

**TESIS**

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KONTAMINAN  
*Clostridium* sp (BAKTERI ANAEROB) PADA PRODUK  
DAGING KEPITING OLAHAN DALAM KALENG**

**PENELITIAN EKSPLORATIF LABORATORIS**



Oleh :

**IKE MARTANIA HERUNINGTYAS**

**NIM. 061224253002**

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

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KONTAMINAN  
*Clostridium* sp (BAKTERI ANAEROB) PADA PRODUK  
DAGING KEPITING OLAHAN DALAM KALENG**

**PENELITIAN EKSPLORATIF LABORATORIS**

**TESIS**

**Untuk Memperoleh Gelar Magister  
dalam Program Studi Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner  
pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga  
Surabaya**

Oleh :

**IKE MARTANIA HERUNINGTYAS**

**NIM. 061224253002**

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

**Lembar Pengesahan**

TESIS INI TELAH DISETUJUI  
Tanggal 19 Agustus 2015

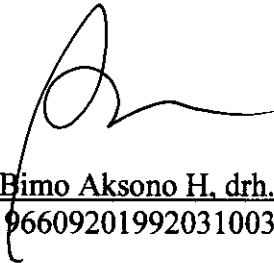
Oleh :

Pembimbing Ketua



Prof. Dr. H. Setiawan Koesdarto, drh., M.Sc  
NIP. 195209281978031002

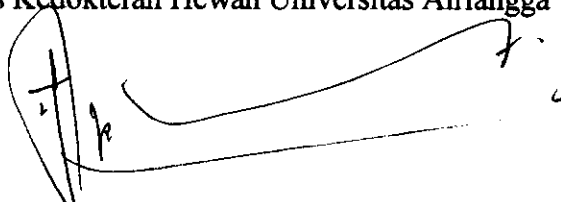
Pembimbing



Dr. Eduardus Bimo Aksono H, drh., M.Kes  
NIP. 196609201992031003

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 : 19 Agustus 2015

### KOMISI PENGUJI TESIS

Ketua : Didik Handijatno, drh., MS., Ph.D.

Anggota : 1. Dr. Nenny Harijani, drh., M.Si

2. Prof. Dr. Suwarno, drh., M.Si

3. Prof. Dr. H. Setiawan Koesdarto, drh., M.Sc

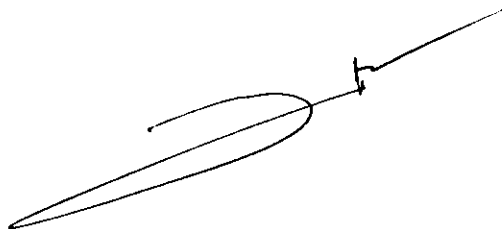
4. Dr. Eduardus Bimo Aksono, drh., M.Kes

Surabaya, 21 Agustus 2015

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



**Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., PhD.**

NIP 19531216 197806 2001

## UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan Tesis dengan judul **Isolasi dan Identifikasi Kontaminan *Clostridium* sp (Bakteri Anaerob) pada Produk Daging Kepiting Olahan dalam Kaleng.**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

1. Allah SWT yang telah memberi rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.
2. Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
3. Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, M.P, drh selaku 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.
4. Prof. Dr. H. Setiawan Koesdarto, drh., M.Sc selaku dosen pembimbing pertama yang telah meluangkan waktu dan pikiran dalam memberikan bimbingan, petunjuk dan saran sampai dengan selesainya tesis ini.
5. Dr. Eduardus Bimo Aksono, drh., M.Kes selaku dosen pembimbing kedua yang telah meluangkan waktu dan pikiran dalam memberikan bimbingan, petunjuk dan saran sampai dengan selesainya tesis ini.

6. Didik Handijatno, drh., MS., Ph.D., Dr. Nenny Harijani, drh., M.Si dan Prof. Dr. Suwarno, drh., M.Si selaku dosen penguji yang telah memberikan bimbingan, petunjuk, saran, dan membantu kelancaran pelaksanaan ujian proposal, seminar hasil, dan sidang tesis.
7. 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.
8. Kedua orangtua Drs. Heru Martania, S.H. dan Wiwid Dwi Rahayu, Adikku Atok yang selalu memberikan dukungan moril, materiil dan doa restu.
9. Sahabatku Ivana, Linda, Ikey dan Rina. Teman penelitian Tomi dan seluruh teman seperjuangan S2 IPKMV yang telah banyak memberikan kenangan manis dan masukan kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun demi kesempurnaan tulisan ini. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Surabaya, 19 Agustus 2015

Penulis

## RINGKASAN

### **Isolasi dan Identifikasi Kontaminan *Clostridium* sp (Bakteri Anaerob) pada Produk Daging Kepiting Olahan dalam Kaleng**

Kepiting adalah salah satu komoditas perikanan yang banyak diminati di pasar internasional. Kepiting banyak dimanfaatkan sebagai industri pengalengan maupun konsumsi langsung. Kepiting umumnya bersifat *perishable food*. Makanan kaleng adalah kemasan kontainer bersegel yang kedap udara dan steril secara komersil. Kerusakan utama makanan kaleng terutama diakibatkan oleh mikroba.

Sebuah pabrik produsen produk daging kepiting olahan dalam kaleng mengalami masalah pembusukan pada isi produknya ketika diperiksa oleh bagian *Quality Control* sebelum dipasarkan. Produk kepiting kaleng yang busuk tersebut terjadi hanya pada produksi yang baru dengan batch produksi yang sama. Produk daging kepiting olahan dalam kaleng tersebut tidak mengalami kerusakan fisik atau kebocoran kaleng. Setelah dilakukan inspeksi oleh bagian *Quality Control*, diduga pembusukan akibat dari proses sterilisasi kurang optimal dan karena adanya kontaminan spora bakteri termofilik yang masih hidup setelah proses sterilisasi.

*Clostridium* proteolitik merupakan agen utama pembusukan dan pembentukan *low-acid* pada makanan kaleng karena kemampuannya membentuk spora tahan panas. *Clostridium sporogenes* banyak dilaporkan sebagai penyebab pembusukan dan produksi gas berlebihan pada makanan kaleng dari daging dan *seafood*.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mengidentifikasi kontaminan *Clostridium* sp (bakteri anaerob) pada produk daging kepiting olahan dalam kaleng. Sampel yang digunakan adalah daging kepiting kaleng komersil di laboratorium *Tropical Disease Centre* Universitas Airlangga. Waktu penelitian mulai dari bulan Desember 2014 sampai dengan Mei 2015.

Sebelum analisis, permukaan kaleng dibersihkan dengan alkohol 70%. Pembukaan kaleng dilakukan dekat nyala bunsen dengan tujuan untuk menghindari kontaminasi. Pertama-tama, sampel produk daging kepiting olahan dalam kaleng diperiksa secara organoleptik meliputi penampilan fisik kaleng secara utuh dan isi makanan didalamnya meliputi adanya perubahan warna, bau dan tekstur daging kepiting. Setelah itu, sampel bagian dalam diambil, dicampur aquades hingga homogen dan dituang pada cawan petri yang berisi media NA. Adanya pertumbuhan bakteri yang diduga *Clostridium* sp kemudian dilanjutkan dengan melihat morfologi koloni, pewarnaan gram dan uji biokimia menggunakan

Oxoid Microbact™ Kit (12A + 12B), dimana Kit 12A (meliputi uji H<sub>2</sub>S, Glucose, Mannitol dan Indole) dan Kit 12B (meliputi Gelatin, Rhamnose dan Lactose). Hasil dari uji biokimia tersebut disesuaikan dengan kunci pembandingan pada *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* (2006).

Kultur hasil pemeriksaan bakteriologis dilanjutkan dengan deteksi gen *colA* dari *Clostridium sporogenes* menggunakan PCR. Pertama-tama dilakukan ekstraksi DNA dahulu, kemudian dilanjutkan dengan amplifikasi menggunakan primer *C. sporogenes*, dimana primer forward (5' – TTGGGATTTTGGGGATAACA – 3') dan primer reverse (5' – TCCGTATCGTTGTCGTCTTG – 3'). Primer yang digunakan untuk amplifikasi dengan panjang 549 bp. Reagen untuk PCR terdiri dari 12,5 µl Master Mix, 0,5 µl distilled water steril, 1 µl primer forward, 1 µl primer reverse, 5 µl genom DNA dan loading dye. Kondisi Cycling adalah : Pre denaturasi 95°C selama 5 menit, Denaturasi 94°C selama 60 detik, Annealing 62°C selama 60 detik dan extension 72°C selama 60 detik dengan siklus 30 kali. Final extension dilakukan pada suhu 72°C selama 5 menit dengan siklus 1 kali. Produk PCR dibaca pada gel agarose 2% dengan Roche dibawah UV transilluminator.

Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa pada sampel produk daging kepiting olahan dalam kaleng terdapat kontaminan atau cemaran bakteri *Clostridium sporogenes*. Hasil dari uji bakteriologis menunjukkan bahwa bakteri pembusuk pada makanan kaleng tersebut memiliki kemiripan dengan *Clostridium sporogenes* sebesar 86%. Hasil dari elektroforesis produk PCR menunjukkan bahwa sampel positif *Clostridium sporogenes* dengan adanya band hasil amplifikasi gen *colA* yang memiliki ukuran 549 bp. *Clostridium sporogenes* merupakan organisme pembusuk pada makanan kaleng dan produk susu. Dalam penelitian ini pembusukan pada sampel produk disebabkan karena adanya kontaminasi bakteri *C. sporogenes*. Kontaminasi tersebut bisa diakibatkan karena proses sterilisasi kurang optimal, sehingga spora bakteri dalam makanan kaleng tidak mati. Apabila spora bakteri dalam makanan kaleng tidak mati dan ketika kondisi lingkungan mendukung, maka spora akan mengalami germinasi dan multiplikasi sel. *Clostridium sporogenes* mempunyai kemiripan fisik dan genetik dengan *Clostridium botulinum* grup I (*C. botulinum* proteolitik), sehingga keduanya dijadikan sebagai alasan prinsip indikator bakteri pembusukan makanan dan masalah keamanan pangan, serta sebagai indikator keefektifan produksi makanan.



## Isolation and Identification of *Clostridium* sp (Anaerob Bacteria) Contaminant in Crab Meat Canned Product

Ike Martania Heruningtyas

### Abstract

Crab is one of many perishable fishery product. Canned food are commercialized, impermeable-sealed and sterilized food container. The foremost damage that occurs in canned food products is caused by microbes. Canned food mainly contaminated by bacteria spores from *Bacillus*, *Clostridium* and *Desulfotomaculum* genuses. *Clostridium* is a significant pathogen which some species of this pathogen are capable of including disease in humans. Which proteolytic *Clostridia* is the main agent in the decaying and forming low-acid in canned food due to its ability to form heat-resistant spores.

The purpose of this research is to isolate and identify *Clostridium* sp contaminant in crab meat canned products. The samples used in this study was commercial crab meat canned product in the laboratory of Tropical Disease Diagnostic Center, Airlangga University. The isolation and identification bacteria used in the study were include bacteriological method and PCR test. At first, samples were cultured on *Nutrient Agar* (NA) and identified as *Clostridium sporogenes* from the colony morphology, Gram staining and biochemical tests (H<sub>2</sub>S, Glucose, Mannitol, Indole, Gelatin, Rhamnose and Lactose) by using *Oxoid Microbact™ Kit (12A + 12B)*. Further, test by *Polymerase Chain Reaction* to identify *colA* gene from *Clostridium sporogenes*. The *colA* result from PCR product electrophoresis showed that the band of amplification with length of 549 bp.

Keyword : Crab meat canned products, *Clostridium sporogenes*, *colA* gene.

## DAFTAR ISI

	Halaman
SAMPUL DALAM .....	ii
PRASYARAT GELAR.....	iii
PERNYATAAN.....	iv
PERSETUJUAN.....	v
PENETAPAN PANITIA PENGUJI.....	vi
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
RINGKASAN .....	ix
ABSTRACT .....	xi
DAFTAR ISI .....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Hasil Penelitian .....	4
1.3.1 Tujuan umum .....	4
1.3.2 Tujuan khusus .....	5
1.4 Manfaat Hasil Penelitian .....	5
1.4.1 Manfaat teoritis .....	5
1.4.2 Manfaat praktis .....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	6
2.1 <i>Foodborne Disease</i> .....	6
2.2 Bakteri Anaerob .....	8
2.3 <i>Clostridium</i> sp. ....	10
2.4 Makanan Kaleng .....	13
2.5 HACCP .....	17
2.6 Metode Pemeriksaan .....	21
2.6.1 Pemeriksaan bakteriologis .....	21
2.6.2 PCR .....	22
2.6.2.1 Tahapan PCR .....	23
2.6.2.2 Komponen PCR .....	25

2.6.2.3	PCR <i>Thermal Cycler</i> .....	28
2.6.2.4	Elektroforesis .....	29
2.6.2.5	Jenis-jenis PCR .....	30
<b>BAB III</b>	<b>KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN</b> .....	<b>33</b>
3.1	Kerangka Konseptual Penelitian .....	33
<b>BAB IV</b>	<b>MATERI DAN METODE</b> .....	<b>37</b>
4.1	Jenis Penelitian .....	37
4.2	Bahan Penelitian .....	37
4.3	Instrumen Penelitian .....	37
4.4	Lokasi dan Waktu Penelitian .....	38
4.5	Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data .....	38
4.5.1	Pengambilan sampel .....	38
4.5.2	Pengumpulan data .....	38
4.5.2.1	Pemeriksaan organoleptik dan bakteriologis .....	38
4.5.2.2	Ekstraksi DNA .....	40
4.5.2.3	Design primer .....	40
4.5.2.4	Prosedur amplifikasi PCR .....	40
4.5.2.5	Elektroforesis .....	41
4.6	Kerangka Operasional .....	42
<b>BAB V</b>	<b>HASIL PENELITIAN</b> .....	<b>43</b>
5.1	Hasil Isolasi dan Identifikasi <i>Clostridium sporogenes</i> .....	43
5.2	Hasil Identifikasi gen <i>colA</i> dengan PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ).....	47
<b>BAB VI</b>	<b>PEMBAHASAN</b> .....	<b>48</b>
6.1	<i>Clostridium sporogenes</i> pada Produk Daging Kepiting Olahan dalam Kaleng .....	48
6.2	Gen <i>colA</i> pada Sampel Produk Daging Kepiting Olahan dalam Kaleng .....	50
<b>BAB VII</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	<b>52</b>
7.1	Kesimpulan .....	52
7.2	Saran .....	52
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	.....	<b>54</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.5 Design <i>Primer</i> .....	40
5.1 Hasil Identifikasi <i>Clostridium</i> sp pada uji biokimia .....	46

