

DEPARTEMEN PERTANIAN
BADAN KARANTINA PERTANIAN

Gedung E Lt. 1, 5, 7
Kanpus Deptan
Jl. Harsono RM. No. 3 Ragunan
Jakarta Selatan 12550

Telp./Fax. : (021) 7816484, 7816483
7816482, 7816481
Website : <http://karantina.deptan.go.id>
Email : infokarantina@deptan.go.id

KEPUTUSAN KEPALA BADAN KARANTINA PERTANIAN
NOMOR : 374/Kpts/KH.210/L/5/2010

TENTANG
PETUNJUK TEKNIS PENANGANAN DAN PEMERIKSAAN
SARANG BURUNG WALET DAN SRITI

DENGAN RAHMAT TUHAN YANG MAHA ESA

KEPALA BADAN KARANTINA PERTANIAN,

- Menimbang** : 1. bahwa sarang burung merupakan salah satu komoditas karantina pertanian yang menjadi andalan ekspor Indonesia;
2. bahwa untuk menjamin keamanan dan kesehatan sarang burung yang diperdagangkan maka perlu adanya pelaksanaan tindakan karantina terhadap sarang burung yang dilalulintaskan untuk menjamin kualitas dan keamanan bagi kesehatan konsumen;
3. bahwa penyakit hewan dan uji-uji diagnostik saat ini berkembang sangat cepat seiring dengan perkembangan zaman, sehingga diperlukan penyempurnaan terhadap Petunjuk Teknis Operasional Tindak Karantina Hewan untuk Sarang Burung Walet yang telah ditetapkan melalui Surat Keputusan Kepala Pusat Karantina Pertanian Nomor 197.a/ Kpts.Okp-240/C/IX/1999;
4. bahwa berhubungan dengan hal-hal tersebut diatas, maka dipandang perlu untuk penyempurnaan Petunjuk Teknis Penanganan dan Pemeriksaan Sarang Burung Walet dan Sriti.
- Mengingat** : 1. Undang-Undang Nomor 16 tahun 1992 tentang Karantina Hewan, Ikan dan Tumbuhan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1992 Nomor 56, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3482);
2. Undang-Undang Nomor 18 tahun 2009 tentang Peternakan dan Kesehatan Hewan;
3. Undang-Undang Nomor 7 Tahun 1996 tentang Pangan (Lembaran Negara Tahun 1996 Nomor 99, Tambahan Lembaran Negara Nomor 3656);
4. Peraturan Pemerintah Nomor 22 Tahun 1983 tentang Kesehatan Masyarakat Veteriner (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1983 Nomor 28, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3253);

5. Peraturan Pemerintah Nomor 82 tahun 2000 tentang Karantina Hewan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2000 Nomor 161, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3482);
6. Peraturan Presiden Nomor 9 Tahun 2005 tentang Kedudukan, Tugas, Fungsi, Susunan Organisasi dan Tata Kerja Kementerian Negara Republik Indonesia;
7. Peraturan Presiden Nomor 10 Tahun 2005 tentang Unit Organisasi dan Tugas Eselon I Kementerian Negara Republik Indonesia;
8. Keputusan Menteri Kehutanan dan Perkebunan Nomor: 449/Kpts-II/1999 tentang Pengelolaan Burung Walet (*Collocalia*) di Habitat Alami (In-Situ) dan Habitat Buatan (Ex-Situ)
9. Keputusan Menteri Kehutanan dan Perkebunan Nomor: 100/Kpts-II/2003 tentang Pedoman Pemanfaatan Burung Walet (*Collocalia* spp).

MEMUTUSKAN

Menetapkan :

- KESATU : PETUNJUK TEKNIS PENANGANAN DAN PEMERIKSAAN SARANG BURUNG WALET DAN SRITI SEBAGAIMANA TERSEBUT DALAM LAMPIRAN SURAT KEPUTUSAN INI;
- KEDUA : Petunjuk Teknis sebagaimana dimaksud dalam diktum KESATU; merupakan pedoman bagi petugas karantina hewan dalam melakukan penanganan dan pemeriksaan terhadap sarang burung walet dan sriti;
- KETIGA : Petunjuk Teknis yang telah ada dan sepanjang tidak bertentangan dengan keputusan ini masih tetap berlaku;
- KEEMPAT : Keputusan ini agar dilaksanakan sebaik-baiknya dengan penuh tanggungjawab.

Ditetapkan di : Jakarta

Pada tanggal :



Tembusan disampaikan kepada Yth,

1. Menteri Pertanian;
2. Para Pejabat Eselon I Departemen Pertanian;
3. Para Pejabat Eselon II Badan Karantina Pertanian;
4. Para Kepala Balai Besar/Balai/Stasiun Karantina Pertanian di seluruh Indonesia.

