat pada Gambar 5.2



Gambar 5.2 Uji mikroskopik *Geobacillus stearothermophilus* (Tanda panah merah) dengan pewarnaan Gram, pembesaran 100X lensa obyektif dengan minyak emersi

Kemudian dilanjutkan dengan pemeriksaan biokimia bakteri. Hasil pemeriksaan biokimia dapat dilihat pada gambar 5.3, Jumlah sumur atau *well* yang digunakan hanya 7 dari 24 sumur, sesuai dengan kunci pembandingan pada *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* (2006). Sumur atau *well* yang digunakan terdapat dalam garis kotak merah.



Gambar 5.3 Pemeriksaan biokimia bakteri menggunakan *Oxoid Microbact™ Kit* dengan well yang digunakan diberi tanda kotak merah. Keterangan : Kit 12A (3: H₂S; 4: *Glucose*; 5: *Mannitol*; 6: *Xylose*; 8: *Indole*; 10: VP); Kit 12B (6: *Sucrose*; 7: *Lactose*).

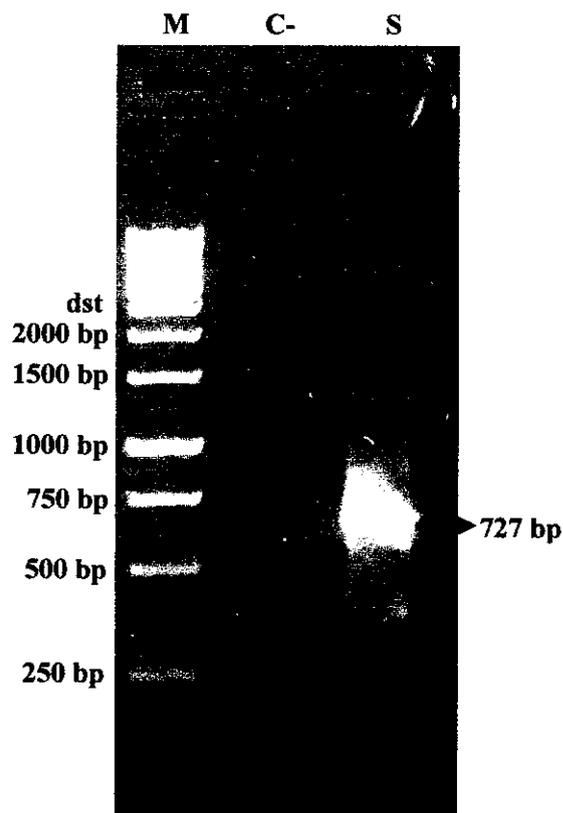
Berdasarkan uji biokimia dengan menggunakan *Oxoid Microbact™ Kit* pada sampel daging kepiting kaleng, maka didapatkan hasil kemiripan bakteri pada sampel dengan *Geobacillus stearothermophilus* adalah $6/8 \times 100\% = 75\%$ dengan berdasarkan *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* (2006).

Tabel 5.1 Hasil Identifikasi *Geobacillus stearothermophilus* pada uji biokimia

12 A				<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
Well No.	Jenis Pengujian	Indikator	Hasil (+/-)	
1	Lysine	-	-	-
2	Ornithine	-	-	-
3	H ₂ S	(-) Kekuningan (+) Hitam	Negatif (-)	Negatif (-) / Positif (+)
4	Glucose	(-) Biru-Hijau (+) Kuning	Negatif (-)	Positif (+)
5	Mannitol	(-) Biru-Hijau (+) Kuning	Negatif (-)	Negatif (-)
6	Xylose	(-) Biru-Hijau (+) Kuning	Negatif (-)	Negatif (-)
7	ONPG	-	-	-
8	Indole	(-) Tidak berwarna (+) Merah Muda-Merah	Negatif (-)	Negatif (-)
10	VP (Voges-Proskauer)	(-) Kekuningan (+) Merah Muda-Merah	Negatif (-)	Negatif (-)
11	Citrate	-	-	-
12	TDA	-	-	-
12 B				<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
Well No.	Jenis Pengujian	Indikator	(+/-)	
1	Gelatin	-	-	-
2	Malonate	-	-	-
3	Inositol	-	-	-
4	Sorbitol	-	-	-
5	Rhamnose	-	-	-
6	Sucrose	(-) Biru-Hijau (+) Kuning	Negatif (-)	Positif (+)
7	Lactose	(-) Biru-Hijau (+) Kuning	Negatif (-)	Negatif (-)
8	Arabinose	-	-	-
9	Adonitol	-	-	-
10	Raffinose	-	-	-
11	Salicin	-	-	-
12	Arginin	-	-	-