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
3.1 Kerangka konseptual penelitian .....	33
4.6 Kerangka operasional .....	42
5.1 Daging kepiting kaleng yang telah dibuka .....	43
5.2 Pertumbuhan <i>Clostridium</i> sp pada Media NA .....	44
5.3 Pemeriksaan mikroskopik <i>Clostridium</i> (sesuai jarum penunjuk) dengan pewarnaan Gram dengan pembesaran 1000x .....	45
5.4 Pemeriksaan biokimia bakteri menggunakan Oxoid Microbact™ Kit (12A + 12B) .....	45
5.5 Hasil elektroforesis produk PCR gen <i>cola</i> .....	47

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1 Pemeriksaan mikroskopis dengan pewarnaan Gram .....	59
Lampiran 2 Pemeriksaan biokimia dengan menggunakan Oxoid Microbact™ Kit (12A + 12B) .....	60
Lampiran 3 Prosedur Ekstraksi DNA .....	61
Lampiran 4 Foto kultur <i>Clostridium</i> sp dari sampel produk daging kepiting olahan dalam kaleng pada media <i>Nutrient Agar</i> .....	63
Lampiran 5 Letak posisi primer <i>Clostridium sporogenes</i> .....	64

## SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

ATP	= <i>Adenosine Triphosphate</i>
bp	= base pair
CO <sub>2</sub>	= karbon dioksida
DNA	= <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTPs	= <i>Deoxynucleotide triphosphates</i>
H <sub>2</sub>	= hidrogen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	= hidrogen peroksida
H <sub>2</sub> S	= hidrogen sulfida
MgCl <sub>2</sub>	= magnesium klorida
mM	= milimolar
O <sup>2-</sup>	= superoksida
OH <sup>-</sup>	= hidroksil radikal
PCR	= <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	= <i>Power of Hydrogen</i>
TM	= <i>Melting temperatur</i>
μl	= mikroliter
μM	= mikromolar
°C	= derajat celcius
%	= persen

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kebutuhan manusia akan pangan merupakan kebutuhan dasar yang paling esensial untuk mempertahankan hidup dan kehidupan (Kozier, 2004). Makanan adalah hasil dari proses pengolahan suatu bahan pangan yang dapat diperoleh dari hasil pertanian, perkebunan dan perikanan. Kepiting adalah salah satu komoditas perikanan yang saat ini banyak diminati di pasar internasional. Kepiting banyak dimanfaatkan baik sebagai industri pengalengan maupun konsumsi langsung. Kepiting banyak disenangi masyarakat karena bernilai gizi tinggi yakni mengandung berbagai nutrisi penting (Catacutan, 2002). Permintaan kepiting yang terus meningkat tersebut, selain disebabkan rasa dagingnya yang lezat, juga kandungan gizinya yang tinggi. Berdasarkan hasil analisis proksimat diketahui bahwa daging kepiting bakau mengandung protein 47,31% dan lemak 11,20% (Karim, 2005).

Kepiting termasuk salah satu hasil perikanan yang umumnya bersifat *perishable food* (mudah rusak/busuk). Kandungan protein yang cukup tinggi pada hasil perikanan menyebabkan mudah rusak bila tidak segera dilakukan pengolahan dan pengawetan. Salah satu usaha untuk meningkatkan daya simpan dan daya awet pada produk perikanan adalah dengan pengalengan (Wulandari, 2009).

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 (Wulandari, 2009).

Pengalengan dimaksudkan untuk menghancurkan mikroba berbahaya dalam makanan, namun dengan penanganan yang tidak tepat, kaleng dapat menjadi tempat berkembangbiak bagi mikroba. Kaleng yang rusak dapat disebabkan karena kesalahan pembuatan atau saat transportasi atau pengiriman barang, sehingga dapat mengakibatkan kontaminasi ulang (Oranusi *et al*, 2012).

Kerusakan pada makanan kaleng dapat dibedakan atas kerusakan fisik, kimia dan mikrobiologi. Kerusakan fisik pada umumnya tidak membahayakan konsumen, misalnya terjadinya penyok karena benturan keras. Kerusakan kimia dapat berupa kerusakan zat-zat gizi atau penggunaan jenis wadah kaleng yang tidak sesuai untuk jenis makanan tertentu sehingga terjadi reaksi kimia antara kaleng dengan makanan di dalamnya, misalnya kaleng menjadi kembung karena terbentuknya gas hidrogen, terbentuknya warna hitam, pemudaran warna atau terjadi korosif kaleng. Kerusakan utama yang terjadi pada bahan makanan yang dikemas dalam kaleng adalah kerusakan yang diakibatkan oleh mikroba (Shaffiyah, 2008).

Sebuah pabrik produsen produk daging kepiting olahan dalam kaleng mengalami masalah pembusukan pada produk daging kepiting kalengnya ketika diperiksa oleh bagian *Quality Control* sebelum dipasarkan. Produk daging kepiting olahan dalam kaleng yang busuk tersebut terjadi hanya pada produksi yang baru dengan batch produksi yang sama. Produk daging kepiting olahan dalam kaleng tersebut tidak mengalami kerusakan fisik atau kebocoran kaleng.

Setelah dilakukan inspeksi oleh bagian *Quality Control*, diduga pembusukan akibat dari proses sterilisasi kurang optimal dan karena adanya kontaminan spora bakteri termofilik yang masih hidup setelah proses sterilisasi.

Makanan kaleng telah dilaporkan terutama terkontaminasi oleh spora bakteri dari genus *Bacillus*, *Clostridium* dan *Desulfotomaculum* (Oranusi *et al*, 2012). *Clostridium* proteolitik merupakan agen utama dalam pembusukan dan pembentukan *low-acid* pada makanan kaleng karena kemampuannya membentuk spora tahan panas. *Clostridium* proteolitik dapat menyebabkan dekomposisi protein yang akan menghasilkan campuran berbagai metabolit berbau busuk dengan bantuan *protease ekstraseluler*. *Clostridium sporogenes* banyak dilaporkan sebagai penyebab pembusukan dan produksi gas berlebihan pada makanan kaleng dari daging dan *seafood* (Toarmina dan Diorsa, 2004). Kontaminan spora *Clostridium* dapat berasal dari kualitas bahan baku yang kurang baik atau saat proses produksi (sterilisasi) yang kurang optimal, sehingga apabila kondisi lingkungan mendukung maka spora akan germinasi dan multiplikasi sel (Brunt *et al*, 2015). Untuk mendukung pertumbuhannya, *Clostridium sporogenes* mempunyai enzim *collagenase (colA)* yang memainkan peran penting dalam penyerapan peptida kecil dan asam amino guna kelangsungan hidup bakteri (Zhang *et al*, 2015).

Adanya kontaminan bakteri *Clostridium* sp pada makanan kaleng dapat diidentifikasi dengan pemeriksaan bakteriologis dan uji PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Beberapa tahapan dalam pemeriksaan bakteriologis yaitu *enrichment*, isolasi pada media selektif dan identifikasi dengan reaksi biokimia. Untuk

peneguhannya dapat dilanjutkan dengan uji PCR. Metode PCR memungkinkan proses analisis menjadi lebih cepat dibandingkan dengan cara konvensional, sangat sensitif dan spesifik dalam identifikasi karena menggunakan target gen spesifik bakteri. PCR adalah suatu teknik yang dipakai untuk melipatgandakan asam nukleat (DNA atau RNA) secara *in vitro* dengan enzimatis di dalam suatu mesin pengubah yang dikenal *Thermocycler I*. Proses pelipatgandaan DNA ini terjadi melalui tiga tahapan yaitu denaturasi, *annealing* dan ekstensi (Rantam, 2007).

Berdasarkan uraian di atas, penelitian yang dilakukan difokuskan untuk menentukan adanya kontaminan *Clostridium* sp (bakteri anaerob) pada produk daging kepiting olahan dalam kaleng dengan menggunakan metode bakteriologis dan uji PCR. Pada uji PCR menggunakan primer dengan target gen *colA* dari *Clostridium* sp.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Apakah terdapat kontaminan *Clostridium* sp. (bakteri anaerob) pada produk daging kepiting olahan dalam kaleng setelah di uji menggunakan metode bakteriologis dan uji PCR?

## **1.3 Tujuan Hasil Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Untuk mengetahui adanya kontaminan *Clostridium* sp. (bakteri anaerob) pada produk daging kepiting olahan dalam kaleng.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

Mengisolasi dan mengidentifikasi kontaminan *Clostridium* sp. (bakteri anaerob pada produk daging kepiting olahan dalam kaleng dengan metode bakteriologis dan diteguhkan dengan uji PCR.

## **1.4 Manfaat Hasil Penelitian**

### **1.4.1 Manfaat Teoritis**

Dapat memberikan informasi bahwa terdapat kontaminan *Clostridium* sp. (bakteri anaerob) pada produk daging kepiting olahan dalam kaleng setelah di uji menggunakan metode bakteriologis dan uji PCR.

### **1.4.2 Manfaat Praktis**

Diharapkan kepada masyarakat agar lebih teliti dalam memilih produk makanan kaleng dan pihak produsen produk daging kepiting olahan dalam kaleng melakukan pengawasan lebih ketat pada saat produksi.

**BAB II**  
**TINJAUAN PUSTAKA**

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Foodborne Disease*

*Foodborne disease* merupakan penyakit yang disebabkan karena mengkonsumsi makanan atau minuman yang terkontaminasi mikroorganisme patogen (bakteri, virus, parasit) dan bahan kimia beracun (misalnya logam berat pestisida dan enterotoksin). Kontaminasi pada makanan dapat terjadi dimana saja sepanjang rantai makanan (bahan baku, proses produksi hingga makanan dikonsumsi), atau dari kontaminasi lingkungan. Ada 250 lebih *foodborne disease* yang teridentifikasi dapat menyebabkan penyakit melalui pangan (Newell *et al*, 2010).

*Foodborne disease* berhubungan dengan perubahan demografi dan epidemiologi masyarakat. *Foodborne disease* tumbuh sebagai masalah kesehatan masyarakat di seluruh dunia, terutama pada negara berkembang (Helms *et al*, 2003). Populasi pada negara berkembang mudah terkena *foodborne illness* karena banyak alasan, diantaranya kurangnya air bersih untuk menyiapkan makanan, alat transportasi dan penyimpanan makanan yang kurang memadai, kurangnya kesadaran masyarakat mengenai keamanan pangan (WHO, 2011b). Selain itu juga karena terbatasnya alat dan peraturan mengenai keamanan pangan, serta kurang efektifnya sistem pengawasan dan monitoring untuk *foodborne illness*, sistem inspeksi untuk keamanan pangan dan program edukasi tentang kebersihan pangan (WHO, 2011a)

*Foodborne disease* yang paling sering terjadi antara lain disebabkan oleh *Campylobacter*, *Salmonella*, *E. coli*, *Clostridium* dan golongan virus *Calicivirus*. Selain itu ada pula yang disebabkan oleh parasit sistiserkus. Sebagian besar kasus *foodborne disease* bersifat ringan, namun ada beberapa kasus dapat beresiko tinggi yang mengakibatkan kematian dan morbiditas tinggi jika terjadi pada bayi, anak-anak, orang tua dan orang dengan gangguan sistem imunitas. Umumnya gejala awal *foodborne disease* adalah nausea, vomit, diare, sakit abdominal dan fever (McCulloch, 2000). Selama tahun 2005 diperkirakan ada 2 juta orang meninggal karena gangguan gastrointestinal (Fleury *et al*, 2008).

*Foodborne disease* selain berdampak pada masalah kesehatan masyarakat juga berdampak pada perekonomian suatu negara. *Foodborne disease* berdampak 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, 2011a).

Upaya pencegahan dan pengendalian *foodborne disease* hendaknya dilakukan pada tiap tahapan rantai makanan. Produsen atau pabrik makanan perlu



menerapkan langkah pencegahan kontaminasi. Konsumen juga harus mengambil tindakan pencegahan untuk *foodborne disease*. 5 kunci untuk menjaga keamanan pangan adalah (1) menjaga kebersihan, misal selalu mencuci tangan dahulu sebelum memegang makanan, (2) memisahkan makanan mentah dengan yang sudah dimasak untuk menghindari kontaminasi silang, (3) memasak dengan benar, khususnya untuk daging, unggas, telur dan seafood harus dimasak pada suhu mencapai 70°C, (4) menyimpan makanan pada temperatur yang aman, (5) menggunakan air dan bahan-bahan yang aman (WHO, 2011).

## **2.2 Bakteri Anaerob**

Bakteri anaerob merupakan bakteri yang tidak menggunakan oksigen (O<sub>2</sub>) sebagai aseptor elektron terakhir pada proses respirasinya. Bakteri anaerob tidak bergantung pada oksigen untuk metabolisme dan kelangsungan hidupnya (Madigan *et al.*, 2009). Beberapa kategori bakteri anaerob yaitu bakteri anaerob fakultatif, bakteri anaerob obligat, organisme aerotoleran, mikroaerofil dan nanaerob.

Bakteri anaerob fakultatif adalah bakteri yang dapat hidup dengan baik bila ada oksigen maupun tidak ada oksigen. Bakteri anaerob fakultatif akan memproduksi ATP melalui respirasi aerob ketika oksigen masih tersedia dan mampu bertahan dalam kondisi tidak ada oksigen dengan melakukan fermentasi secara anaerob. Proses fermentasi dapat terjadi dalam kondisi anaerobik atau dengan kondisi tanpa kehadiran oksigen. Hal ini karena dalam proses fermentasi tidak menggunakan oksigen sebagai akseptor elektron terakhir, akan tetapi

menggunakan asam organik (Madigan *et al.*, 2009). Dalam keadaan anaerob akan mengaktifkan enzim hidrogenase dan nitrogenase untuk menghasilkan hidrogen. Contoh bakteri anaerob fakultatif adalah *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, *Citrobacter sp.*, dan *Bacillus sp* (Chong *et al.*, 2009).