LAMPIRAN : KEPUTUSAN KEPALA BADAN KARANTINA PERTANIAN

NOMOR :

TANGGAL :

TENTANG : PETUNJUK TEKNIS PENANGANAN DAN PEMERIKSAAN SARANG BURUNG WALET DAN SRITI

BAB I PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Indonesia telah dikarunia berbagai sumber daya alam hayati yang beraneka ragam, khususnya hewan, bahan asal hewan yang merupakan modal dasar dalam pembangunan yang harus dijaga dan dilindungi.

Sarang burung walet merupakan komoditas ekspor yang diandalkan oleh Indonesia sebagai penghasil devisa non migas. Indonesia dikenal sebagai salah satu negara penghasil sarang burung walet. Di tingkat perdagangan dunia, Indonesia menjadi pemasok terbesar kebutuhan pasar dunia, yakni sekitar 80%.

Pada era perdagangan bebas, tantangan bagi Indonesia adalah kemampuan menghasilkan produk pangan yang berkualitas dan aman bagi kesehatan konsumen. Aspek kesehatan suatu produk pangan tidak mengandung penyakit yang dapat menular ke hewan maupun manusia, selain itu bebas dari kontaminasi baik oleh cemaran mikroba, residu obat, residu hormon, maupun residu logam berat.

Badan Karantina Pertanian sesuai tupoksinya mempunyai peranan yang sangat strategis dalam upaya mencegah masuk dan menyebarnya HPHK serta bahan berbahaya lainnya ke dalam/antar wilayah Negara Republik Indonesia.

Untuk menjamin keamanan sarang burung walet dan sriti yang diperdagangkan, maka Pusat Karantina Hewan memandang perlu disusun petunjuk teknis penanganan dan pemeriksaan sarang burung walet dan sriti, untuk digunakan sebagai pedoman bagi petugas dan pengguna jasa serta pihak lain yang terkait.

2. Maksud dan Tujuan

- a. Petunjuk Pelaksanaan (Juknis) ini disusun dengan maksud menyediakan pedoman bagi petugas karantina di lapangan dalam melaksanakan tindakan karantina terhadap sarang burung walet dan sriti dalam rangka utk mencegah masuk dan tersebarnya HPHK.
- b. Acuan petugas karantina dalam melakukan pengawasan keamanan pangan terhadap sarang burung walet dan sriti khususnya dari cemaran mikrobiologi.
- c. Adanya keseragaman dalam pelaksanaan pelayanan tindakan karantina terhadap sarang burung walet dan sriti
- d. Petugas dapat melaksanakan pelayanan tindak karantina secara lebih cermat, cepat dan sistematis, dengan dasar ilmiah sesuai peraturan perundangan.

3. Ruang Lingkup

- a. Identifikasi dan kualitas sarang burung walet
- b. Penanganan dan pemeriksaan sarang burung walet dan sriti.
- c. Pemeriksaan dan Pengujian Laboratorium

4. Definisi

- a. Media pembawa yang dimaksud dalam petunjuk teknis ini adalah sarang burung walet
- b. Hama dan penyakit hewan karantina yang selanjutnya disebut **hama penyakit hewan karantina** adalah semua hama, agen penyakit, dan penyakit hewan yang berdampak sosio-ekonomi nasional dan perdagangan internasional serta dapat menyebabkan gangguan terhadap kesehatan masyarakat dan lingkungan yang dapat digolongkan menurut tingkat risikonya.
- c. Sarang burung walet adalah hasil burung walet yang sebagian besar berasal dari air liur yang berfungsi sebagai tempat untuk bersarang, bertelur, menetas dan membesarkan anak burung walet.
- d. Burung walet adalah seluruh jenis burung layang-layang yang termasuk dalam marga *Collacalia* yang tidak dilindungi undang-undang
- e. Kemasan adalah bahan yang digunakan untuk mewadahi dan atau membungkus media pembawa baik yang bersentuhan langsung maupun tidak.
- f. Wadah adalah kemasan yang langsung berhubungan dengan media pembawa.
- g. Tindakan karantina hewan yang selanjutnya disebut **tindakan karantina** adalah kegiatan yang dilakukan untuk mencegah hama penyakit hewan karantina masuk ke, tersebar di, dan atau keluar dari wilayah negara Republik Indonesia, atau suatu area dalam wilayah Republik Indonesia.
- h. **Penyakit eksotik** adalah penyakit hewan yang tidak ada di Indonesia.