5.3. Hasil Identifikasi gen Lipase dengan *Polymerase Chain Reaction*

Hasil yang diperoleh dari primer dengan target gen Lipase dengan program PCR yang telah dioptimasi sebagai berikut: denaturasi awal pada 94°C selama 3 menit, diikuti oleh 40 siklus masing-masing terdiri dari 94°C selama 1 menit, 62°C selama 1 menit dan 72°C selama 1 menit dengan langkah ekstensi akhir pada 72°C selama 5 menit, berupa pola pita DNA (band DNA) yang menunjukkan jumlah dan pola yang berbeda. Produk PCR dengan ukuran 727 bp dinyatakan positif gen Lipase.



Gambar 5.4 Hasil elektroforesis product PCR, gen Lipase ditunjukkan dengan adanya pita band pada 727 bp pada sampel kultur *Geobacillus stearothermophilus*. M : DNA Marker 1 kb; C- : Kontrol negatif; S : Sampel Kultur *Geobacillus stearothermophilus*. Gel Elektrophoresis (agarose) 1 %.

BAB 6
PEMBAHASAN

BAB VI PEMBAHASAN

6.1. Identifikasi *Geobacillus stearothermophilus* dengan Uji Bakteriologis pada Produk Daging Kepiting Kaleng

Kepiting adalah salah satu komoditas perikanan yang saat ini diminati di pasar internasional karena bergizi tinggi yakni mengandung berbagai nutrien penting (Catacutan, 2002). Kepiting termasuk salah satu hasil perikanan yang bersifat *perishable food* (mudah rusak/busuk). Pembusukan dapat dihindari dengan proses pengemasan kepiting dalam kaleng kedap udara dan diberikan panas untuk mematikan bakteri di dalam serta untuk proses pematangan (Hendren *et al.*, 2010; Indriyani, 2006). Pembusukan pada daging kepiting setelah proses pengalengan dapat disebabkan oleh bakteri yang tahan panas pada saat proses sterilisasi. Salah satu bakteri tahan panas atau termofilik yaitu *Geobacillus stearothermophilus*, bakteri ini yang sering menyebabkan pembusukan “*flat sour*” pada makanan kaleng (Oranusi *et al.*, 2012).

Hasil dari pemeriksaan kaleng utuh tidak ditemukan kerusakan pada kaleng, tidak mengembang, tidak bocor, tidak berkarat, dengan tanggal kadaluarsa masih lama dan komposisi daging kepiting kaleng mengandung *sodium acid pyrophosphates*, sedangkan hasil dari pemeriksaan organoleptik daging kepiting kaleng yaitu bau atau aroma daging sudah busuk, rasa masam, tekstur dan konsistensi normal, adanya sedikit gas sehingga kaleng tidak mengembang, warna daging tidak

berubah karena komposisi daging kepiting kaleng ini mengandung *sodium acid pyrophosphates* yang berfungsi untuk mempertahankan warna. Berdasarkan hasil pemeriksaan kaleng utuh dan organoleptik, pembusukan seperti ini lebih mengarah ke *Geobacillus stearothermophilus* dan *Bacillus coagulans* dengan ciri kaleng tidak menggeembung (*flat*) karena sedikit atau tanpa ada gas dengan rasa masam sehingga sering disebut *flat sour* (Durand *et al.*, 2015; Oranusi *et al.*, 2012).