Bakteri anaerob obligat adalah bakteri yang tidak membutuhkan oksigen dalam hidupnya. Kehadiran oksigen dalam lingkungan bakteri anaerob obligat dapat menimbulkan toksik bagi bakteri. Ketika oksigen direduksi, maka dihasilkan beberapa produk yang bersifat toksik seperti hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), superoksida ( $O_2^-$ ) dan hidroksil radikal ( $OH^\cdot$ ) (Nelson *et al.*, 2004). Ketidakmampuan toleransi terhadap oksigen oleh bakteri anaerob obligat karena bakteri tersebut tidak mampu mendetoksifikasi beberapa hasil metabolisme oksigen. Contoh bakteri anaerob obligat antara lain *Clostridia sp*, methylothrop, bakteri rumen dan archaea (Liu, 2008).

Organisme aerotoleran adalah organisme yang dapat hidup walaupun terdapat oksigen di sekitarnya, tetapi mereka tetap anaerobik karena tidak menggunakan oksigen sebagai *terminal electron acceptor* (akseptor elektron terakhir). Organisme aerotoleran hanya dapat berfermentasi. Organisme mikroaerofilik adalah organisme yang tumbuh baik pada tekanan oksigen rendah, sedangkan pada tekanan oksigen tinggi (sekitar 200 mikromolar) dapat menghambat pertumbuhan. Mikroaerofil melakukan respirasi aerobik dan beberapa diantaranya dapat juga melakukan respirasi anaerobik. Organisme nanaerob adalah organisme yang tidak dapat tumbuh bila terdapat konsentrasi

mikromolar oksigen, tetapi dapat tumbuh dan diuntungkan pada konsentrasi nanomolar oksigen (Lentino, 2013; Prescott *et al.*, 2008).

Metabolisme pada anaerob aerotoleran dan obligat bersifat fermentatif kuat. Pada anaerob fakultatif, cara metabolisme respirasi dilakukan jika tersedia oksigen, tetapi tidak terjadi fermentasi. Pada saat bakteri tumbuh dalam keadaan terdapat oksigen, maka akan terjadi sejumlah reaksi enzimatik dan mengakibatkan produksi hidrogen peroksida dan radikal superoksida. Pada bakteri aerob, aerotoleran dan anaerob fakultatif terdapat enzim dismutase superoksida yang dapat mencegah akumulasi ion superoksida, tetapi pada anaerob obligat enzim tersebut tidak ada (Hogg, 2005).

Pada bakteri anaerob fakultatif dan aerobik, hidrogen peroksida yang dibentuk dalam reaksi dismutase secara cepat dirusak oleh katalase. Meskipun bakteri aerotoleran seperti bakteri asam laktat tidak memiliki katalase, peroksidase yang dimilikinya dapat merusak  $H_2O_2$  sehingga menyebabkan bakteri dapat tumbuh pada keadaan tersedianya oksigen.

### **2.3 *Clostridium* sp.**

*Clostridium* sp. adalah kelompok bakteri berbentuk batang, gram positif, mampu membentuk spora dan bersifat obligat anaerob. *Clostridium* dapat di isolasi dari lumpur, limbah, feses dan lingkungan anaerobik lainnya. Beberapa spesiesnya dapat menyebabkan penyakit pada manusia dan hewan, serta menyebabkan pembusukan makanan (Ryan, 2004). Meski beberapa clostridia bersifat toleran terhadap oksigen, namun sporulasi hanya terjadi pada kondisi

anaerob (Syarifiyah, 2003). Berdasarkan Ryan (2004) klasifikasi *Clostridium sp.* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Firmicutes
Class	: Clostridia
Order	: Clostridiales
Family	: Clostridiaceae
Genus	: <i>Clostridium</i>

Sensitivitas *Clostridium* terhadap oksigen menyebabkan *Clostridium* hanya dapat ditemui di lingkungan anaerob (anaerob obligat) dan daerah dengan kadar oksigen rendah (anaerob fakultatif) seperti rumen dan bagian tertentu dari intestin, namun sporanya dapat ditemukan dimana-mana. Spora yang dibentuk bersifat lebih resisten terhadap panas, kekeringan, desinfektan, bahan-bahan kimia dan bahan bersifat merusak lainnya, serta dapat bertahan hidup selama bertahun-tahun. Spora tersebut juga resisten terhadap oksigen. Peranan utama organisme ini di alam dalam proses degradasi bahan-bahan organik menjadi alkohol, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, mineral dan asam. Umumnya bau asam butirat diasosiasikan dengan genus *Clostridium*, namun beberapa *Clostridium* tidak menghasilkan asam butirat melainkan asetat, asam laktat, asam format atau propionat sebagai produk utama fermentasi (Syarifiyah, 2003).

Clostridia adalah kelompok bakteri pembentuk spora yang dibedakan berdasarkan kemampuannya memfermentasi sumber karbon. Dibagi menjadi 2 kelompok yaitu organisme sakarolitik dan proteolitik. Clostridia sakarolitik dapat

memfermentasi gula menjadi asam butirat (*C. butyricum*, *C. perfringens*, *C. tertium*), asam asetat dan alkohol. Clostridia proteolitik dapat memfermentasi asam amino. Clostridia proteolitik merupakan agen utama dalam pembusukan dan pembentukan *low-acid* pada makanan kaleng karena kemampuannya membentuk spora tahan panas. *Clostridium sporogenes* adalah yang paling sering dipelajari.

Kultur untuk bakteri *Clostridium* dilakukan pada media *Clostridium novyi plating medium* (NPLM) atau lempeng agar darah dan *Robertson's Cooked Meat Medium* (RCM) yang diinkubasi secara anaerob pada suhu 37°C selama 24 jam (Chotiah dan Lily, 2007).

*Clostridium* memiliki sekitar 100 spesies, meliputi bakteri yang hidup bebas dan patogen penting. Beberapa spesies yang bersifat patogen penting dan dapat menimbulkan penyakit pada manusia adalah *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. perfringens* dan *C. tetani* (Chotiah dan Lily, 2007).

*Clostridium botulinum* merupakan salah satu spesies penting yang berhubungan dengan makanan, menyebabkan penyakit botulismus. Spesies ini menghasilkan 7 jenis botulinal neurotoxin yaitu A-G. Hanya jenis toxin A, B, E dan F yang dapat menyebabkan botulismus pada manusia. Spesies ini dibagi menjadi 2 grup yaitu grup I (A, B dan F) proteolitik yang berhubungan dengan pembusukan makanan dan grup II (B, E dan F) nonproteolitik (WHO, 2002).

*Clostridium perfringens* merupakan spesies yang paling sering menyebabkan *foodborne disease*. Spesies ini dibagi menjadi 5 tipe (A-E) menurut faktor virulensinya. Tipe A adalah agen yang menyebabkan keracunan makanan

pada manusia karena menghasilkan *alpha-toxin* dan *unique enterotoxin* yang memungkinkan timbulnya gejala diare dan kram abdominal (Tansuphasiri, 2001).

*Clostridium sporogenes* diklasifikasikan kedalam genus *Clostridium* proteolitik karena kemampuannya memfermentasi asam amino dan mencairkan gelatin. Bakteri ini dapat ditemukan di lingkungan, serta berpengaruh terhadap ekonomi dan kesehatan. Bakteri ini ditemukan sebagai organisme pembusuk dalam makanan kaleng dan produk susu (Allison, 1990).

## 2.4 Makanan Kaleng

Pengertian makanan menurut WHO (*World Health Organization*) yaitu semua substansi yang diperlukan tubuh, kecuali air dan obat-obatan dan substansi-substansi yang dipergunakan untuk pengobatan (Putraprabu, 2008). Makanan diperlukan untuk kehidupan karena makanan merupakan salah satu kebutuhan pokok bagi kehidupan manusia. Makanan berfungsi untuk memelihara proses tubuh dalam pertumbuhan atau perkembangan serta mengganti jaringan tubuh yang rusak, memperoleh energi untuk melakukan aktivitas sehari-hari, mengatur metabolisme dan berbagai keseimbangan air, mineral dan cairan tubuh yang lain, serta berperan di dalam mekanisme pertahanan tubuh terhadap berbagai penyakit (Notoatmodjo, 2003).

Makanan kaleng adalah kemasan kontainer bersegel yang kedap udara dan steril secara komersil (Oranusi *et al*, 2012). Makanan kaleng dapat berasal dari proses pengolahan suatu bahan pangan yang dapat diperoleh dari hasil pertanian, perkebunan dan perikanan. Kepiting adalah salah satu komoditas perikanan yang

saat ini banyak diminati di pasar internasional. Kepiting banyak dimanfaatkan baik sebagai industri pengalengan maupun konsumsi langsung. Kepiting banyak disenangi masyarakat karena bernilai gizi tinggi yakni mengandung berbagai nutrien penting (Catacutan, 2002). Permintaan kepiting yang terus meningkat tersebut, selain disebabkan rasa dagingnya yang lezat, juga kandungan gizinya yang tinggi. Berdasarkan hasil analisis proksimat diketahui bahwa daging kepiting bakau mengandung protein 47,31% dan lemak 11,20% (Karim, 2005).

Kepiting termasuk salah satu hasil perikanan yang umumnya bersifat *perishable food* (mudah rusak/busuk). Kerusakan pada produk perikanan segar dapat terjadi secara biokimiawi maupun secara mikrobiologi. Kandungan protein yang cukup tinggi pada produk perikanan menyebabkannya mudah rusak bila tidak segera dilakukan pengolahan dan pengawetan. Pengawetan bertujuan untuk memperpanjang masa simpan bahan pangan tersebut (Wulandari, 2009).

Teknik pengawetan pangan yang dapat diterapkan dan banyak digunakan adalah pengawetan dengan suhu tinggi, contohnya adalah pengalengan ikan sardine. Pengalengan merupakan salah satu cara untuk menyelamatkan bahan makanan, terutama ikan dan hasil perikanan lainnya dari pembusukan. Teknik pengalengan ini menghasilkan daya awet ikan yang diawetkan jauh lebih bagus dibandingkan pengawetan cara lain. Proses pengalengan membutuhkan penanganan yang lebih intensif serta ditunjang dengan peralatan yang serba otomatis, karena dalam proses pengalengan ikan atau hasil perikanan lainnya akan dimasukkan dalam suatu wadah yang ditutup rapat agar udara maupun mikroorganisme perusak yang datang dari luar tidak dapat masuk. Selanjutnya

wadah dipanasi pada suhu dan jangka waktu tertentu untuk mematikan mikroorganisme yang ikut terbawa pada produk yang dikalengkan (Murniyati dan Sunarman, 2004). Saat ini makanan dalam kemasan kaleng semakin populer akibat mobilitas masyarakat yang sangat tinggi, sehingga mengonsumsi produk makanan kaleng dapat menghemat waktu.

Pengalengan dimaksudkan untuk menghancurkan mikroba berbahaya dalam makanan, namun dengan penanganan yang tidak tepat, kaleng dapat menjadi tempat berkembangbiak bagi mikroba. Kaleng yang rusak dapat disebabkan karena kesalahan pembuatan atau saat transportasi atau pengiriman barang, sehingga dapat mengakibatkan kontaminasi ulang (Oranusi *et al*, 2012).

Kerusakan makanan kaleng dapat dibedakan atas kerusakan fisik, kimia dan mikrobiologi. Kerusakan fisik pada umumnya tidak membahayakan konsumen, misalnya terjadinya penyok-penyok karena benturan yang keras. Kerusakan kimia dapat berupa kerusakan zat-zat gizi atau penggunaan jenis wadah kaleng yang tidak sesuai untuk jenis makanan tertentu sehingga terjadi reaksi kimia antara kaleng dengan makanan didalamnya, misalnya kaleng menjadi kembung karena terbentuknya gas hidrogen, terbentuknya warna hitam, pemudaran warna atau terjadi pengamatan kaleng. Kerusakan utama yang terjadi pada bahan makanan yang dikemas dalam kaleng adalah kerusakan yang diakibatkan oleh mikroba yang menyebabkan makanan menjadi berbau busuk, asam dan bahkan beracun (Shaffiyah, 2008). Kerusakan mikrobiologi makanan kaleng dapat dibedakan atas dua kelompok yaitu :



1. Tidak terbentuk gas sehingga kaleng tetap terlihat normal atau tidak kembung. Beberapa contoh kerusakan semacam ini adalah busuk asam (disebabkan oleh bakteri pembentukan asam, misalnya *Bacillus*), busuk sulfida (disebabkan oleh pertumbuhan bakteri pembentuk spora yang memecah protein dan menghasilkan hidrogen sulfida ( $H_2S$ ) sehingga makanan kaleng menjadi busuk dan berwarna hitam karena reaksi antara sulfida dengan besi).
2. Pembentukan gas, terutama hidrogen ( $H_2$ ) dan karbon dioksida ( $CO_2$ ) sehingga kaleng menjadi kembung. Disebabkan oleh pertumbuhan bakteri pembentuk spora, misalnya *Clostridium botulinum*.

Kaleng yang rusak dapat disebabkan karena kesalahan pembuatan atau saat transportasi atau pengiriman barang, sehingga dapat mengakibatkan kontaminasi ulang (Oranusi *et al*, 2012). Menurut Winarno (1995), kerusakan makanan kaleng dibagi menjadi 4 bagian yaitu :

1. *Flat Sour*

Permukaan kaleng tetap datar dan tidak mengalami kerusakan apapun, tetapi produk di dalam kaleng tersebut sudah rusak dan berbau asam.

2. *Flipper*

Apabila dilihat sekilas, bentuk kaleng terlihat normal tanpa kerusakan. Tetapi bila salah satu ujung kaleng ditekan, maka ujung yang lainnya akan terlihat cembung.

### 3. *Springer*

Apabila salah satu ujung kaleng tampak rata dan normal, sedangkan ujung yang lain tampak cembung permanen.

### 4. *Swell* (cembung)

Kedua ujung kaleng sudah terlihat cembung akibat adanya bakteri pembentuk gas. *Swell* (cembung) dapat dibedakan menjadi dua bagian yaitu *soft swell* dan *hard swell*. *Soft swell* yaitu kedua ujung kaleng yang sudah cembung tetapi belum begitu keras sehingga masih bisa ditekan sedikit ke dalam. Sedangkan *hard swell* yaitu kedua ujung permukaan kaleng sudah cembung dan begitu keras sehingga tidak bisa lagi ditekan ke dalam (Shaffiyah, 2008).

Bahaya yang ditimbulkan akibat produk makanan kaleng yang terkontaminasi bakteri memberikan efek yang besar terhadap kesehatan masyarakat dan dapat menyebabkan penyakit yang disebut *foodborne disease*. *Foodborne disease* adalah gejala penyakit yang timbul akibat mengkonsumsi pangan yang mengandung bahan atau senyawa beracun atau organisme patogen (Yuliarti, 2007).