BAB II

IDENTIFIKASI SARANG BURUNG WALET DAN SRITI

Jenis Sarang Burung

Sarang burung walet yang dihasilkan oleh burung walet sangat beragam tergantung pada jenis burung walet, bentuk, ukuran dan warna. Hanya 4 jenis walet yang sarangnya bisa dikonsumsi dan laku dijual yaitu:

1. Sarang Putih (Edible-nest Swiftlet, Yen-ou)

Sarang burung walet putih dihasilkan oleh walet *Aerodramus fushipagus*, berasal dari gua dan rumah (gedung). Sarang burung walet putih mempunyai ciri khas, yaitu berwarna putih kekuningan, tebal dan bulu menempel. Sarang yang berasal dari gua berwarna suram atau kotor, sedangkan sarang yang berasal dari rumah atau gedung berwarna cerah dan bersih. Sarang burung walet putih mencari yaitu bentuk seperti mangkuk dibelah, berwarna putih, bening, kristal, utuh, tidak retak ataupun cacat, bersih dari bulu dan kotoran lipas atau kepinding. Ukuran sarang burung walet adalah 6-10 cm, tinggi mangkukan \pm 4-5 cm.



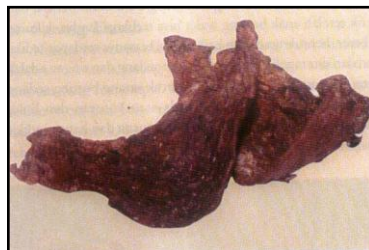
Sarang walet putih budidaya



Sarang burung walet putih gua

2. Sarang Hitam (Black-nest Swiftlet, Mo-yen)

Sarang burung walet hitam dihasilkan oleh burung walet jenis *Aerodramus maximus*. Burung walet jenis ini membentuk sarang dari bulu-bulu yang direkatkan dengan air liurnya dan ditempelkan di dinding-dinding gua batu kapur. Sarang terlihat berwarna hitam karena terbuat dari air liur yang bercampur dengan bulu-bulu tubuhnya. Warna hitam tersebut masuk sampai ke lapisan yang paling dalam dari sarang burung. Sarang burung walet hitam tidak sebaik sarang putih, dan harganya pun tidak semahal sarang burung walet putih. Ciri sarang burung walet hitam adalah liur yang melapisi bahan sarang terlihat hitam (pada kaki, dinding dan dasar sarang), ukuran lebar sarang burung walet hitam 5-7 cm



Sarang burung walet hitam

3. Sarang Rumput (White bellied swiftlet)

Sarang burung walet rumput dihasilkan walet *Collocalia esculanta*, *Aerodramus fuciphagus* atau *maximus*. Pada umumnya, sarang burung walet tersebut berwarna kehijauan, karena air liur bercampur dengan lumut, rumput kering, daun pinus, dan cemara. Sarang burung walet tersebut berasal dari gua maupun gedung.



Sarang burung walet rumput (*Collocalia esculenta*)

4. Sarang sriti Lumut (Chao yen, mostnest swiftlet)

Sarang burung sriti lumut dihasilkan oleh walet *Collocalia vanikorensis* yang berasal dari campuran air liur dan lumut. Tiap sarang mengandung 2 – 3 gram liur. Sarang yang baru berwarna hijau, sarang telah lama berwarna cokelat kehitaman dan kering.



Sarang burung sriti lumut

5. Sarang merah (Red nest, Siek Yen)

Sarang burung walet merah dihasilkan oleh burung walet *Aerodramus fuciphagus*. Sarang tersebut adalah jenis sarang yang relatif jarang ditemukan dan harganya lebih mahal jika dibandingkan dengan sarang burung walet jenis lainnya. Sarang burung tersebut diproduksi pada musim penghujan yang berasal dari rumah walet dengan kelembaban udara yang sangat tinggi. Sarang burung walet merah berkualitas adalah sarang dengan warna merah, dan tidak dijumpai noda atau kotoran yang menempel. Sarang burung walet merah berdiameter \pm 9 cm dan bobot sarang mencapai 9 g.



Sarang burung walet merah (*red nest*)

Kualitas Sarang Burung

Sarang yang dihasilkan oleh burung walet adalah sangat beragam tentang warna, bentuk, ukuran, kebersihan, dan struktur rajutan sehingga kualitas sarang burung walet beragam. Kualitas sarang burung walet dipengaruhi oleh musim, cara pemetikan, gangguan hama, dan lingkungan. Kualitas sarang burung walet digolongkan menjadi kualitas sarang hancuran, kualitas sarang pecah, kualitas bulu biasa, kualitas bulu ringan, kualitas perak dan kualitas sarang merah.

Kualitas sarang hancuran

Kualitas sarang hancuran termasuk tingkatan paling rendah karena bentuk sarang tidak seragam dan berukuran kecil yang terdiri dari potongan, hancuran atau sisa-sisa sarang burung. Sarang kualitas hancuran merupakan kumpulan dari sarang-sarang yang rusak, pecahan-pecahan sarang.

Kualitas sarang pecah

Kualitas sarang pecah merupakan kualitas sarang burung mutu rendah akibat cara pengambilan yang salah atau akibat penggunaan alat panen yang salah. Hasilnya, sarang burung berbentuk tidak beraturan, rusak, hancur, dan banyak yang pecah. Pada umumnya, jenis sarang tersebut didapat pada panen rampasan, yaitu pemetikan sarang burung, yang dilakukan sebelum burung walet bertelur atau sedang bertelur.