Hasil pemeriksaan bakteriologis juga menunjukkan bahwa bakteri yang menyebabkan pembusukan pada produk daging kepiting kaleng memiliki kemiripan dengan *Geobacillus stearothermophilus*. Berdasarkan penelitian Nazina *et al.* (2001), *Geobacillus stearothermophilus* bersifat termofilik pembentuk spora yang tumbuh optimal antara 55°C dan 65°C. Bakteri ini berbentuk batang atau basil, dengan rantai pendek atau tunggal. Struktur dinding sel gram positif (+) dan spora berbentuk ellipsoidal atau endospora silinder per sel, terletak pada terminal atau subterminal. *Geobacillus stearothermophilus* bersifat fakultatif anaerobik dengan O₂ sebagai akseptor electron. Termofilik obligat dengan kisaran suhu pertumbuhan 37-75°C dan tumbuh optimal pada suhu 55-65°C.

Pemeriksaan biokimia bakteri menggunakan Oxoid Microbact™ Kit (12A + 12B) memiliki prosentase kemiripan sifat biokimia 75% dengan *Geobacillus stearothermophilus* berdasarkan *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* (2006). Hasil negatif dari uji glukosa dan sukrosa berarti bakteri tidak memfermentasi karbohidrat

(glukosa dan sukrosa). Berdasarkan penelitian Durand *et al.* (2015) fermentasi karbohidrat akan membentuk asam tanpa atau sedikit produksi gas. *Geobacillus stearothermophilus* menghasilkan beberapa enzim untuk memecah karbohidrat sehingga membentuk asam yang berfungsi membentuk energi untuk kelangsungan hidup (Ledenbach and Marshall, 2009). *Geobacillus stearothermophilus* dapat memproduksi H₂S atau tidak, dan pada uji H₂S didapatkan hasil negatif. Selain itu, *Mannitol* dan *Xylose* didapatkan hasil negatif karena bakteri ini tidak memfermentasi *Mannitol* dan *Xylose*. Indol negatif karena bakteri ini tidak memiliki enzim triptonase yang dapat menghidrolisis asam amino jenis triptofan, selain itu bakteri ini tidak memproduksi acetoin sehingga hasil VP (*Voges-Proskauer*) negatif dan juga *Lactose* negatif karena tidak memfermentasi *Lactose*, hasil ini sama dengan sifat *Geobacillus stearothermophilus*, seperti yang diungkapkan dalam penelitian Nazina *et al.* (2001) bahwa bakteri *Geobacillus stearothermophilus* bereaksi negatif pada uji VP, Indol, *Mannitol*, *Xylose*, *Lactose* dan bereaksi positif pada uji fermentasi karbohidrat seperti sukrosa dan glukosa, tetapi hasil menunjukkan tidak terjadi fermentasi sukrosa dan glukosa. Hal ini dapat disebabkan karena proses inkubasi bakteri yang kurang lama, seharusnya inkubasi selama 48 jam (Oxoid, 2003).

6.2. Gen Lipase pada Sampel Produk Daging Kepiting Kaleng

Hasil dari elektroforesis produk *Polymerase Chain Reaction* menunjukkan bahwa isolasi dari sampel produk daging kepiting kaleng