## 2.5 HACCP

Masalah keamanan pangan masih menjadi masalah penting dalam bidang pangan dan perlu mendapat perhatian khusus dalam program pengawasan pangan. Penyakit dan kematian yang ditimbulkan melalui makanan sampai saat ini masih tinggi, walaupun prinsip-prinsip pengendalian untuk berbagai penyakit tersebut

pada umumnya telah diketahui. Pengawasan dan pengendalian mutu merupakan faktor penting bagi suatu perusahaan untuk menjaga konsistensi mutu produk yang dihasilkan, sesuai dengan tuntutan konsumen, 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 (Junais dkk, 2011).

Keamanan pangan ditentukan oleh ada tidaknya komponen yang berbahaya baik secara fisik, kimia dan mikrobiologi yang dapat mengganggu, merugikan dan membahayakan kesehatan. Secara fisikawi, keamanan pangan dapat ditentukan oleh ada tidaknya kontaminasi dari bahan-bahan yang tidak dapat dicerna seperti plastik, logam maupun bahan yang dapat mengganggu pencernaan manusia. Secara kimiawi dapat berasal dari zat-zat kimia berbahaya yang tidak boleh digunakan sebagai bahan pangan seperti formalin, boraks dan insektisida serta bahan tambahan makanan yang dibatasi penggunaannya seperti asam benzoat, askorbat, laktat sitrat dan bahan tambahan lainnya sesuai dengan SNI 01-0222-1995. Bahaya mikrobiologi berasal dari adanya bakteri-bakteri patogen maupun racun yang ditimbulkannya pada bahan pangan (Rinto dkk, 2009).

Masalah keamanan pangan telah mendapat perhatian serius dari pemerintah. Pemerintah mengeluarkan peraturan yang menganjurkan setiap industri menerapkan sistem keamanan pangan yaitu salah satunya sistem HACCP (*Hazard*

*Analysis Critical Control Point*). 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, sehat dan berkualitas.

*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 (HACCP)* (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). Menurut Gaspersz (2002), HACCP adalah suatu sistem manajemen mutu yang secara efektif dan efisien menjamin keamanan hasil-hasil pertanian sampai menjadi makanan siap santap yang fokus pada pencegahan masalah untuk menjamin produksi produk-produk pangan yang aman untuk dikonsumsi.

Titik kritis pengolahan produk perlu diketahui untuk memberikan jaminan keamanan yang memadai. *Critical Control Point (CCP)* atau titik pengendalian

kritis) adalah langkah dimana pengendalian dapat diterapkan dan diperlukan untuk mencegah atau menghilangkan bahaya atau menguranginya sampai titik aman (Bryan, 1995).

Sistem HACCP bukan merupakan sistem jaminan keamanan pangan yang tanpa resiko, tetapi dirancang untuk meminimalkan resiko bahaya keamanan pangan. Sistem HACCP juga dianggap sebagai alat manajemen yang digunakan untuk memproteksi rantai pasokan pangan dan proses produksi terhadap kontaminasi bahaya-bahaya mikrobiologis, kimia dan fisik. HACCP dapat diterapkan dalam rantai produksi pangan mulai dari produsen utama bahan baku pangan (pertanian), penanganan, pengolahan, distribusi, pemasaran hingga sampai kepada pengguna akhir (Koswara, 2009).

Langkah dalam metode HACCP antara lain adalah (1) Pembentukan tim HACCP, (2) Pendeskripsian produk dan cara distribusinya, (3) pengidentifikasi pengguna yang dituju, (4) pembuatan diagram alir, (5) konfirmasi diagram alir dilapangan, (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).

HACCP dikenal sebagai sistem keamanan pangan yang efektif, maka dengan menerapkan HACCP secara konsekuen maka perusahaan jaminan pangan akan dapat memberikan kepercayaan kepada pelanggan terhadap jaminan

keamanan yang telah dilakukan dan akan memberikan kesan yang baik bahwa industri pangan yang bersangkutan memenuhi komitmen yang kuat dan profesional dalam menjamin keamanan pangan.

## **2.6 Metode Pemeriksaan**

### **2.6.1 Pemeriksaan bakteriologis**

Pengujian sampel makanan akan selalu mengacu kepada persyaratan makanan yang sudah ditetapkan. Metode yang digunakan untuk pengujian mikrobiologi sangat ditentukan oleh persyaratan yang diacu. Menurut BPOM (2008), umumnya pengujian mikrobiologis dilakukan secara :

#### **A. Metode Kuantitatif (*Enumerasi*)**

Digunakan untuk mengetahui jumlah mikroba yang ada pada suatu sampel, umumnya dikenal dengan Angka Lempeng Total (ALT) dan Angka Paling Mungkin atau *Most Probable Number* (MPN). ALT dan lebih tepatnya ALT aerob mesofil atau anaerob mesofil menggunakan media padat dengan hasil akhir berupa koloni yang dapat diamati secara visual dan dihitung, interpretasi hasil berupa angka dalam koloni (cfu) per ml/g atau koloni/100ml. Cara yang digunakan antara lain dengan cara tuang, cara tetes dan cara sebar. Sedangkan MPN menggunakan media cair dengan tiga replikasi dan hasil akhir berupa kekeruhan atau perubahan warna atau pembentukan gas yang juga dapat diamati secara visual dan interpretasi hasil dengan merujuk pada tabel MPN. Dikenal 2 cara yaitu metode 3 tabung dan metode 5 tabung. Metode kuantitatif dilakukan dengan beberapa tahap yaitu

homogenisasi sampel, tahap pengenceran, tahap pencampuran dengan media, tahap inkubasi dan pengamatan.

#### B. Metode Kualitatif

Pada metode ini dilakukan perbanyakan (*enrichment* pengkayaan) terlebih dahulu dari sel mikroba yang umumnya dalam jumlah yang sangat sedikit dan bahkan dalam kondisi lemah. Ada beberapa tahapan yang dilakukan yaitu tahap pengkayaan (*enrichment*), tahap isolasi pada media selektif, tahap identifikasi dengan metode biokimia, dan dilanjutkan dengan analisa antigenik atau serologi atau imunologi dan bila diperlukan dapat juga dilakukan identifikasi DNA bakteri dengan metode PCR.

#### 2.6.2 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

*Polymerase Chain Reaction* adalah suatu teknik yang dipakai untuk melipatgandakan asam nukleat (DNA atau RNA) secara *in vitro* dengan enzimatis di dalam suatu mesin pengubah yang dikenal *Thermocycler I*. Proses pelipatgandaan DNA ini terjadi melalui tiga tahapan yaitu denaturasi, *annealing* dan ekstensi (Rantam, 2007).

Teknik ini pertama kali dikembangkan oleh Karry Mullis pada tahun 1985. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam secara *in vitro* dengan bantuan enzim *DNA polymerase* dan beberapa bahan pokok lainnya. Komponen-komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah DNA *template*, sepasang primer (suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA *template*), dNTPs (*Deoxynucleotide*

*triphosphates*), buffer PCR, magnesium klorida ( $MgCl_2$ ) dan enzim polimerase DNA (Handoyo, 2001).

Pada awalnya perkembangan metode ini hanya digunakan untuk melipatgandakan molekul DNA, tetapi kemudian dikembangkan lebih lanjut sehingga dapat digunakan pula untuk melipatgandakan dan melakukan kuantitas molekul mRNA (Yuwono, 2006). Metode PCR telah digunakan untuk berbagai kepentingan diantaranya untuk deteksi suatu gen, diagnosis suatu penyakit, kloning dan mutagenesis suatu gen (Murwantoko, 2006).

### **2.6.2.1 Tahapan PCR**

#### **A. Denaturasi DNA**

Denaturasi DNA merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Denaturasi untai ganda DNA merupakan langkah yang kritis selama proses PCR. Temperatur yang tinggi pada awal proses menyebabkan pemisahan untai ganda DNA. Pada tahap ini, seluruh reaksi enzim tidak berjalan, misalnya reaksi polimerisasi pada siklus yang sebelumnya (Gaffar, 2007). Temperatur pada tahap denaturasi pada kisaran 92-95°C. Suhu 94°C merupakan pilihan standar selama 30-60 detik. Pada suhu ini DNA utas ganda akan memisah menjadi utas tunggal (Fatchiyah, 2006).

#### **B. Annealing**

Annealing merupakan tahap dimana *primer* akan menempel pada sekuen komplementer utas tunggal DNA cetakan (*DNA template*). Primer terdiri dari 18-25 basa nukleotida, mengandung 50-60% guanin (G) dan sitosin (C). Sekuens DNA dalam masing-masing primer itu sendiri juga sebaiknya tidak



saling berkomplemen, karena hal ini akan mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder pada primer tersebut dan mengurangi efisiensi PCR (Yusuf, 2010).

Sintesis DNA ini berlangsung dari arah 5' ke 3'. Agar sintesis DNA dapat berlangsung dengan baik maka dalam reaksi tersebut diperlukan adanya enzim DNA *polymerase*, misalnya *Taq (Thermus aquaticus) polymerase* dan  $MgCl_2$ . Sementara kebutuhan energi dan nukleotida terpenuhi dari dNTPs. Reaksi sintesis DNA pada tahap ini tergantung pada suhu *annealing* dari primer yang digunakan. Waktu *annealing* yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30-45 detik. Kisaran temperatur penempelan yang digunakan antara 36-72°C, namun suhu yang biasa dilakukan antara 50-60°C. Suhu *annealing* primer tersebut dipengaruhi oleh komponen buffer, konsentrasi primer dan DNA *template* (Fatchiyah, 2006).

### C. *Extension*

*Extension* atau elongasi atau perpanjangan. Selama tahap ini *Taq polymerase* memulai aktivitas memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada suhu 72°C diperkirakan 35-100 nukleotida/detik yang bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam dan molekul DNA target. Diakhir siklus PCR waktu yang digunakan untuk tahap ini diperpanjang sampai 5 menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan terbentuk DNA untai ganda (Yusuf, 2010).

Temperatur *extension* berkisar antara 70-72°C. Umumnya, reaksi perpanjangan rantai ini terjadi pada suhu 72°C. Primer yang telah menempel

tadi akan mengalami perpanjangan dengan dNTP yang komplemen pada sisi 3'-nya (Gaffar, 2007). Pada tahap ini DNA *polymerase* akan memasangkan dNTP yang sesuai pada pasangannya, jika basa pada *template* adalah A, maka akan dipasangkan dNTP, begitu seterusnya (pasangan A adalah T, C dengan G, begitu pula sebaliknya). Enzim akan memperpanjang rantai baru ini hingga ke ujung. Lama waktu ekstensi bergantung pada panjang daerah yang akan diamplifikasi (Fatchiyah, 2006).

### 2.6.2.2 Komponen PCR

#### A. DNA *template*

Fungsi DNA *template* di dalam proses PCR adalah sebagai cetakan untuk pembentukan molekul DNA baru yang sama. DNA *template* ini dapat berupa DNA kromosom, DNA plasmid ataupun fragmen DNA apapun asal di dalam DNA *template* tersebut mengandung fragmen DNA target yang dituju. Penyiapan DNA *template* untuk proses PCR dapat dilakukan dengan menggunakan metode lisis sel ataupun dengan cara melakukan isolasi DNA kromosom atau DNA plasmid dengan menggunakan metode standar yang ada (Handoyo, 2001).

#### B. Primer

Keberhasilan suatu proses PCR sangat tergantung dari primer yang digunakan. Primer adalah sepasang DNA utas tunggal atau oligonukleotida pendek yang menginisiasi sekaligus membatasi reaksi pemanjangan rantai atau polimerisasi DNA. Primer dirancang untuk memiliki *sequence* yang komplemen dengan DNA *template*, jadi dirancang agar menempel mengapit

daerah tertentu yang diinginkan (Susanto, 2008).

Menurut Suwarno (2005), proses PCR memerlukan sekurang-kurangnya 2 macam primer, yakni primer *forward* dan primer *reverse*. Masing-masing primer merupakan suatu rantai nukleotida, mempunyai urutan nukleotida yang berpasangan dengan nukleotida dan mengapit kedua ujung fragmen DNA yang diamplifikasi. Konsentrasi primer antara 0,1 dan 0,5  $\mu\text{M}$  adalah optimal. Konsentrasi primer yang terlalu tinggi akan meningkatkan salah menempel, akumulasi hasil produk PCR yang tidak spesifik dan terjadinya *artefag* yang disebut primer dimer (Rantam, 2007).

Menurut Handoyo (2001), dalam melakukan perancangan primer harus dipenuhi kriteria-kriteria sebagai berikut:

- **Panjang primer**

Di dalam merancang primer perlu diperhatikan panjang primer yang akan dipilih. Umumnya panjang primer berkisar antara 18 – 30 basa. Primer dengan panjang kurang dari 18 basa akan menjadikan spesifisitas primer rendah. Sedangkan untuk panjang primer lebih dari 30 basa tidak akan meningkatkan spesifisitas primer secara bermakna dan ini akan menyebabkan lebih mahal.

- **Komposisi primer**

Dalam merancang suatu primer perlu diperhatikan komposisinya. Rentetan nukleotida yang sama perlu dihindari, hal ini dapat menurunkan spesifisitas primer yang dapat memungkinkan terjadinya *mispriming* di tempat lain. Kandungan GC harus antara 45-60%.

- **Melting temperature ( $T_m$ )**

*Melting temperatur* ( $T_m$ ) adalah temperatur di mana 50% untai ganda DNA terpisah. Pemilihan  $T_m$  suatu primer sangat penting karena  $T_m$  primer akan berpengaruh sekali di dalam pemilihan suhu *annealing* proses PCR.  $T_m$  berkaitan dengan komposisi primer dan panjang primer. Sebaiknya  $T_m$  primer berkisar antara 50-65°C.

- **Interaksi primer-primer**

Interaksi primer-primer seperti *self-homology* dan *cross-homology* harus dihindari. Demikian juga dengan terjadinya *mispriming* pada daerah lain yang tidak dikehendaki, ini semua dapat menyebabkan spesifisitas primer menjadi rendah dan di samping itu konsentrasi primer yang digunakan menjadi berkurang selama proses karena terjadinya *mispriming*. Keadaan ini akan berpengaruh pada efisiensi proses PCR.