Kualitas bulu biasa

Sarang burung kualitas bulu biasa termasuk kualitas jelek karena pada sarang burung tersebut terdapat bulu, dan tercemar kotoran.

Kualitas bulu ringan

Sarang burung yang berkualitas bulu ringan merupakan sarang yang memiliki bentuk dan ketebalan cukup memadai, tetapi tercemar bulu-bulu yang rontok. Sarang tersebut diambil pada saat burung walet rontok bulu atau sarang burung tersebut dibuat oleh burung walet bersangkutan pada saat rontok bulu.

Kualitas perak

Kualitas sarang perak (kualitas balkon) dikenal juga sebagai kualitas sarang putih yang merupakan kualitas terbaik dan berwarna putih bersih, tidak tercemar oleh kotoran hewan ataupun bulu-bulu. Ukuran sarang burung tersebut adalah besar dengan jumlah sarang \pm 110-140 sarang/ kg. Kualitas sarang putih tersebut terbentuk karena sarang burung dipanen pada saat buang telur sehingga bentuknya sempurna. Bobot sarang burung dengan kualitas perak adalah 8 g/sarang dengan diameter 10 cm.

Kualitas sarang merah

Kualitas sarang merah dikenal sebagai kualitas yang mempunyai mutu setara dengan kualitas perak, tetapi berwarna kemerah-merahan. Sarang berdiameter 10 cm dan merupakan hasil panen pada saat buang telur. Dalam satu kilogram terdapat \pm 100-130

sarang. Walaupun mutu sarang dengan kualitas sarang merah adalah sama dengan sarang kualitas perak, namun karena berwarna merah, maka sarang tersebut berharga lebih mahal daripada sarang perak.

BAB III

PENANGANAN TERHADAP SARANG BURUNG WALET DAN SRITI

PENGAMBILAN SAMPEL:

- **Untuk pemeriksaan HPHK**

Sarang burung walet dan sriti yang akan diambil sampelnya harus dilaksanakan dengan seaseptik mungkin untuk menghindari kontaminasi pada saat pengambilan sampel.

Pada umumnya produk sarang burung walet dan sriti merupakan produk yang telah terkemas, maka cara pengambilan sampel terhadap sarang burung walet dan sriti untuk tujuan pemeriksaan hama penyakit hewan karantina adalah sebagai berikut:

1. Prosedur pengambilan Sampel
 - a. Tentukan tujuan pengambilan sampel apakah untuk inspeksi atau untuk pengujian.
 - b. Rancangan pengambilan sampel yang dapat digunakan adalah berdasarkan AQL 6,5 dari Codex (FAO/WHO *Codex Alimentarius Sampling Plans for prepackaged Foods*).
 - c. Data yang diperlukan adalah: ukuran wadah terkecil; *inspection level*, *lot size* (jumlah lot) atau N; jumlah sampel yang diperlukan; kriteria jumlah unit sampel cacat atau yang tidak sesuai standar dan parameter atau persyaratan lainnya.
2. Langkah-langkah pengambilan sampel
 - a. Tentukan level inspeksi yang cocok, dalam hal ini *Inspection Level I* untuk pengambilan sampel normal dan *Inspection Level II* untuk adanya perselisihan (*disputes*), keadaan memaksa atau keperluan untuk mengestimasi lot dengan lebih baik;
 - b. Tentukan ukuran Lot (N) yang merupakan jumlah wadah primer atau unit sampel;
 - c. Tentukan jumlah unit sampel (n) dari lot yang diinspeksi. Gunakan tabel *sampling plan 1* atau *sampling plan 2* (tergantung *inspection level* yang digunakan). Gunakan data *inspection lot* (I atau II), ukuran wadah dari unit sampel dan jumlah lot (N) untuk menentukan n (terlampir).
 - d. Tarik sejumlah unit sampel yang diperlukan dari lot secara acak (gunakan tabel bilangan acak dan penandaan yang diperlukan).
 - e. Periksa unit-unit tersebut sesuai dengan yang distandarkan (misalnya Standar codex atau SNI).
 - f. Berdasarkan tabel 3 dan 4 *sampling plan 1* atau 2, tentukan apakah lot diterima atau tidak diterima.