menunjukkan adanya band hasil amplifikasi primer gen lipase. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Kadhim *et al.* (2013) bahwa identifikasi *Geobacillus stearothermophilus* menunjukkan adanya amplifikasi dari gen lipase dengan primer yang sama, akan tetapi hasil dari amplifikasi tersebut menunjukkan ukuran band dengan panjang 1403bp dengan program PCR yaitu denaturasi awal pada 95°C selama 3 menit, diikuti oleh 35 siklus masing-masing terdiri dari 95°C selama 30 detik, 52°C selama 30 detik dan 72°C selama 2 menit dengan langkah ekstensi akhir pada 72°C selama 5 menit. Sedangkan hasil pada produk daging kepiting kaleng dengan program PCR setelah dioptimasi yaitu denaturasi awal pada 94°C selama 3 menit, diikuti oleh 40 siklus masing-masing terdiri dari 94°C selama 1 menit, 62°C selama 1 menit dan 72°C selama 1 menit dengan langkah ekstensi akhir pada 72°C selama 5 menit, memiliki band ukuran 727bp setelah dianalisis dengan Genetyx software (Genetyx Corp., Japan). Perbedaan ini dapat terjadi karena strain yang berbeda dari *Geobacillus stearothermophilus*, sehingga perlu dilakukan sekuensing dari bakteri tersebut untuk mengetahui strain yang terdapat pada produk daging kepiting kaleng. Hal ini juga membuktikan bahwa pada sampel produk daging kepiting kaleng tersebut secara genotip terdapat bakteri *Geobacillus stearothermophilus* yang menyebabkan pembusukan *flat sour* makanan kaleng (Durand *et al.* 2015).

Gen lipase pada *Geobacillus stearothermophilus* menyebabkan bakteri ini dapat menghasilkan enzim lipase. Enzim lipase atau *triglicerol*

hydrolases merupakan enzim termotabil yang sering diaplikasikan untuk bioteknologi, industri pangan, kosmetik, deterjen dan obat-obatan (Sifour *et al.*, 2010). Kemampuan *Geobacillus stearothermophilus* yang dapat memproduksi enzim lipase menyebabkan bakteri ini tetap mampu membusukkan makanan apabila sterilisasi tidak optimal karena enzim lipase dapat bertahan pada suhu tinggi, sehingga bakteri ini sering digunakan untuk ujiantang atau indikator biologis untuk kontrol sterilisasi alat produksi pada industri pangan. Apabila proses sterilisasi pada makanan kaleng kurang optimal, maka spora bakteri *Geobacillus stearothermophilus* dapat bertahan dan germinasi serta tumbuh dengan bantuan enzim lipase pada produk makanan kaleng (Andre *et al.*, 2013; Oranusi *et al.*, 2012).

Pembusukan *flat sour* karena kontaminasi *Geobacillus stearothermophilus* pada produk daging kepiting kaleng dapat disebabkan karena proses sterilisasi yang kurang optimal dan pengawasan mutu produksi yang kurang ketat, sehingga spora dari bakteri *Geobacillus stearothermophilus* masih bertahan dan germinasi menjadi bentuk vegetatif lagi. *Geobacillus stearothermophilus* yang tumbuh melakukan fermentasi karbohidrat untuk bertahan hidup pada produk daging kepiting kaleng. *Geobacillus stearothermophilus* memproduksi beberapa enzim pada proses fermentasi karbohidrat seperti *lipase*, *esterase*, *esterase lipase* dan *β -glucosidase* untuk pemecahan karbohidrat dan menghasilkan asam serta energi untuk kelangsungan hidup (Ledenbach and Marshall, 2009).

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil isolasi dan identifikasi, dapat disimpulkan bahwa terdapat cemaran atau kontaminasi bakteri *Geobacillus stearothermophilus* pada produk daging kepiting kaleng.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian dapat diajukan saran sebagai berikut :