### C. dNTPs (*Deoxynucleotide triphosphates*)

dNTPs merupakan suatu campuran yang terdiri atas dATP (*deoksiadenosin trifosfat*), dTTP (*deoksitimidin trifosfat*), dCTP (*deoksisitidin trifosfat*) dan dGTP (*deoksiguanosin trifosfat*). Dalam proses PCR, dNTPs bertindak sebagai *building block* DNA yang diperlukan dalam proses ekstensi DNA. dNTP akan menempel pada gugus -OH pada ujung 3' dari primer membentuk untai baru yang komplementer dengan untai DNA *template* (Handoyo, 2001).

### D. Enzim polymerase DNA

*Enzim polymerase* DNA berfungsi sebagai katalisis untuk reaksi

polimerisasi DNA. Pada proses PCR, enzim ini diperlukan untuk tahap ekstensi DNA. Enzim *polymerase* DNA yang digunakan untuk proses PCR diisolasi dari bakteri termofilik atau hipertermofilik, oleh karena itu enzim ini bersifat termostabil (Handoyo, 2001).

#### E. Buffer PCR dan $MgCl_2$

Reaksi PCR hanya akan berlangsung pada kondisi pH tertentu. Oleh karena itu untuk melakukan proses PCR diperlukan buffer PCR. Fungsi buffer di sini adalah untuk menjamin pH medium (Handoyo, 2001).

$MgCl_2$  bertindak sebagai kofaktor yang berfungsi menstimulasi aktivitas DNA polimerase. Konsentrasi ion  $Mg^{2+}$  dalam campuran reaksi merupakan hal yang sangat kritis. Konsentrasi ion  $Mg^{2+}$  ini sangat mempengaruhi proses primer *annealing*, denaturasi, spesifisitas produk, aktivitas enzim dan fidelitas reaksi. Penambahan berbagai pereaksi harus selalu diperhatikan, jangan sampai ada ion lain maupun *chelating agent* yang dapat mengganggu konsentrasi ion  $Mg^{2+}$  dalam larutan. Secara umum, sebaiknya konsentrasi ion  $Mg^{2+}$  bebas yang terdapat dalam larutan adalah sekitar 2 mM (Gaffar, 2007).

#### 2.6.2.3 PCR *Thermal Cycler*

PCR *Thermal Cycler* pertama kali dikembangkan oleh perusahaan PerkinElmer sebagai pemegang paten asli. Pada saat ini telah diproduksi berbagai macam tipe alat PCR *thermal cycler* ini dari berbagai perusahaan yang bergerak dalam bioteknologi. Walaupun nama masing-masing alat itu berbeda tetapi prinsip kerjanya sama. Alat ini secara tepat meregulasi temperatur dan siklus waktu yang dibutuhkan untuk reproduibilitas dan keakuratan reaksi amplifikasi (Fatchiyah,

2006). Kegagalan PCR kebanyakan disebabkan denaturasi DNA *template* produk PCR yang tidak sempurna (Suwarno, 2005).

#### **2.6.2.4 Elektroforesis**

Metode elektroforesis mulai berkembang akhir abad ke-19 setelah ditemukan penelitian yang menunjukkan adanya efek dari listrik terhadap partikel-partikel atau molekul-molekul yang bermuatan listrik, dalam hal ini termasuk juga protein. Metode elektroforesis baru benar-benar dipakai oleh para peneliti genetik di tahun 1957 setelah Hunter dan Moller mempunyai ide penelitian dengan menggunakan sifat-sifat enzim sebagai katalisator untuk memperlihatkan keberadaannya secara kimia histologi (Zona elektroforesis) (Pasteur *dkk*, 1988).

Elektroforesis adalah suatu cara analisis kimiawi yang didasarkan pada pergerakan molekul-molekul protein bermuatan di dalam medan listrik (titik isoelektrik). Pergerakan molekul dalam medan listrik dipengaruhi oleh bentuk, ukuran, besar muatan dan sifat kimia dari molekul. Metode elektroforesis banyak dilakukan untuk pengamatan taksonomi, sistematik dan genetik serta untuk mengidentifikasi spesies hewan maupun tumbuhan (bio-sistematik). Dapat pula digunakan untuk melihat *phylogenetic recon-struction* (rekonstruksi secara Filogenetik) dari suatu jenis hewan atau tumbuhan (Pratiwi, 2001).

Untuk melihat hasil amplifikasi DNA, produk PCR yang diperoleh dimigrasikan pada gel agarose (elektroforesis). Konsentrasi agarose ditentukan oleh besarnya nukleotida dari DNA yang diamplifikasi. Untuk memperoleh gambaran yang lebih baik, semakin besar jumlah nukleotidanya maka semakin

kecil konsentrasi agarosenya, agarose ditambahkan ethidium bromid, selanjutnya dibaca dengan iluminasi ultraviolet (Nidom dan De Vries, 2007).

#### **2.6.2.5 Jenis-jenis PCR**

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan uji mikrobiologis yang lebih sensitif dibandingkan dengan metode konvensional. Keunggulan PCR dikatakan sangat tinggi. Hal ini didasarkan atas spesifitas dan keakuratannya. Spesifitas PCR terletak pada kemampuannya mengamplifikasi sehingga menghasilkan produk melalui sejumlah siklus. Keakuratan yang tinggi karena DNA polymerase mampu menghindari kesalahan pada amplifikasi produk. Menurut Yusuf (2010), Teknik PCR dapat dimodifikasi ke dalam beberapa jenis diantaranya :

1. *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Metode ini digunakan untuk membedakan organisme 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*. Metode 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*. Metode ini 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 sekuens 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)*. Metode ini bertujuan untuk mendeteksi polimorfisme pada tingkat DNA. Metode ini dikembangkan



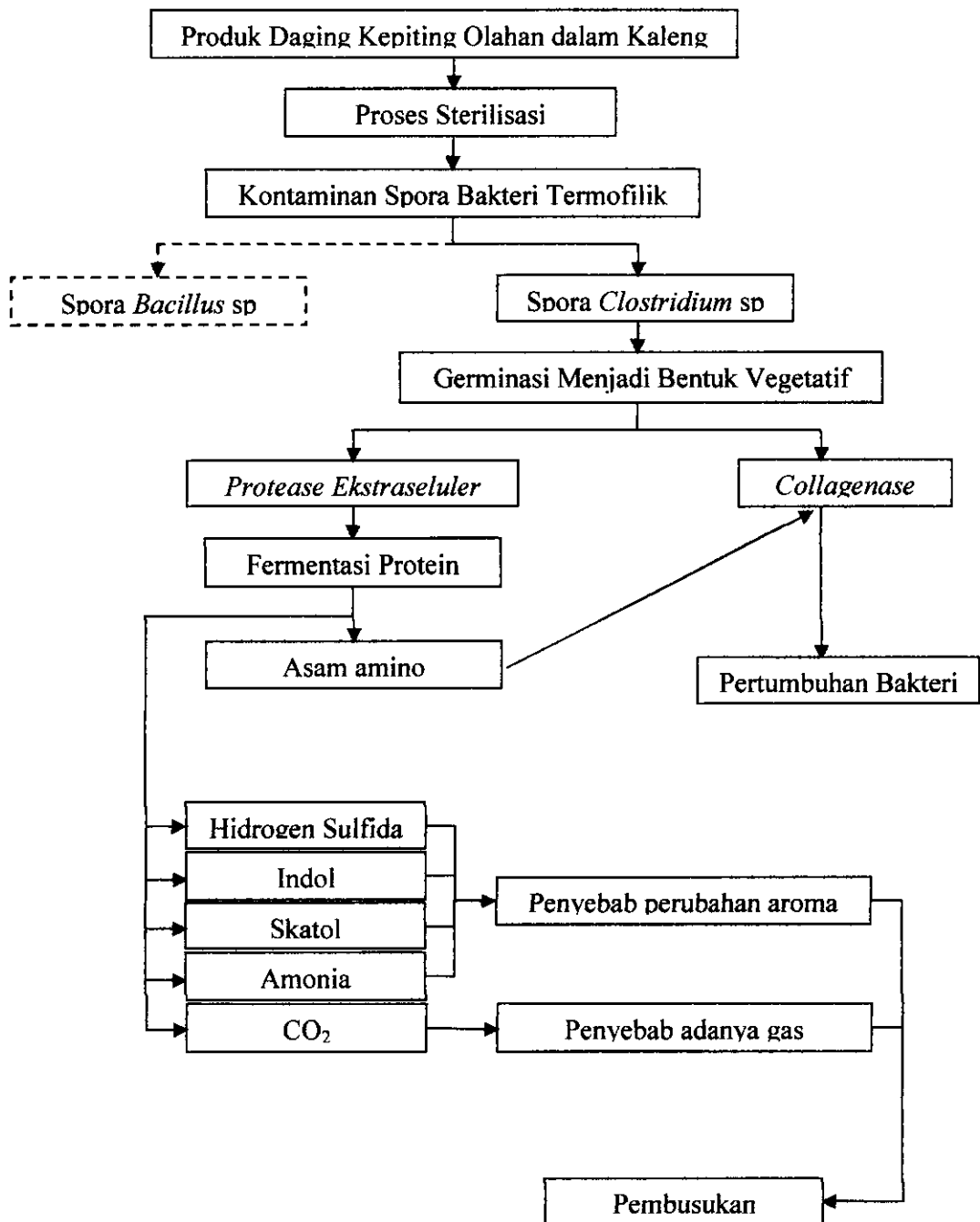
oleh Welsh and Mc Clelland (1990) dengan cara mengkombinasikan teknik PCR menggunakan primer-primer dengan sequens acak untuk keperluan amplifikasi lokus acak dari genom.

## **BAB III**

# **KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN**

## BAB III KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian



Keterangan :

—————> : Diteliti

- - - - -> : Tidak diteliti

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. Makanan kaleng membutuhkan penanganan yang lebih intensif serta ditunjang dengan peralatan yang serba otomatis. Sebab dalam proses pengalengan ikan atau hasil perikanan lain dimasukkan dalam suatu wadah yang ditutup rapat agar udara maupun mikroorganisme perusak yang datang dari luar tidak dapat masuk. Selanjutnya wadah dipanasi pada suhu dan jangka waktu tertentu untuk mematikan mikroorganisme yang ikut terbawa pada produk yang dikalengkan (Murniyati dan Sunarman, 2004).

Penanganan kaleng yang tidak tepat dapat menjadi tempat berkembangbiak bagi mikroba. Kerusakan utama yang terjadi pada bahan makanan yang dikemas dalam kaleng adalah kerusakan yang diakibatkan oleh mikroba (Shaffiyah, 2008). Kontaminasi mikroba pada makanan kaleng tersebut bisa disebabkan karena kualitas bahan baku yang jelek, proses pengemasan kurang sempurna atau kerusakan saat distribusi. Makanan kaleng telah dilaporkan terutama terkontaminasi oleh spora bakteri dari genus *Bacillus*, *Clostridium* dan *Desulfotomaculum* (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 hasil dari proses metabolisme tersebut adalah pembusukan.

*Clostridium* adalah kelompok bakteri pembentuk spora yang dibedakan berdasarkan kemampuannya dalam memfermentasi sumber karbon. Kelompok ini dibagi menjadi organisme saccharolytic dan proteolitik. *Clostridium* proteolitik merupakan agen utama dalam pembusukan makanan kaleng karena kemampuannya membentuk spora tahan panas dan mampu memfermentasi asam amino. *Clostridium sporogenes* adalah organisme yang banyak dilaporkan sebagai organisme pembusuk pada tomat, susu, daging dan produk cokelat (Oranusi et al, 2012).

Produk makanan kaleng sering menyebabkan spora bakteri pembusuk genus *Clostridium* mengalami germinasi, hal tersebut dikarenakan oleh perlakuan panas yang tidak cukup. Pencemaran oleh *Clostridium* akan menghasilkan bau busuk. Hal ini karena *Clostridium* proteolitik dapat menyebabkan dekomposisi protein yang akan menghasilkan campuran berbagai metabolit berbau busuk. Metabolik berbau busuk tersebut berasal dari pemecahan bahan-bahan organik yang mengandung senyawa-senyawa nitrogen yang mempunyai bobot molekul rendah seperti peptide dan asam amino. Asam amino yang berasal dari protein dan purine serta basis pirimidin difermentasikan oleh *protease ekstraseluler*. Hidrolisis protein oleh *Clostridium* proteolitik menyebabkan perubahan tekstur pada produk, sehingga mempercepat pembusukan. Perubahan secara anaerobik dari protein menjadi asam amino, mengakibatkan perubahan aroma dan mengakibatkan bau busuk, hal ini disebabkan karena terbentuknya hidrogen sulfida, amin, amonia, indol dan skatol.

Selain *Clostridium* proteolitik mempunyai *protease ekstraseluler* yang berperan dalam proses pembusukan makanan, bakteri ini juga mempunyai *collagenase (colA)*. Produksi *collagenase* bakteri sangat penting terhadap kelangsungan hidup dan mendukung pertumbuhan pada media minimal yang digunakan, metabolismenya tergantung pada penyerapan peptida kecil dan asam amino. Oleh sebab itu *colA* memainkan peran penting untuk penyerapan peptida kecil dan asam amino pada *C. sporogenes* (Zhang *et al*, 2015).

## **BAB IV**

# MATERI DAN METODE

## **BAB IV MATERI DAN METODE**

### **4.1 Jenis Penelitian**

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

### **4.2 Bahan Penelitian**

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daging kepiting olahan dalam kaleng. Media untuk isolasi dan identifikasi adalah *Nutrient Agar* (NA), aquades dan untuk pewarnaan Gram (kristal violet, safranin, lugol, alkohol aseton). Bahan untuk ekstraksi DNA, amplifikasi dengan *Polymerase Chain Reaction* dan elektroforesis antara lain *distilled water*, PCR buffer, dNTP, MgCl<sub>2</sub>, rekombinan *Taq* DNA *polymerase*, *loading dye*, gel agarose 2% dan marker.

### **4.3 Instrumen Penelitian**

Peralatan yang digunakan untuk pengambilan sampel adalah termos (*ice box*). Peralatan yang digunakan untuk identifikasi bakteri *Clostridium* meliputi *autoclave*, pembuka kaleng (*Bacti-Disc cutter*), labu Erlenmeyer, tabung reaksi, petri steril, pipet steril, inkubator, mikroskop dan Oxoid Microbact™ Kit (12A + 12B). Peralatan yang digunakan untuk ekstraksi DNA, amplifikasi dengan *Polymerase Chain Reaction* dan



elektroforesis meliputi tabung reaksi, *micropipet*, tabung *Eppendorf*, *microtube*, *white tip*, *yellow tip*, *thermal cycler* PCR, *transluminator-UV*, *vortex*, *gel electrophoresis apparatus* (Biorad), inkubator dan *autoclave*.