Tabel 1 Daftar Pengambilan Sampel Pengujian (AQL 6,5) *Inspectoin Level I*
 Daftar tingkat pemeriksaan I (*Inspectoin Level*)

Berat bersih kemasan setara atau kurang dari 1 Kg (2,2 lb)		
Besarnya Lot (N)	Besarnya sampel pengujian (n)	Jumlah kerusakan/tidak memenuhi standar yang diperbolehkan (c)
4.800 atau kurang	6	1
4.801 – 24.000	13	2
24.001 – 48.000	21	3
48.001 – 84.000	29	4
84.001 – 144.000	38	5
144.001 – 240.000	48	6
lebih dari 240.000	60	7
Berat bersih kemasan lebih dari 1 kg (2,2lb) tetapi kurang dari 4,5kg (10lb)		
atau kurang	6	1
– 15.000	13	2
15.001 – 24.000	21	3
24.001 – 42.000	29	4
42.001 – 72.000	38	5
72.001 – 120.000	48	6
lebih dari 120.000	60	7
Berat bersih kemasan lebih dari 4.5 Kg (10 lb)		
600 atau kurang	6	1
601 – 2.000	13	2
2.001 – 7.200	21	3
7.201 – 15.000	29	4
15.001 – 24.000	38	6
24.001 – 42.000	48	9
lebih dari 42.000	60	13

Tabel 2 Daftar Pengambilan Sampel Pengujian (AQL 6,5) *Inspectoin Level II*
 Daftar tingkat pemeriksaan II (*Inspectoin Level*)

Berat bersih kemasan setara atau kurang dari 1 Kg (2,2 lb)		
Besarnya Lot (N)	Besarnya Sampel pengujian (n)	Jumlah kerusakan/tidak memenuhi standar yang diperbolehkan (c)
4800 atau kurang	13	2
4.801 – 24.000	21	3
24.001 – 48.000	29	4
48.001 – 84.000	38	5
84.001 – 144.000	48	6
144.001 – 240.000	60	7
lebih dari 240.000	72	8
Berat bersih kemasan lebih dari 1 kg (2,2lb) tetapi kurang dari 4,5kg (10lb)		
atau kurang	13	2
– 15.000	21	3
15.001 – 24.000	29	4
24.001 – 42.000	38	5
42.001 – 72.000	48	6
72.001 – 120.000	60	7
lebih dari 120.000	72	8

Berat bersih kemasan lebih dari 4.5 Kg (10 lb)		
600 atau kurang	13	2
601 – 2.000	21	3
2.001 – 7.200	29	4
7.201 – 15.000	38	5
15.001 – 24.000	48	6
24.001 – 42.000	60	7
lebih dari 42.000	72	8

3. Contoh pengambilan sampel produk terkemas

Suatu lot terdiri dari 1200 kemasan karton, masing-masing terdiri dari 12 buah wadah berisi makanan tertentu dengan berat perwadah 2,5 lb. Diputuskan untuk melakukan sampling dengan inspection level I karena produk tersebut tidak dalam perselisihan (tidak ada klaim) dan dari sejarah produk belum pernah ada penyimpangan mutu (gunakan tabel 1).

- ukuran lot (N) = $1200 \times 12 = 14.400$ unit sampel
- berat wadah unit sampel = 2.5 lb
- Inspection Level = I
- ukuran sampel (n) = 13 (dari tabel sampling plan I)
- Acceptance Number (c) = 2
- keputusan :

Jika tidak terdapat cacat atau sesuai standar kurang atau sama dengan 2 unit sampel dari 13 unit sampel yang terpilih, maka lot dipertimbangkan untuk diterima. Sedangkan jika ada 3 atau lebih wadah atau unit sampel yang cacat atau tidak sesuai standar maka lot tersebut dipertimbangkan untuk ditolak atau gagal untuk memenuhi persyaratan mutu.

- **Untuk pengawasan keamanan pangan dari aspek mikrobiologis**

Pengambilan sampel sarang burung walet dan sriti, perlu diperhatikan aspek kebersihan baik kebersihan alat pengambil maupun titik pengambilan sampel. Hal ini dilakukan agar sampel yang diambil bersih dan terhindar dari kontaminasi mikroba yang dapat mencemari sampel yang akan diambil tersebut.

Dalam pengambilan sampel untuk tujuan analisis mikrobiologi perlu dipertimbangkan dalam perencanaan hal – hal sebagai berikut :

a. Bahaya terhadap kesehatan

Semakin bahaya jenis mikroorganisme yang diduga terdapat di dalam makanan atau semakin kecil jumlah mikroorganisme yang dapat menimbulkan penyakit, maka unit sampel/spesimen yang diambil harus semakin besar dan banyak. Hal ini untuk meningkatkan peluang untuk mendapatkan sampel/spesimen yang positif, sehingga dapat dihindari kemungkinan menyatakan suatu sampel/spesimen aman padahal sebenarnya berbahaya (negatif palsu).

b. Keseragaman

Semakin seragam sampel/spesimen, misalnya makanan cair (susu), pada proses homogenisasi, maka sampel yang diambil dapat lebih kecil. Namun jika suatu sampel tidak atau kurang seragam, maka unit sampel yang diambil harus lebih banyak atau lebih besar.

c. Pengelompokan

Jika di dalam suatu *lot* terdapat pengelompokan yang lebih kecil (*sublot*), misalnya beberapa unit kaleng dimasukkan ke dalam kotak karton, maka unit sampel dapat diambil dari masing-masing subplot untuk mewakili setiap atau sebagian besar *sublot*.

d. Konsistensi dalam produksi

Jika suatu produk selalu memiliki mutu yang baik setelah diuji, maka pengambilan sampel dapat dikurangi jumlahnya atau diperpanjang periodenya karena sudah mempunyai tingkat kepercayaan tinggi.