1. Perlu pengawasan yang lebih ketat oleh bagian *Quality Control* dari pihak produsen pada proses pra-produksi hingga akhir produksi produk daging kepiting kaleng.
2. Pihak produsen produk daging kepiting kaleng kemungkinan perlu melakukan kalibrasi ulang secara berkala pada alat sterilisasi.
3. Bagi peneliti dapat melakukan penelitian lebih lanjut seperti sekuensing terhadap bakteri *Geobacillus stearothermophilus* untuk dapat mengetahui strain yang mengkontaminasi produk daging kepiting kaleng.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- André, S., Zuber, F., and Remize, F. 2013. Thermophilic spore-forming bacteria isolated from spoiled canned food and their heat resistance. Results of a French ten-year survey. *Int. J. Food Microbiol.* 165 (2): 134-143.
- Anetis, M. 2006. 5 step to a 5: AP Biology (2nd edition). McGraw-Hill. New York.
- Bauer, T., Weller, P., Hammes, W.P., and Hertel, C. 2003. The effect of processing parameters on DNA degradation in foods. *European Food Research Technology.* 217: 338-43.
- Bhunia, A.K. 2008. Food borne microbial pathogen, mechanism and pathogenesis. Purdue University. Indiana. USA. 276.
- BPOM (Badan Pengujian Obat dan Makanan). 2008. Pengujian Mikrobiologi Pangan. 9(2) : 1-9.
- Cammà, C., Di Domenico, M., and Monaco, F. 2012. Development and validation of fast Real-Time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures. *Food Control.* 23: 400-404.
- Catacutan, M.R. 2002. Growth and Body Composition of Juvenile Mud Crab, *Scylla serrata*, Fed Different Dietary Protein and Lipid Levels and Protein to Energy Ratio. *Aquaculture.* 208 : 113-123.
- CAC (Codex Alimentarius Commission). 2003. CAC/RCP 1-1969, Rev. 4 Recommended International Code of Practice General Principles of Food Hygiene.
- Cheng, L., Mu, W., and Jiang, B., 2009. Thermostable L-arabinose isomerase from *Bacillus stearothermophilus* IAM 11001 for D-tagatose production: gene cloning, purification and characterisation. *J. Sci. Food Agric.* 90 (8): 1327-1333.
- Durand L, Planchon S, Guinebretiere MH, Carlin F, and Remize F. 2015. Genotypic and phenotypic characterization of foodborne *Geobacillus stearothermophilus*. *Food Microbiol.* 45 (Pt A): 103-110.
- Elke, A., Gadani, F., Heinze, P., Pijnenburg, H., and Van Den Eede, G. 2002. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food product. *European Food Research Technology* 214: 3-26.

- FAO. 2013. Preservation techniques Fisheries and aquaculture department. www.fao.org. [diakses pada tanggal 25 Desember 2014].
- Fleury, M.D., Stratton, J., Tinga, C., Charron, D.F., and Aramini J. 2008. A descriptive analysis of hospitalization due to acute gastrointestinal illness in Canada, 1995-2004. *Canadian Journal of Public Health*, 99 (6): 489-93.
- Fumière, O., Dubois, M., Baeten, V., Von Holst, C., and Berben, G. 2006. Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. *Anal. Bioanal. Chem.* 385: 1045-54.
- Gaspersz, V. 2002. Pedoman Implementasi Program *Six Sigma* Terintegrasi Dengan *ISO 9001:2000*, *MBNQA*, dan *HACCP*. PT. Granmedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Guizelini, B., Vandenberghe, L.S., Sella, S.R., and Soccol, C., 2012. Study of the influence of sporulation conditions on heat resistance of *Geobacillus stearothermophilus* used in the development of biological indicators for steam sterilization. *Arch. Microbiol.* 194 (12): 991-999.
- Hayes, P.R. and Forsythie S.J. 2001. Food Hygiene, Microbiology and Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP). Maryland : Aspen Publisher, Inc. Gaithersburg.
- Heller, L.C., Davis, C.R., Peak, K.K., Wingfield, D. Cannons, A.C., Amuso, P.T. and Cattani, J. 2003. Comparison of Methods for DNA Isolation from Food Samples for Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* by real-time PCR. *Appl. Env. Microbiol.* 69(3): 1844-46.
- Helms, M., Vastrup, P., Gerner-Smidt, P., and Mølbak, K. 2003. Short and long term mortality associated with foodborne bacterial gastrointestinal infections: registry based study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 326 - 357.
- Hendren, R.K., Burney, J., and Morris, W.C. 2010. Canning Foods. University of Tennessee Institute of Agriculture. Tennessee.
- Hendrix, C. M. and Sirois. M. 2007. Laboratory Procedures for Veterinary Technicians. Fifth Edition. Mosby Elsevier. Canada. Page: 114-140.
- Hogg, S. 2005. Essential Microbiology (1st ed.). Wiley-Blackwell. Chichester. England. 91-107.
- Indriyani, A. 2006. Mengkaji Pengaruh Penyimpanan Rajungan (*Portunus pelagicus Linn*) Mentah dan Matang di Mini Plant terhadap Mutu Daging di Plant. Universitas Diponegoro.
- Irianto, K., dan Kusno W. 2004. Nutrition and Healthy Lifestyle. Yrama Widya. Bandung.