#### **4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di dua tempat yaitu Laboratorium Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga untuk tempat isolasi hingga konfirmasi bakteri *Clostridium* dan Laboratorium TDDC di *Tropical Disease Centre* Universitas Airlangga sebagai tempat pengujian PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Waktu penelitian mulai dari bulan Desember 2014 sampai dengan Mei 2015.

#### **4.5 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data**

##### **4.5.1 Pengambilan sampel**

Sampel didapat dari pabrik produk daging kepiting olahan dalam kaleng yang di kirim ke *Tropical Disease Centre* Universitas Airlangga.

##### **4.5.2 Pengumpulan data**

###### **4.5.2.1 Pemeriksaan organoleptik dan bakteriologis**

Sebelum melakukan analisis, permukaan kaleng dibersihkan dengan alkohol 70%. Pembukaan kaleng dilakukan dekat dengan nyala bunsen dengan tujuan untuk menghindari kontaminasi.

Terlebih dahulu sampel produk daging kepiting olahan dalam kaleng diperiksa secara organoleptik yang meliputi penampilan fisik kaleng secara utuh. Kemudian kaleng dibuka dan diamati isi makanan didalamnya yang meliputi adanya perubahan warna, bau dan tekstur daging kepiting.

Setelah pemeriksaan organoleptik selesai, sampel pada bagian dalam makanan kaleng diambil dan dicampur dengan aquades hingga homogen. Kemudian dituang pada cawan petri yang telah berisi media NA (*Nutrient Agar*) dan diinkubasi secara anaerobik pada suhu 35-37°C selama 48-72 jam. Amati koloni yang tumbuh. Untuk memurnikannya, koloni yang tumbuh dipindahkan dalam media NA dan diinkubasi secara anaerobik pada suhu 35-37°C selama 48-72 jam. Koloni yang tumbuh tadi juga dilakukan pemeriksaan mikroskopis dengan pewarnaan Gram pada pembesaran 1000x dengan minyak emersi. Kuman yang tumbuh setelah pemurnian dilakukan uji biokimia dengan menggunakan Oxoid Microbact™ Kit (12A + 12B), dimana Kit 12A (meliputi uji H<sub>2</sub>S, Glucose, Mannitol dan Indole) dan Kit 12B (meliputi Gelatin, Rhamnose dan Lactose), kemudian diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 12-48 jam. Hasil dari uji biokimia tersebut disesuaikan dengan kunci pembanding pada *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* (2006).

#### 4.5.2.2 Ekstraksi DNA

DNA genom bakteri diekstraksi dari kultur sel segar (setelah di kultur pada *Nutrient Agar* selama 48-72 jam pada suhu 35-37°C secara anaerobik) dengan menggunakan Genomic DNA Purification Kit (Fermentas) sesuai dengan instruksi manufaktur.

#### 4.5.2.3 Design primer

Amplifikasi PCR ditujukan untuk mengamplifikasi spesies *Clostridium*. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi spesies tersebut (Cremonesi *et al*, 2012) adalah :

Primer name	Target gene	Primer sequence (5'-3')	Expected size (bp)	Lokasi gen <i>colA</i>
CI-SPOR-F3031	<i>colA</i>	TTGGGATTTTGGGGATAACA	549	2982-3000 bp
CI-SPOR-R3579		TCCGTATCGTTGTCGTCCTTG		3512-3531 bp

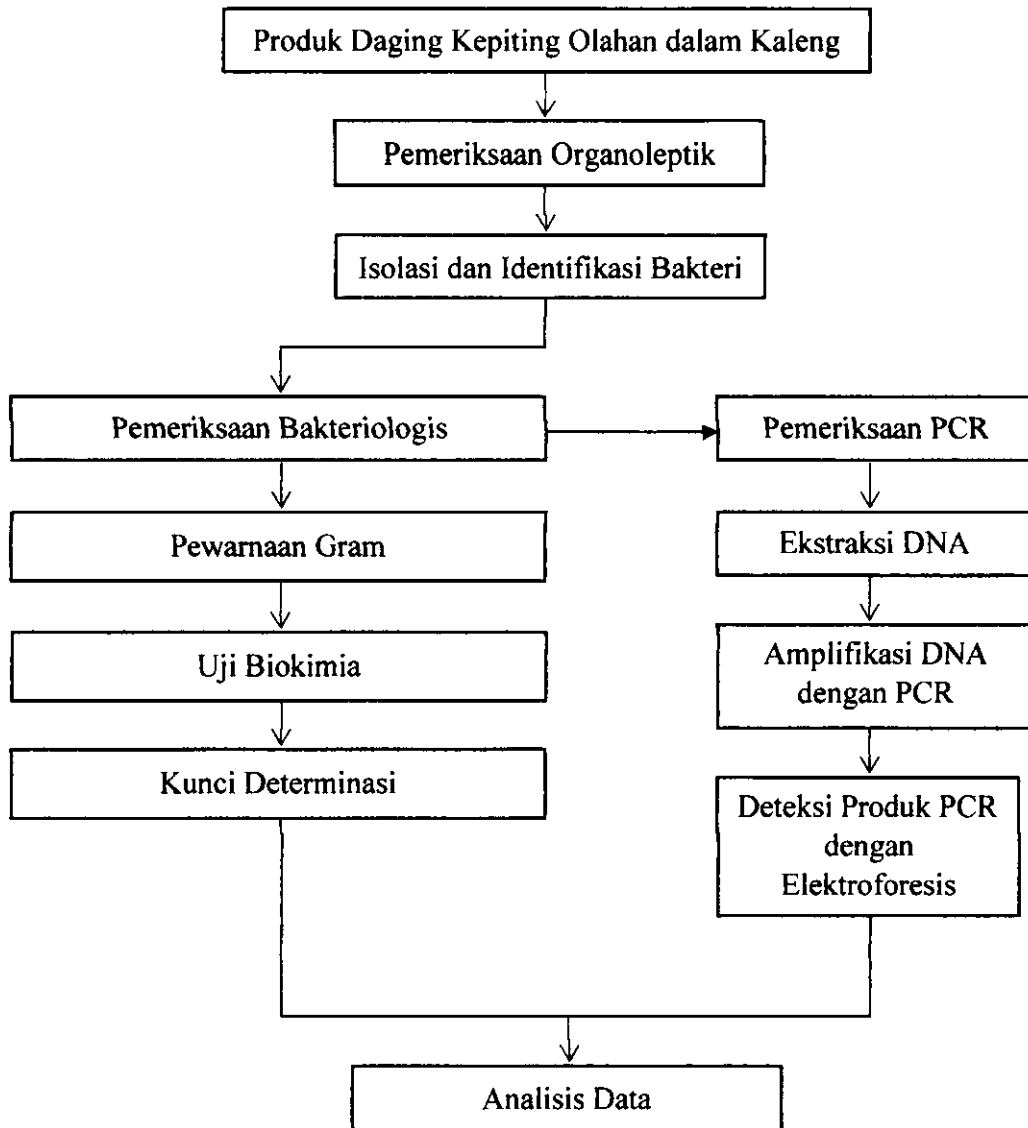
#### 4.5.2.4 Prosedur amplifikasi PCR

Reagen untuk PCR terdiri dari 12,5 µl Master Mix, 0,5 µl *distilled water* steril, 1 µl *primer forward*, 1 µl *primer reverse*, 5 µl genom DNA dan *loading dye*. Selanjutnya dimasukkan program *thermocycler*. Program PCR terdiri dari denaturasi awal 95°C selama 5 menit dan diikuti 30 siklus denaturasi 94°C selama 60 detik, *annealing* 62°C selama 60 detik dan *extension* 72°C selama 60 detik. *Final extension* dilakukan pada suhu 72°C selama 5 menit dengan siklus 1 kali.

#### 4.5.2.5 Elektroforesis

Agarose gel 2% dalam 1 x TAE *buffer* disiapkan. Hasil dari produk PCR sebanyak 12  $\mu$ l dicampur dengan *loading buffer*. Cairan tersebut dimasukkan ke dalam sumuran agarose gel 100 bp. Roche digunakan sebagai marker. Diwarnai dengan *loading dye*. Visualisasi fragment DNA yang terbentuk dengan menggunakan UV transilluminator.

#### 4.6 Kerangka Operasional



## **BAB V**

### **HASIL PENELITIAN**

## BAB V HASIL PENELITIAN

### 5.1 Hasil Isolasi dan Identifikasi *Clostridium sporogenes*

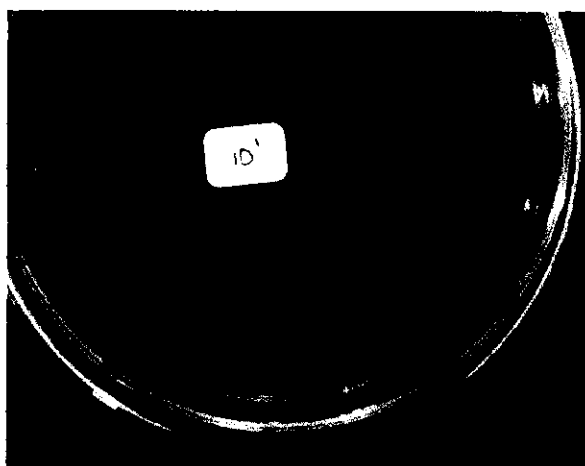
Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari pemeriksaan sampel produk daging kepiting olahan dalam kaleng berhasil diisolasi bakteri *Clostridium sporogenes*. Identifikasi bakteri diawali dengan melakukan pemeriksaan organoleptik, isolasi bakteri, pemeriksaan mikroskopis dan pemeriksaan fisiologis bakteri.

Berdasarkan pemeriksaan organoleptik sampel produk daging kepiting olahan dalam kaleng didapatkan hasil bahwa secara fisik bentuk kaleng masih utuh, normal, tidak mengembung, tidak bocor dan tidak korosif. Namun ketika kaleng dibuka didapatkan hasil bahwa daging kepiting didalamnya sudah berbau busuk dan warna daging tidak berubah. Gambar daging kepiting kaleng dapat dilihat pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Daging kepiting kaleng yang telah dibuka, sudah berbau busuk dan warna daging tidak berubah.

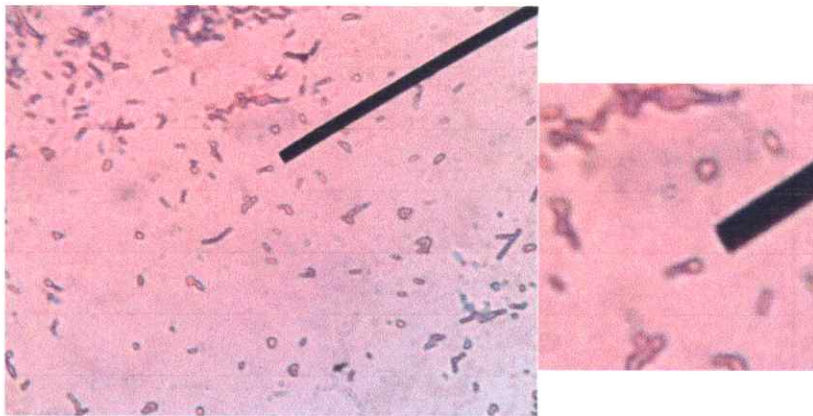
Setelah pemeriksaan organoleptik selesai, kemudian dilakukan isolasi bakteri pada Media *Nutrient Agar* (NA) secara anaerob pada suhu 35-37°C selama 48-72 jam. Media NA merupakan media yang digunakan untuk membiakkan bakteri. Kandungan protein pada NA berperan dalam pertumbuhan bakteri. *Clostridium* merupakan bakteri proteolitik yang mampu mendekomposisi protein. Isolasi *Clostridium* pada media NA dapat dilihat pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2 Pertumbuhan *Clostridium* sp. pada media NA.

Selanjutnya dilakukan teknik identifikasi bakteri dengan menggunakan metode pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram merupakan salah satu prosedur yang paling banyak digunakan untuk mencirikan bakteri. Berdasarkan pemeriksaan mikroskopik dengan pewarnaan Gram didapatkan hasil bahwa bakteri *Clostridium* merupakan bakteri Gram positif (+), berwarna biru, bentuk batang, single dan membentuk spora yang letaknya diujung sehingga tampak seperti penabuh genderang (*drum stick*) seperti yang tampak pada Gambar 5.3.



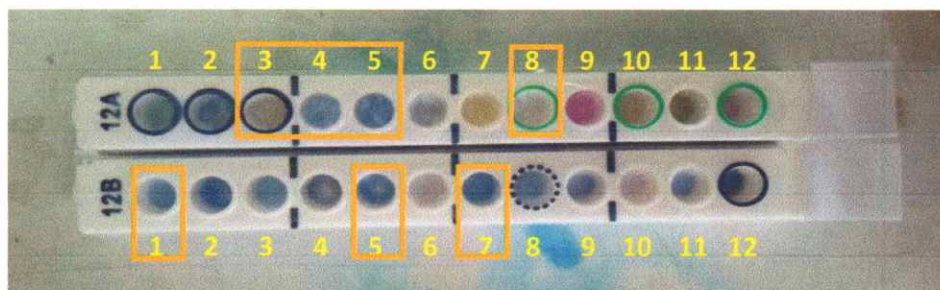


Gambar 5.3 Pemeriksaan mikroskopis dengan pewarnaan Gram bakteri *Clostridium* sp. (sesuai jarum penunjuk) dengan perbesaran 1000x.

Selanjutnya dilakukan pemeriksaan biokimia bakteri dengan menggunakan Oxoid Microbact™ Kit (12A + 12B). Hanya 7 dari 24 sumur atau *well* dalam Oxoid Microbact™ Kit (12A + 12B) yang digunakan untuk pemeriksaan bakteri *Clostridium* sp dan hasilnya disesuaikan dengan kunci pembandingan pada *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* (2006). Hasil pemeriksaan biokimia bakteri dapat dilihat pada Gambar 5.4 dan Table 5.1.