Klasifikasi kriteria jumlah sampel, penetapan dan penerimaan hasil uji berdasarkan tingkat bahayanya serta kondisi setelah pengambilan sampel dapat dilihat pada Tabel 3

Tabel 3 Klasifikasi kriteria jumlah, penetapan dan penerimaan hasil uji berdasarkan tingkat bahayanya serta kondisi setelah pengambilan sampel

Tingkat Bahaya	Kondisi penanganan, penyimpanan, transportasi dan konsumsi dapat mengakibatkan :		
	Tingkat bahaya menurun (Sistem penerimaan)	Tingkat bahaya Tetap (Sistem penerimaan)	Tingkat bahaya meningkat (Sistem penerimaan)
Tidak berbahaya langsung (kontaminan biasa, mikroba pembusuk, masa simpan pendek)	Kasus 1 (3 Kelas) n=5; c=3	Kasus 2 (3 Kelas) n=5; c=2	Kasus 3 (3 Kelas) n=5; c=1
Bahaya terhadap kesehatan			
Bahaya rendah, tidak langsung (mikroba indikator)	Kasus 4 (3 Kelas) n=5; c=3	Kasus 5 (3 Kelas) n=5; c=2	Kasus 6 (3 Kelas) n=5; c=1
Bahaya sedang, langsung, penyebaran terbatas	Kasus 7 (3 Kelas) n=5; c=2	Kasus 8 (3 Kelas) n=5; c=1	Kasus 9 (3 Kelas) n=10; c=1
Bahaya sedang, langsung, sangat mudah menyebar/cepat	Kasus 10 (2 Kelas) n=5; c=0	Kasus 11 (2 Kelas) n=10; c=0	Kasus 12 (2 Kelas) n=20; c=0
Tingkat bahaya tinggi, langsung	Kasus 13 (2 Kelas) n=15; c=0	Kasus 14 (2 Kelas) n=30; c=0	Kasus 15 (2 Kelas) n=60; c=0

Keterangan : n = jumlah sampel yang diuji.

c = jumlah maksimum sampel yang diperbolehkan menghasilkan hasil uji lebih tinggi dari yang ditetapkan.

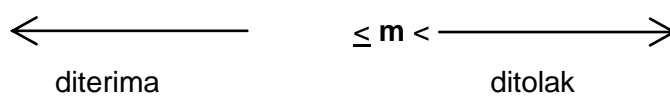
Penetapan Penerimaan Produk untuk pengujian mikrobiologi, perlu ditetapkan prosedur dan kriteria penetapan suatu sampel/spesimen diterima atau tidak diterima/tolak. Dalam penetapan penerimaan produk yang perlu diperhatikan adalah "n" yaitu jumlah unit sampel yang diuji dan "c" yaitu jumlah maksimum unit sampel yang diperbolehkan

menghasilkan uji lebih tinggi atau melebihi dari "m". Dalam penetapan ini dikenal dua sistem yaitu :

a. Sistem Dua Kelas (*Two-class plan*)

Pemeriksaan dengan sistem dua kelas diklasifikasikan diterima atau ditolak (jika jumlah mikroorganismenya melebihi yang disyaratkan). Sisten dua kelas digunakan untuk pemeriksaan mikroorganisme yang sangat berbahaya atau cukup berbahaya secara langsung terhadap kesehatan dan berpotensi untuk menyebar secara luas di dalam produk. Misalnya bakteri patogen *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*.

Dalam sistem dua kelas ditentukan suatu batas **m** sebagai berikut:



dimana **m** dapat merupakan hasil uji kualitatif (positif/negatif) atau batas jumlah uji kuantitatif (misalnya jumlah mikroorganisme). Untuk mikroorganisme yang sangat berbahaya, nilai **m** mungkin sama dengan 0 sel per gram atau per ml.

Sebagai contoh kasus penerimaan atau penolakan suatu sampel dapat dilakukan sebagai berikut:

Dilakukan pengujian terhadap kandungan Salmonella di dalam daging beku. Jumlah maksimum Salmonella yang diperkenankan adalah negatif dalam 25 gram sampel.

Dari tabel 7 Salmonella dalam daging termasuk kasus 10 (berbahaya untuk kesehatan dan berpotensi untuk menyebar dalam makanan tetapi dapat dikurangi/dihilangkan dengan pemasakan yang sempurna), jadi n=5 dan c=0.