- Jahan, S. 2012. Epidemiology of Foodborne Illness, Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry. Intech. 321-342.
- Junais, I., Brasit, N., dan Latief, R. 2011. Kajian Strategi Pengawasan dan Pengendalian Mutu Produk Ebi Furay PT. Bogatama Marinusa. 1-14.
- Khadim, R., Maajeed, H. and Munim G. 2013. Sequence similarity for identification of locally isolate *Geobacillus staerothemophilus* according to lipase gene sequence. Science Research Impact. 2 (2): 42-50.
- Kuchenmüller, T., Hird, S., Stein, C., Kramarz, P., Nanda, A., and Havelaar, A. H. 2009. Estimating global burden of foodborne diseases – a collaborative effort. Eurosurveillance, 14 (18): 191-95.
- Klooster, J.W. 2009. Icons of Invention: the Makers of the Modern World from Gutenberg to Gates: 103. ABC-CLIO. California.
- Koneman, E.W. 2006. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams & Wilkins Publisher. Philadelphia.
- Koswara, S. 2009. HACCP dan Penerapannya pada Produk Bakeri. eBookPangan.com [diakses dan diunduh tanggal 25 Desember 2014]
- Landry, W.L., Albert, H.S and Gayle, A.L. 2001. Bacteriological Analytical Manual: Examination of Canned Foods. Chapter 21A. 407-433.
- Ledenbach, L.H. and Marshall, R.T. 2009. Microbial Spoilage of Dairy Products. Springer Science. USA. 41-67.
- Linscott, A. J. 2011. Food-Borne Illnesses. Clinical Microbiology Newsletter, 33(6): 41-45.
- Malorny, B., Paccassoni, E., Fach, P., Bunge, C., Martin, A., and Helmuth, R. 2004. Diagnostic Real-Time PCR for Detection of Salmonella in Food. Appl. Env. Microbiol. 70: 7046–52.
- Mazza, R., Soave, M., Morlacchini, M., Piva, G., and Marocco, A. 2005. Assessing the transfer of genetically modified DNA from feed to animal tissues. Transgenic Research. 14: 775-84.
- McNeil, I. and Day, L. 1996. Biographical Dictionary of the History of Technology. Routledge. New York.
- Muhandri, T. dan Kadarisman, D. 2006. Sistem Manajemen Mutu Proses Produksi. PAU Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., and Ivanova, A.E., 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli:

- descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenuatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenuatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 (2): 433-446.
- Oomus, S.J., Van-Zuylen, A.C., and Hehenkamp, J.O. 2007. The characteristics of *Bacillus* spores occurring in the manufacturing of canned products. *Int. J. Food Microbiol.* 120: 85-94.
- Oranusi, U.S., Wesley, B., and Osigwe, G.A. 2012. Investigation on the Microbial Profile of Canned Foods. *Jour. Biol. Food. Scie. Res.* (1): 15-18.
- Oxoid. 2003. Oxoid Microbact™ Technical Product Insert. www.oxoid.com. [diakses dan diunduh pada tanggal 27 April 2015].
- Postollec, F., Mathot, A.-G., Bernard, M., Divanac'h, M.-L., Pavan, S., and Sohier, D. I. 2012. Tracking spore-forming bacteria in food: from natural biodiversity to selection by processes. *Int. J. Food Microbiol.* 158 (1): 1-8.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., and Klein, D.A. 2008. *Microbiology* (7th ed.). McGraw-Hill. New York.
- Promega. 2013. Analyzing DNA in Food Samples. worldwide.promega.com/resources/pubhub/tpub_130-analyzing-dna-in-food-samples/. [diakses dan diunduh tanggal 25 Desember 2014].
- Puspitasari, D. 2004. Perbaikan dan Evaluasi Penerapan Sistem Manajemen Mutu Pada Industri Pengolahan Tahu. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Qiagen. 2006. DNeasy Blood & Tissue Handbook. www.qiagen.com. [diakses dan diunduh pada tanggal 27 April 2015].
- Rinto, Arafah, E., dan Utama, S.B. 2009. Kajian Keamanan Pangan (Formalin, Garam dan Mikrobial) pada Ikan Sepat Asin Produksi Indralaya. *Jurnal Pembangunan Manusia.* 8(2): 1-10.
- Rivero, C.W., De Benedetti, E.C., Sambeth, J.E., Lozano, M.E., and Trelles, J.A. 2012. Biosynthesis of anti-HCV compounds using thermophilic microorganisms. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (19): 6059-6062.
- Saparinto, C. dan Hidayati, D. 2006. *Bahan tambahan Pangan*. Kanisius. Yogyakarta.

- Sifour, M., Saeed, H.M., Zaghoul, T.I., Berekaa, M.M., and Abdel-Fattah, Y.R. 2010. Isolation of Lipase Gene of the Thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* Strain-5. *Biotech.* 9 (1): 55-60.
- Sitorus. 2010. Makanan Sehat & Bergizi. Yrama Widya. Bandung.
- Sudarmaji. 2005. Analisis Bahaya dan Pengendalian Titik Kritis (*Hazard Analysis Critical Control Point*). *Jurnal Kesehatan Lingkungan.* 1(2): 183-190.
- Sudjadi. 2008. Bioteknologi Kesehatan. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Sutrisno, A., Basith, A., dan Wijaya, N. H. 2013. Analisis Strategi Penerapan Sistem Manajemen Keamanan Pangan HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*) di PT. Sierad Produce Tbk. Parung. *Jurnal Manajemen dan Organisasi.* 4(2): 73-90
- Taormina, P.J. and Dorsa, W.J. 2004 Growth potential of *C. perfringens* during cooling of cooked meats. *J. Food Protect.* 67(7): 11537-1547.
- World Health Organization [WHO]. 2007. Initiative to estimate the Global Burden of Foodborne Diseases: Information and publications. Geneva.
- William, C., Frazier, D., and Westhoff, O. 2006. Food borne illness bacterial. In *Food Microbiology* (4th ed.). New York. 401-431
- Nurheti, Y. 2007. *Awas! Bahaya Di Balik Lezatnya Makanan.* Andi. Yogyakarta.
- Yusuf, Z.K. 2010. *Polymerase Chain Reaction (PCR).* Universitas Negeri Gorontalo. *Saintek.* 5(6): 1-6
- Yuwono, T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction.* Penerbit Andi. Yogyakarta.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Pemeriksaan Mikroskopis dengan Pewarnaan Gram (Hendrix and Sirois, 2007).

Alat dan Bahan :

- Gelas obyek
- Ose
- Pembakar bunsen
- Isolat bakteri
- Kristal violet
- Lugol
- Alkohol aseton
- Safranin

Cara kerja :

1. Sediaan oles dibuat dan fiksasi di atas api sampai kering,
2. Olesan digenangi bakteri dengan larutan kristal violet selama 1 menit,
3. Olesan dibilas dengan air kran selama beberapa detik, kering anginkan,
4. Kemudian digenangi dengan larutan iodine dan dibiarkan selama 1 menit,
5. Dibilas dengan air kran selama beberapa detik, kering anginkan,
6. Dibilas dengan alkohol selama 30 detik, kemudian kering anginkan,
7. Dibilas dengan air kran selama 2 detik,
8. Kemudian digenangi dengan safranin selama 10 detik,
9. Dibilas dengan air kran dengan cepat, kering anginkan,
10. Hasil pewarnaan diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 100x lensa obyektif menggunakan minyak emersi.