Prosentase kemiripan dengan *Clostridium sporogenes* :

$$\frac{6}{7} \times 100\% = 85,71\%$$



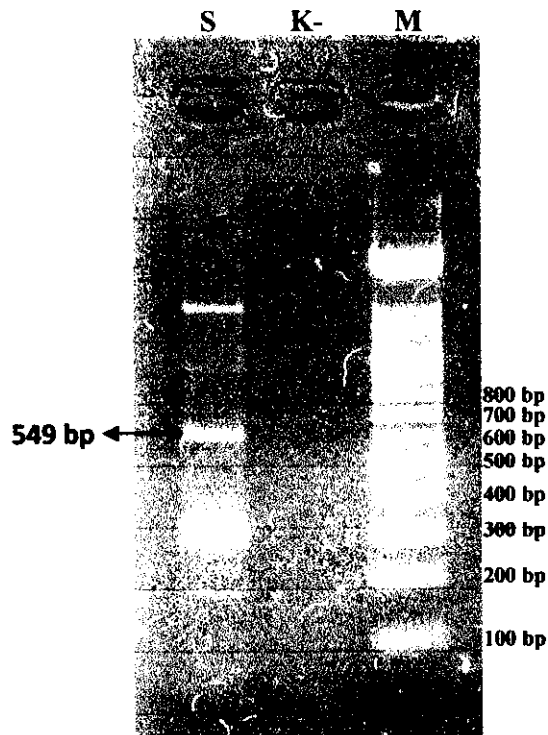
Gambar 5. 4 Pemeriksaan biokimia bakteri menggunakan Oxoid Microbact™ Kit (12A + 12B). Sumur atau *well* yang digunakan terdapat dalam garis kotak kuning. Keterangan : Kit 12A meliputi (3 : H<sub>2</sub>S, 4 : Glucose, 5 : Mannitol, 8 : Indole) dan Kit 12B meliputi (1 : Gelatin, 5 : Rhamnose, 7 : Lactose).

Tabel 5.1 Hasil Identifikasi *Clostridium* sp pada uji biokimia.

12 A				<i>Clostridium sporogenes</i>
Well No.	Jenis Pengujian	Indikator	Hasil (+/-)	
3	H <sub>2</sub> S	(-) Kekuningan (+) Hitam	Negatif (-)	Negatif (-)
4	Glucose	(-) Biru-Hijau (+) Kuning	Negatif (-)	Negatif(-)/Positif(+)
5	Mannitol	(-) Biru-Hijau (+) Kuning	Negatif (-)	Negatif (-)
8	Indole	(-) Tidak berwarna (+) Merah Muda-Merah	Negatif (-)	Negatif (-)
12 B				<i>Clostridium sporogenes</i>
Well No.	Jenis Pengujian	Indikator	(+/-)	
1	Gelatin	(-) Tidak berwarna (+) Hitam	Negatif (-)	Positif (+)
5	Rhamnose	(-) Biru-Hijau (+) Kuning	Negatif (-)	Negatif (-)
7	Lactose	(-) Biru-Hijau (+) Kuning	Negatif (-)	Negatif (-)

## 5.2 Hasil Identifikasi gen *colA* dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Hasil yang diperoleh berupa pola pita DNA (band DNA) yang menunjukkan jumlah dan pola yang berbeda. Produk PCR dengan ukuran 549 bp dinyatakan positif gen *colA* (Gambar 5.5).



Gambar 5.5 Hasil elektroforesis produk PCR, gen *colA* ditunjukkan dengan adanya pita band pada 549 bp dengan Gel Elektrophoresis (*agarose*) 2% (ket M : DNA marker 100 bp, K- : Kontrol negatif dan S : sampel kultur *Clostridium* sp).

**BAB VI**  
**PEMBAHASAN**

## BAB VI PEMBAHASAN

### 6.1 *Clostridium Sporogenes* pada Produk Makanan Daging Kepiting Olahan dalam Kaleng

Pada penelitian ini telah berhasil diisolasi bakteri *Clostridium sporogenes* dari produk daging kepiting olahan dalam kaleng. Isolat bakteri didapatkan dari sampel produk daging kepiting olahan dalam kaleng yang secara fisik bentuk kaleng normal tidak mengembang, namun ketika kaleng dibuka daging kepitingnya sudah berbau busuk.

Berdasarkan pemeriksaan organoleptik sampel produk daging kepiting olahan dalam kaleng didapatkan hasil bahwa secara fisik bentuk kaleng masih utuh, normal, tidak mengembang, tidak bocor dan tidak korosif. Namun ketika kaleng dibuka daging kepiting didalamnya sudah berbau busuk dan warna daging tidak berubah. Hal tersebut dikarenakan *Clostridium* proteolitik mampu mendekomposisi protein menjadi berbagai metabolit berbau busuk. Metabolik berbau busuk tersebut berasal dari pemecahan bahan organik yang mengandung senyawa nitrogen yang mempunyai bobot molekul rendah seperti peptide dan asam amino oleh *protease ekstraseluler*. Hidrolisis protein tersebut menyebabkan perubahan tekstur akibat koagulasi dan likuifikasi protein, sehingga mempercepat pembusukan serta terjadinya penghancuran protein struktural (Bradbury *et al.*, 2012).

Hasil pemeriksaan bakteriologis menunjukkan bahwa bakteri pembusuk pada produk daging kepiting olahan dalam kaleng memiliki kemiripan dengan

genus *Clostridium* sp. *Clostridium* adalah bakteri gram positif (+), bentuk batang, single, motil dengan flagela peritritik dan membentuk spora. Spora berbentuk oval, terletak subterminal dan lebih besar dari sel vegetatif bakteri (Zhang *et al*, 2015). Spora merupakan bentuk dorman yang terbentuk pada kondisi lingkungan tidak menguntungkan (Brunt *et al*, 2014). Spora *Clostridium* mampu hidup dalam periode yang lama dan dapat germinasi menjadi bentuk vegetatif pada kondisi lingkungan yang sesuai, misal terstimulasi karena adanya nutrisi. *Clostridium* merupakan bakteri obligat anaerob karena tidak membutuhkan oksigen dalam hidupnya. Kehadiran oksigen dalam lingkungan bakteri obligat anaerob dapat menimbulkan toksik bagi bakteri (Liu, 2008).

Berdasarkan pemeriksaan biokimia menggunakan Oxoid Microbact™ Kit (12A + 12B) dengan memanfaatkan 7 dari 24 sumur atau *well* yang ada. Hasil dari 7 *well* yang digunakan, 6 *well* memiliki kemiripan dengan sifat *Clostridium sporogenes* sebesar 86%.

Hasil negatif pada uji glukosa sama dengan sifat *C. sporogenes*. Hal ini dikarenakan *C. sporogenes* mempunyai kemiripan fisik dan genetik dengan *C. botulinum* grup I (*C. botulinum* proteolitik), dimana bakteri ini mendekomposisi protein (Bradbury *et al*, 2012).

*Clostridium sporogenes* tidak memproduksi H<sub>2</sub>S, dan pada uji H<sub>2</sub>S didapatkan hasil negative. Mannitol didapatkan hasil negative karena bakteri tidak memfermentasi mannitol. Indole didapatkan negative karena bakteri tidak memiliki enzim triptonase yang dapat menghidrolisis asam amino jenis tryptophan. Rhamnose dan lactose juga didapatkan hasil negative. Hal ini

sependapat dengan Chaturvedi *et al* (2015), bahwa *C. sporogenes* bereaksi negatif pada uji indole.

Hasil negatif pada uji gelatin berbeda dengan sifat *C. sporogenes* yang positif, dimana *C. sporogenes* diklasifikasikan kedalam genus *Clostridium* proteolitik karena kemampuannya memfermentasi asam amino dan mencairkan gelatin (Allison, 1990).

## **6.2 Gen *colA* pada Sampel Produk Daging Kepiting Olahan dalam Kaleng**

Hasil dari elektroforesis produk *Polymerase Chain Reaction* menunjukkan bahwa dari isolasi sampel produk daging kepiting olahan dalam kaleng terdapat band hasil amplifikasi primer gen *colA*. Diketahui ada 3 band yang muncul, yang spesifik gen *colA* untuk *C. sporogenes* adalah yang memiliki ukuran 549 bp (Cremonesi *et al*, 2012). Hal ini membuktikan bahwa pada sampel produk daging kepiting olahan dalam kaleng tersebut secara genotip terdapat bakteri *C. sporogenes* yang merupakan organisme pembusuk pada makanan kaleng dan produk susu (Chaturvedi *et al*, 2015).

*Clostridium sporogenes* (Clostridia proteolitik) tidak mampu melakukan biosintesis banyak asam amino sebagaimana *C. acetobutylicum* (Clostridia saccharolytic). Produksi enzim *collagenase* (gen *colA*) bakteri sangat penting terhadap kelangsungan hidup dan mendukung pertumbuhan pada media minimal yang digunakan, metabolismenya tergantung pada penyerapan peptida kecil dan asam amino. Oleh sebab itu gen *colA* memainkan peran penting untuk penyerapan peptida kecil dan asam amino pada *C. sporogenes* (Zhang *et al*, 2015).

*Clostridium sporogenes* merupakan organisme pembusuk pada makanan kaleng dan produk susu. Dalam penelitian ini pembusukan pada sampel produk daging kepiting olahan dalam kaleng disebabkan karena adanya kontaminasi bakteri *C. sporogenes*. Kontaminasi tersebut bisa diakibatkan karena proses sterilisasi kurang optimal, sehingga spora bakteri dalam makanan kaleng tidak mati. Spora *C. sporogenes* sangat resisten terhadap kondisi-kondisi (adanya oksigen, ketiadaan nutrisi, perlakuan panas, pengawetan, *high pressure*), namun akan mematikan sel vegetatif bakteri. Apabila spora bakteri dalam makanan kaleng tidak mati dan ketika kondisi lingkungan mendukung, maka spora akan mengalami germinasi dan multiplikasi sel (Brunt *et al*, 2014).

*Clostridium sporogenes* mempunyai kemiripan fisik dan genetik dengan *Clostridium botulinum* grup I (*C. botulinum* proteolitik) (Bradbury *et al*, 2012). Oleh sebab itu spora *C. sporogenes* dan *C. botulinum* dijadikan sebagai alasan prinsip indikator bakteri pembusukan makanan dan masalah keamanan pangan (Brunt *et al*, 2014 dan Peck, 2009) dan sebagai indikator keefektifan dalam produksi makanan (Brown *et al*, 2012 dan Taylor *et al*, 2013).



## **BAB VII**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

## BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN

### 7.1 Kesimpulan

Pada produk daging kepiting olahan dalam kaleng terdapat kontaminan atau cemaran bakteri *Clostridium sporogenes*. Hasil dari uji bakteriologis menunjukkan bahwa bakteri pembusuk tersebut memiliki kemiripan dengan *Clostridium sporogenes* sebesar 86%. Hasil dari elektroforesis produk *Polymerase Chain Reaction* menunjukkan bahwa sampel positif *Clostridium sporogenes* dengan adanya band hasil amplifikasi gen *colA* yang memiliki ukuran 549 bp. Hal ini menunjukkan bahwa pada sampel secara genotip mengandung gen bakteri *Clostridium sporogenes*.

### 7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian dapat diajukan saran sebagai berikut :

1. Bagi produsen, perlu menerapkan HACCP untuk menjamin mutu, keamanan pangan dan kualitas produk daging kepiting olahan dalam kaleng.
2. Bagi produsen, perlu dilakukan pengawasan ketat pada proses sterilisasi guna mencapai suhu 230°C dan waktu tertentu untuk produk daging kepiting olahan dalam kaleng.
3. Bagi konsumen, sebelum produk dikonsumsi harus dipanaskan terlebih dahulu dan sebaiknya hanya sekali makan (harus langsung habis).

4. Bagi peneliti, bisa melakukan penelitian lebih lanjut seperti *sequencing* terhadap bakteri *Clostridium sporogenes* untuk dapat mengetahui strain yang mengkontaminasi produk daging kepiting olahan dalam kaleng. Selain itu, bakteri ini bukan hanya menjadi penyebab pembusukan pada makanan kaleng saja, tetapi juga pada produk susu dan keju.

## DAFTAR PUSTAKA

## DAFTAR PUSTAKA

- Allison, C and George T.M. 1990. Regulation of Protease Production in *Clostridium sporogenes*. MRC Dunn Clinical Nutrition Centre, United Kingdom.
- Arun, K.B. 2008. Food borne microbial pathogen, mechanism and pathogenesis. Purdie University Indiana USA. P. 276.
- BPOM, 2008. Pengujian Mikrobiologi Pangan. Vol. 9, No. 2, Maret 2008.
- Bradbury, M., Greenfield, P., Midgley, D., Li, D., Tran-Dinh, N., Vriesekoop, F., and Brown, J.L. 2012. Draft genome sequence of *Clostridium sporogenes* PA 3679, the common nontoxigenic surrogate for proteolytic *Clostridium botulinum*. J. Bacteriol. 194, 1631-1632.
- Brown, J.L., Tran-Dinh, N., and Chapman, B. 2012. *Clostridium sporogenes* PA3679 and its uses in the derivation of thermal processing schedules for low-acid shelf-stable foods and as a research model for proteolytic *Clostridium botulinum*. J. Food Prot. 75, 779e792.
- Brunt, J., Plowman, J., Gaskin, D.J.H., Itchner, M., Carter, A.T., and Peck, M.W. 2014. Functional characterisation of germinant receptors in *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes* presents novel insights into spore germination systems. PLoS Pathog. 10, e1004382.
- 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.
- Chaturvedi, A., Sangeeta, S., Ankita, G., and Vinay, K. 2015. Incidence of spore forming *Clostridium sporogenes* in different dairy products and their industrial and public health significant. *Pharma innovation jurnal* 2015; 3(11): 30-32.
- Chong, M., Rahim, R.A., Shirai, Y., and Hassan, M.A. 2009. Biohydrogen production by *Clostridium butyricum* EB6 from palm oil mill effluent. *Int J Hydrogen Energy*;34(2):764-771.
- Chotiah, S dan Lily, N. 2007. Viabilitas *Clostridium* spp. Setelah Konservasi Eks Situ dalam Jangka Waktu Lama pada Suhu Kamar. Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor.
- Cremonesi, P., Laura, V., Tiziana, S., Stefano, M., and Milena, B. 2012. Identification of *Clostridium beijerinckii*, *Cl. butyricum*, *Cl. sporogenes*, *Cl.tyrobutyricum* isolated from silage, raw milk and hard cheese by a

- multiplex PCR assay. *Journal of Dairy Research* / Volume 79 / Issue 03 / August 2012, pp 318-323
- Depkes RI, 2002. Grafik Persentase Sumber Keracunan Makanan 1997-2000. Direktorat Penyehatan Makanan dan Sanitasi Dirjen PPM dan PL. Jakarta.
- Fatchiyah, 2006. *Polymerase Chain Reaction: Dasar Teknik Amplifikasi DNA dan Seluler*. Universitas Brawijaya. Malang.
- Fatchiyah, S., Widyarti, F. I., dan Arumingtyas. 2006. PCR, RT-PCR dan Real Time PCR. <http://inherent.brawijaya.ac.id/biomol>.
- 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.
- Gaspersz, V. 2002. *Pedoman Implementasi Program Six Sigma Terintegrasi Dengan ISO 9001:2000, MBNQA dan HACCP*. PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Hadiwiyoto, S. 1992. *Hasil Olahan Susu, Ikan, Daging dan Telur*. Penerbit Liberty. Yogyakarta.
- Handoyo, D. dan Ari, R. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas*, Vol. 9. No. 1.
- Hayes, P.R. dan Forsythie S.J. 2001. *Food Hygiene, Microbiology and Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP)*. Maryland : Aspek Publisher, Inc. Gaithesburg.
- Helms, M., Vastrup, P., Gerner-Smidt, P., and Molbak, K. 2003. Short and Long Term Mortality Associated with Foodborne Bacterial Gastrointestinal Infection: registry based study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 326 (7385), 357.
- Hogg, S. 2005. *Essential Microbiology (1st ed)*. Wiley.
- Junais, I., Brasit, N., dan Latief, R. 2011. *Kajian Strategi Pengawasan dan Pengendalian Mutu Produk Ebi Furay PT. Bogatama Marinusa*.
- Junais, I., Nurdin, B., dan Rindam, L. 2011. *Kajian Strategi Pengawasan dan Pengendalian Mutu Produk Ebi Furay PT Bogatama Marinusa. A Study on the Strategy of Quality Supervision and Control of Ebi Furay Productat PT. Bogatama Marinusa*.