Jika dari hasil pengujian diperoleh 1 (satu) sampel terdeteksi Salmonella sedangkan pada 4 sampel lainnya negatif maka lot tersebut akan ditolak.

b. Sistem Tiga Kelas (*Three-class plan*)

Sistem tiga kelas digunakan untuk pemeriksaan mikroorganisme yang tidak atau rendah risiko bahayanya secara langsung terhadap kesehatan atau cukup berbahaya secara langsung tetapi penyebarannya di dalam produk terbatas. Misalnya mikroorganisme *aerobic*, mikroorganisme *psychrothrop*, bakteri asam laktat, kapang (kecuali mikotoksin), koliform dan *thermotolerant coliform*. Hasil pemeriksaan pada sistem tiga kelas diklasifikasikan diterima dan ditolak (jika jumlah mikroorganisme > M, kualitas baik jika >m dan kualitas marjinal jika antara m dan M). Sistem tiga kelas dipengaruhi juga oleh besarnya **n** dan **c**. Unit sampel yang diambil harus mewakili tiga kelas yang menghasilkan jumlah mikroorganisme **0** sampai **m**, **m** sampai **M**, dan lebih besar dari **M**.

Dalam sistem tiga kelas ditentukan suatu batas **m** dan **M** sebagai berikut:



Sampel pada kondisi *marginally acceptable* berarti tidak diinginkan, tetapi masih dapat diterima jika jumlahnya tidak terlalu banyak (pada batas tertentu) sebagai contoh :

Dilakukan pemeriksaan terhadap kandungan Koliform didalam daging beku. Standar maksimum terbaik (m) adalah 0 CFU/g, tetapi masih diperkenankan (M) sampai 5.0×10^1 CFU/g. Dari tabel 7 Koliform dalam daging beku termasuk kasus 4 (risiko bahaya rendah dan dapat dikurangi melalui proses pemasakan), jadi $n=5$ dan $c=3$. Jika hasil pengujian diperoleh dari kelima sampel hasilnya diantara m dan M, maka lot tersebut ditolak karena batas yang diperbolehkan melebihi standar adalah 3 sampel.

PREPARASI SAMPEL

Preparasi sampel sarang burung walet dan sriti untuk pemeriksaan laboratorium sangat diperlukan apabila dalam pemeriksaan fisik ditemukan adanya kelainan. Sebelum melakukan pemeriksaan untuk pengujian laboratorium maka sampel sarang burung walet yang akan diuji dipreparasi dulu.

- **Untuk pemeriksaan HPHK**

- **Proses pencucian sarang burung walet**

- Sarang burung walet dan sriti direndam dalam aquades selama 30 menit, lalu ditiriskan dan dibersihkan dari kotoran dan bulu dengan pinset. Setelah itu direndam selama 10 menit dalam aquades, ditiriskan dan dicetak dalam bentuk mangkok, selanjutnya dikeringkan hingga kadar air 10 %. Air larutannya dapat juga sebagai sampel.

- Untuk *sarang walet hitam* direndam dalam air bersih selama satu hari, kemudian ditiriskan, kotoran dan bulu dibersihkan dengan pinset, kemudian dikeringkan, lalu direndam dalam larutan H₂O₂ konsentrasi 3% selama 40 jam, selanjutnya dibilas dengan air bersih, dicetak dalam bentuk mangkok, setelah itu dikeringkan dengan kipas angin hingga kadar air 10%.

- **Untuk pengawasan keamanan pangan dari aspek mikrobiologis**

- Sarang burung walet dan sriti baik jenis putih dan hitam direndam dalam aquades selama 30 menit, lalu ditiriskan dan dibersihkan dari kotoran dan bulu dengan pinset. Setelah itu direndam selama 10 menit dalam aquades, ditiriskan dan dicetak dalam bentuk mangkok, selanjutnya dikeringkan hingga kadar air 10 %. Air larutannya dapat juga sebagai sampel. Dalam preparasi sampel dilakukan secara seaseptik mungkin.

PENGIRIMAN SAMPEL

Pengiriman sampel sarang burung walet dan sriti dapat dilakukan sendiri atau menggunakan kendaraan sendiri, dengan memperhatikan keamanan bagi pembawa sampel dan pengiriman dilakukan secepat mungkin. Jika pengiriman dilakukan melalui jasa transportasi maka pengiriman sampel dilakukan setelah pengepakan sampel telah sesuai dengan ketentuan yang telah ditetapkan jasa transportasi seperti IATA dan lain-lainnya.

Sampel yang dikirim harus bersifat komunikatif agar dapat dimengerti oleh petugas penguji di laboratorium, maka sampel perlu diberikan kelengkapan/informasi yang relevan.