Lampiran 2. Pemeriksaan Biokimia dengan menggunakan Oxoid Microbact™ Kit (12A+12B)

Alat dan Bahan :

- Ose
- Pembakar bunsen
- Isolat bakteri
- Aquades
- Pipet
- Tabung reaksi
- Oxoid Microbact™ Kit (12A+12B)

Cara kerja :

1. Koloni bakteri diambil menggunakan ose dan dimasukkan ke dalam 5ml aquades, diaduk hingga tercampur.
2. Plastik perekat pada Oxoid Microbact™ Kit dibuka.
3. Larutan yang berisi bakteri diambil menggunakan pipet.
4. Larutan diteteskan ke dalam *well* atau sumur Oxoid Microbact™ Kit sebanyak 4 tetes pada masing-masing *well*.
5. Kemudian plastik perekat pada *well* Oxoid Microbact™ Kit ditutup kembali untuk inkubasi.
6. Inkubasi *Oxoid Microbact™ Kit* dilakukan pada suhu ruangan selama 24 jam.
7. Perubahan warna diamati dan dicocokkan dengan tabel reaksi pada petunjuk teknis Oxoid Microbact™.

Lampiran 3. Prosedur Ekstraksi DNA

1. QIAGEN Protease (atau proteinase K) diambil menggunakan pipet 20 µl ke dalam 1,5 ml mikrosentrifuge tube.
2. Kemudian ditambahkan 180 µl Buffer ATL kedalam tube.
3. Sedikit koloni bakteri diambil dengan ose dan dimasukkan ke dalam tube 1,5 ml.
4. Tube divortex selama 15 detik dan spin down.
5. Kemudian diinkubasi pada suhu 56⁰C selama 1 x 24 Jam.
6. 200 µl buffer AL ditambahkan kedalam sampel, kemudian divortex selama 15 detik.
7. 200 µl ethanol 96% ditambahkan dan campur dengan cara divortex selama 15 detik, kemudian spin down.
8. Campuran step 5 dimasukkan kedalam QIAamp Mini spin column (2 ml collection tube).
9. Kemudian disentrifuge 8.000 rpm selama 1 menit.
10. 2 ml collection tube yang berisi filtrat dibuang dan diganti dengan 2 ml collection tube yang baru.
11. 500 µl Buffer AW1 ditambahkan, lalu disentrifuge 8000 rpm selama 1 menit.
12. 2 ml collection tube yang berisi filtrate dibuang dan diganti dengan 2 ml collection tube yang baru.
13. 500 µl Buffer AW2 ditambahkan, lalu disentrifuge 13.000 rpm selama 3 menit.
14. 2 ml collection tube yang berisi filtrate dibuang dan diganti dengan 2 ml collection tube yang baru.
15. Kemudian disentrifuge lagi 13.000 rpm selama 1 menit.
16. QIAamp Mini spin column dipindahkan pada 1,5 ml mikrosentrifuge tube dan ditambahkan Buffer AE atau distilled water hingga 50 µl.
17. Diinkubasi pada suhu ruang (15-25⁰C) selama 1 menit kemudian sentrifuge 8.000 rpm selama 1 menit.
18. Didapatkan 50 µl DNA template.

Lampiran 4. Foto kultur murni *Geobacillus stearothermophilus* dari sampel produk daging kepiting kaleng pada media *Nutrient Agar*



Lampiran 5. Letak penempelan primer forward gen Lipase *Geobacillus stearothermophilus* dari sampel kultur produk daging keping kaleng