- Karim, M.Y. 2005. Kinerja Pertumbuhan Kepiting Bakau Betina (*Scylla serrata* Forsskal) pada Berbagai Salinitas Media dan Evaluasinya pada Salinitas Optimum dengan Kadar Protein Pakan Berbeda. Disertasi. Institut Pertanian Bogor, Bogor. 50 hal.
- Koswara, S. 2009. HACCP dan Penerapannya pada Produk Bakteri. Ebook Pangan.
- Liu, D., Zeng, R.J., and Angelidaki, I. 2008. Effects of pH and Hydraulic Retention Time on Hydrogen Production Versus Methanogenesis During Anaerobic Fermentation of Organic Household Solid Waste Under Extreme-Thermophilic Temperature (70°C). *Biotechnology and Bioengineering*. Accepted.
- Madigan, M.T. dan Martinko, J.M. 2009. Brock; Biology Of Microorganism. 8th edition. Pearson Prentice Hall, USA.
- McCulloch, J.E. 2000. Infection Control: Science, Management and Practice. London: Whurr Publishers.
- Mukono, J.H. 2000. Prinsip Dasar Kesehatan Lingkungan. Universitas Airlangga. cetakan-1. Surabaya.
- Murniyati, A.S. dan Sunarman. 2004. Pendinginan Pembekuan dan Pengawetan Ikan. Kanisius. Jakarta 97: 13-17.
- Murwantoko. 2006. Metode Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) dan Aplikasinya untuk Deteksi Penyakit Ikan. Fakultas Pertanian UGM. Yogyakarta.
- Nelson, D.L. and Michael M.C. 2004. Lehninger: Principles Of Biochemistry. 4th edition. Worth Publishers. Inc, New York.
- Newell, D.G. 2010. Food-Borne Disease the Challenge of 250 Years Ago Still Persist while New Ones Continue to Emerge. *Veterinary Laboratories Agency, New Haw, UK*.
- Nidom, C.A. dan G.C. de Vries. 2007. Isolasi DNA Prokariotik Untuk Amplifikasi Genom dengan Polymerase Chain Reaction. Workshop Aplikasi PCR di Bidang Kesehatan dan Kedokteran. FKH Unair. Surabaya
- 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.

- Oranusihe, *et al.* 2012. Investigation on the Microbial Profile of Canned Foods. Department of Microbiology Federal University of Technology Owerri, Imo State. Nigeria.
- Pasteur, N.G., Pasteur., F. Bonhomme., J. Catalan., J. Britton. and Davidian. 1988. *Practical Isozyme Genetics*. Laboratory of Ecological Ge-netics, University of Montpellier 2. France: 54 pp.
- Peck, M.W. 2009. Biology and Genomic Analysis of *Clostridium botulinum*, *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, pp. 183e265, 320.
- Pratiwi, R. 2001. Mengenal Metode Elektroforesis. *Oceanologi-LIPI*, Volume XXVI, Nomor 1. Jakarta.
- Rantam, F.A. 2007. Dasar-dasar Polymerase Chain Reaction. Workshop Aplikasi PCR di Bidang Kesehatan dan Kedokteran. FKH Unair. Surabaya.
- Rinto, Arafah, E., dan Utama, SB. 2009. Kajian Keamanan Pangan (Formalin, Garam dan Mikroba) pada Ikan Sepat Asin Produksi Indralaya.
- Ryan, K.J. 2004. Ray GG Editor. *Sherris Medical Mycrobiology*. 4th Ed. Mc Graw Hill.
- Suwarno. 2005. Karakterisasi Molekuler Protein Serta Gen Penyandi Nucleoprotein dan Glycoprotein Virus Rabies dari beberapa daerah Geografik di Indonesia. Disertasi. Program Doktor Ilmu Kedokteran. Program Pasca Sarjana. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Syarifiyah, L. 2003. Karakterisasi Enzim  $\alpha$ -Amilase Ekstraseluler *Clostridium sp* Galur DM 7-2. Skripsi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Tansuphasiri, U. 2001. Development of Duplex PCR Assay for Rapid Detection of Enterotoxigenic Isolates of *Clostridium perfringens*. Vol 32 No 1. Mahidol University, Bangkok.
- Taormina, P.J. and Dorsa, W.J. Growth potential of *C. perfringens* during cooling of cooked meats. *J. Food Protect.* 2004; 67(7): 11537-1547.
- Taylor, R.H., Dunn, M.L., Ogden, L.V., Jefferies, L.K., Eggett, D.L., and Steele, F.M. 2013. Conditions associated with *Clostridium sporogenes* growth as a surrogate for *Clostridium botulinum* in nonthermally processed canned butter. *J. Dairy Sci.* 96, 2754e2764.
- William, C., Frazier, D., and Westhoff, O. 2006. Food borne illness bacterial. In *Food Microbiology* 4th edition New York. pp 401-431.



- World Health Organization (WHO). 2002. Botulism. Fact Sheet Number 270. Revised 2002. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs270/en/index.html>.
- World Health Organization (WHO). 2011a. Food Safety. Retrieved June 26, 2011, from [http://www.who.int/foodsafety/foodborne\\_disease/ferg1/en/index.html](http://www.who.int/foodsafety/foodborne_disease/ferg1/en/index.html).
- World Health Organization (WHO). 2011b. Initiative to Estimate the Global Burden of Foodborne Disease: Information and Publications. Retrieved June 26, 2011, from [http://www.who.int/foodsafety/foodborne\\_disease/ferg1/en/index7.html](http://www.who.int/foodsafety/foodborne_disease/ferg1/en/index7.html).
- Wulandari, D.A., Indah W.A., dan Akhmad, F. 2009. Kualitas Mutu Bahan Mentah Dan Produk Akhir Pada Unit Pengalengan Ikan Sardine Di PT Karya Manunggal Prima Sukses Muncar Banyuwangi. *Jurnal Kelautan* Volume 2, No. 1. Universitas Trunojoyo.
- Yusuf, Z.K. 2010. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Saintek Vol. 5, No. 6. Universitas Negeri Gorontalo.
- Yuwono, T. 2006. Teori dan Aplikasi *Polymerase Chain Reaction*. Penerbit Andi. Yogyakarta.
- Zhang, Y., Alexander, G-H., and Nigel P.M. 2015. A Universal Mariner Transposon System for Forward Genetic Studies in the Genus *Clostridium*. *Plos One* | DOI:10.1371/journal.pone.0122411.

## LAMPIRAN

## **Lampiran 1. Pemeriksaan Mikroskopis dengan Pewarnaan Gram**

Alat dan bahan yang digunakan:

- Gelas obyek
- Ose
- Pembakar bunsen
- Kultur bakteri
- Alkohol
- Lugol
- Kristal violet
- Safranin
- Minyak emersi

Cara Kerja :

1. Koloni bakteri diambil dengan ose, dibuat sediaan oles, kemudian di fiksasi di atas api sampai kering.
2. Meneteskan larutan kristal violet, lalu didiamkan selama 1 menit.
3. Di bilas dengan air kran selama beberapa detik, lalu di angin-anginkan.
4. Meneteskan larutan iodine, lalu didiamkan selama 1 menit.
5. Di bilas lagi dengan air kran selama beberapa detik, lalu diangin-anginkan.
6. Di bilas dengan alkohol selama 30 detik, kemudian di angin-anginkan.
7. Di bilas kembali dengan air kran selama 2 detik.
8. Meneteskan larutan safranin, lalu didiamkan selama 10 detik.
9. Di bilas lagi dengan air kran selama beberapa detik, lalu diangin-anginkan.
10. Kemudian di amati dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000x menggunakan minyak emersi.

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

Alat dan bahan yang digunakan :

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

Cara Kerja :

1. Koloni bakteri diambil menggunakan ose dan dimasukkan ke dalam 5 ml aquades, kemudian diaduk hingga homogen.
2. Membuka plastik perekat pada Oxoid Microbact™ Kit.
3. Mengambil larutan yang sudah berisi bakteri tadi menggunakan pipet.
4. Meneteskan larutan bakteri tersebut ke dalam *well* atau sumur Oxoid Microbact™ Kit sebanyak 4 tetes pada masing-masing *well*.
5. Menutup kembali plastik perekat pada *well* Oxoid Microbact™ Kit untuk dilakukan inkubasi.
6. Melakukan inkubasi Oxoid Microbact™ Kit pada suhu ruangan selama 2-3 hari.
7. Mengamati perubahan warna yang terjadi dan hasilnya dicocokkan dengan tabel reaksi pada petunjuk teknis Oxoid Microbact™ Kit.

**Lampiran 3. Prosedur Ekstraksi DNA**

1. Mengambil 20  $\mu$ l QIAGEN *Protease (proteinase K)* kedalam 1,5 mikrosentifuge tube menggunakan pipet.
2. Menambahkan 180  $\mu$ l *buffer* ATL kedalam tube.
3. Dengan ose diambil sedikit koloni bakteri, kemudian dimasukkan dalam tube 1,5 ml.
4. Di vortex selama 15 detik dan *spin down*.
5. Dilakukan inkubasi pada suhu 56°C selama 1 x 24 jam.
6. Menambahkan 200  $\mu$ l buffer AL kedalam sampel, kemudian di vortex lagi selama 15 detik.
7. Menambahkan 200  $\mu$ l ethanol 96%, lalu di vortex lagi selama 15 detik agar tercampur rata, kemudian *spin down* lagi.
8. Campuran step ke-5 tadi dimasukkan kedalam QIAamp Mini spin column (2 ml collection tube).
9. Dilakukan sentrifuge 8000 rpm selama 1 menit.
10. 2 ml collection tube yang berisi filtrat tadi dibuang dan diganti dengan 2 ml collection tube yang baru.
11. Menambahkan 500  $\mu$ l buffer AW1, lalu disentrifuge lagi 8000 rpm selama 1 menit.
12. 2 ml collection tube yang berisi filtrat tadi dibuang dan diganti dengan 2 ml collection tube yang baru.
13. Menambahkan 500  $\mu$ l buffer AW2, lalu disentrifuge 13.000 rpm selama 3 menit.
14. 2 ml collection tube yang berisi filtrat tadi dibuang kembali dan diganti dengan 2 ml collection tube yang baru.

15. Dilakukan sentrifuge lagi 13.000 rpm selama 1 menit.
16. Memindahkan QIAamp Mini spin column pada 1,5 ml mikrosentrifuge tube.  
Lalu ditambahkan 50  $\mu$ l buffer AE atau *distilled water*.
17. Dilakukan inkubasi pada suhu ruang (15 – 25°C) selama 1 menit, kemudian disentrifuge 8000 rpm selama 1 menit.
18. Didapatkanlah 50  $\mu$ l *DNA template*.

**Lampiran 4 :** Foto kultur *Clostridium* sp dari sampel produk daging kepiting olahan dalam kaleng pada media *Nutrient Agar*



## Lampiran 5. Letak Posisi Primer *Clostridium sporogenes*

### 1. Posisi Primer Forward *Clostridium sporogenes*

```

-----TTGGGATTTGGGGATAACA-----
primer
---- 20
Clos.sporogenes
GGTAAAATAGTTTCATATAATTGGGATTTGGGGATAACACTACTAGTTCTGAAAAAAC 3000
*****

primer
-----
Clos.sporogenes
TCTTTTCATATTTATAAAGATCCTGGTACTTACATAGTAAAACCTACAGTTACAGATGAT 3060

primer
-----
Clos.sporogenes
AAAGGTTTAAAAACCGAAAAAGCTTCATCTATAACTATAAATAAAGTTCTTAAAGGAAAT 3120

primer
-----
Clos.sporogenes
GTAGTATCAGAAAAAGAAGATAACAATGATTTTACAACCTGCTAACCCAGTTTATTATAAG 3180

```

### 2. Posisi Primer Reverse *Clostridium sporogenes*

```

-----
primer
----
Clos.sporogenes
AATTGGCTTTTATTTAGCGACGAAGATAAATCAAACCTACATGGCCTTTCCAAATAAAGAA 3360

primer
-----
Clos.sporogenes
CTAGGAAATCAACTTTCTAATACTGTAAAAATAAATAAACCTGGTAAATACTATTTAGTA 3420

Kutip
-----
primer
----
Clos.sporogenes
ATTTATAAACCCCTTGGAGAAAAAGTAGACTATAAATTTAGCATAGAAGGAGCTATATTA 3480

primer
-----CAAGACGACAACGATACGGA-----
---- 20
Clos.sporogenes
TCATCTTCACAAGACGACAACGATACGGATACTAACCCCTAATAAAGATAAACTAGTTATA 3540
*****

```