Dalam pengiriman harus memperhatikan aspek-aspek sebagai berikut :

1. Sampel wadah sampel harus bersih, kering, tahan pecah, bermulut lebar dan mudah untuk disterilisasi.
2. Sampel harus dikirim ke laboratorium secepat mungkin setelah pengambilan contoh, dan jika mungkin harus sampai ke laboratorium dalam waktu tidak lebih dari 24 jam setelah sampling.
3. Sampel dari produk segar atau produk refrigerasi harus ditransportasikan pada suhu 0 – 4 °C, dan pengujian dilakukan tidak lebih dari 24 jam setelah tiba di laboratorium.
4. Sampel produk dalam kemasan yang sifatnya stabil atau awet harus ditransportasikan terlindung dari sinar matahari secara langsung, atau radiasi panas yang lain, dan sebaiknya diangkut pada suhu tidak melebihi 25 °C, dan pengujian dilakukan paling lama 3 hari setelah produk diterima. Untuk produk yang pecah kemasannya, maka disimpan dalam wadah plastik dan ditempatkan dalam refrigerator bersuhu 0 – 4 °C. Pemeriksaan harus dilakukan secepat mungkin setelah tiba di laboratorium.
5. Sampel dari produk kering harus ditransportasikan dalam wadah yang kedap uap air dan pada suhu tidak lebih dari 25 °C. Sampel ini harus dilindungi dari cahaya matahari langsung dan radiasi panas lainnya.

Sampel yang akan dikirim ke laboratorium penguji harus menerima sampel yang diidentifikasi secara mendetail, pemeriksaan atau pengujian yang diperlukan. Adapun informasi kelengkapan yang diperlukan untuk surat pengiriman atau formulir penyerahan sampel memberikan informasi sebagai berikut :

- Nama dan alamat pengirim
- Original/asal usul sampel
- Bahan pengawet/pembawa atau media transpor sampel
- Uji laboratorium yang diminta/diperlukan
- Jumlah sampel yang diambil
- Sifat-sifat dari sampel yang diambil
- Nomor identifikasi dan setiap kode atau tanda lain pada batch atau lot darimana sampel diambil.
- Sifat-sifat pemeriksaan yang dilakukan.
- Nama dan tanda tangan orang yang melakukan sampling
- Data, waktu dan tempat pengambilan contoh

BAB IV

PENGUJIAN DAN PEMERIKSAAN LABORATORIUM

1. PEMERIKSAAN SALMONELOSIS

Preparasi sampel

Sarang burung walet yang telah dicuci ditimbang sebanyak 25 gram digerus dengan krus porcelain, kemudian dilarutkan dengan larutan pengencer BPW 0,1% sebanyak 225 ml (1 : 10)/dianggap sudah 10^{-1} , dihomogenkan dengan bantuan *stomacher* 15.000 – 20.000 rpm. Selanjutnya dibuat pengenceran dari 10^{-1} menjadi 10^{-2} dengan cara : 1 ml larutan sampel pengenceran 10^{-1} dimasukkan ke dalam 9 ml BPW 0,1%, kemudian dihomogenkan. Dengan cara yang sama dibuat pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} dan 10^{-6} .

Media dan Reagen yang digunakan

Lactose Broth (LB), *Tetrathionate Brilliant Green Broth* (TBGB), *Hektoen Enteric Agar* (HEA) dan *Brilliant Green Agar* (BGA), *Nutrient Agar* (NA), *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), *Urea Agar*, *Lysine Decarboxylase Medium*, *Indol Medium*, *Lysine Decarboxylase*, *Methyl red Voges-Proskauers* (MR-VP), *Salmonella Polyvalent Somatic (O) Antiserum A-S*, *Salmonella Polyvalent Flagellar (H Antiserum Fase 1 dan 2.) Antiserum A-S*, *Salmonella Somatic (O) Monovalent Antisera: Vi*.

Peralatan

Cawan petri, tabung, reaksi, tabung serologi, pipet, botol media, guntung, pinset, jarum inokulasi (ose), *stomacher*, pembakar bunsen, pH meter, timbangan, *magnetic stirrer*, pengocok tabung (*vortex*), inkubator, penangas air, autoklaf, lemari steril (*clean bench*), lemari pendingin (*refrigerator*), *freezer*.

Pengujian Bakteri *Salmonella*

Pengujian bakteri *Salmonella* dilakukan dengan cara penyiapan dan homogenisasi sampel, pra-pengkayaan, pengkayaan, penanaman pada media selektif, penegasan dengan uji biokimiawi dan dilanjutkan dengan uji serologis.

Pra-pengkayaan sampel dilakukan dengan menimbang 25 gram sampel ditambahkan 225 ml *Lactose Broth*, kemudian dihomogenkan dengan *stomacher*. Diinkubasi pada suhu 37 °C selama 16 – 20 jam. Dari biakan pra pengkayaan ini dipipet 10 ml, dimasukkan ke dalam 100 ml *Tetrathionate Brilliant Green Broth*, diinkubasi pada suhu 43 °C selama 24 jam (pengkayaan).

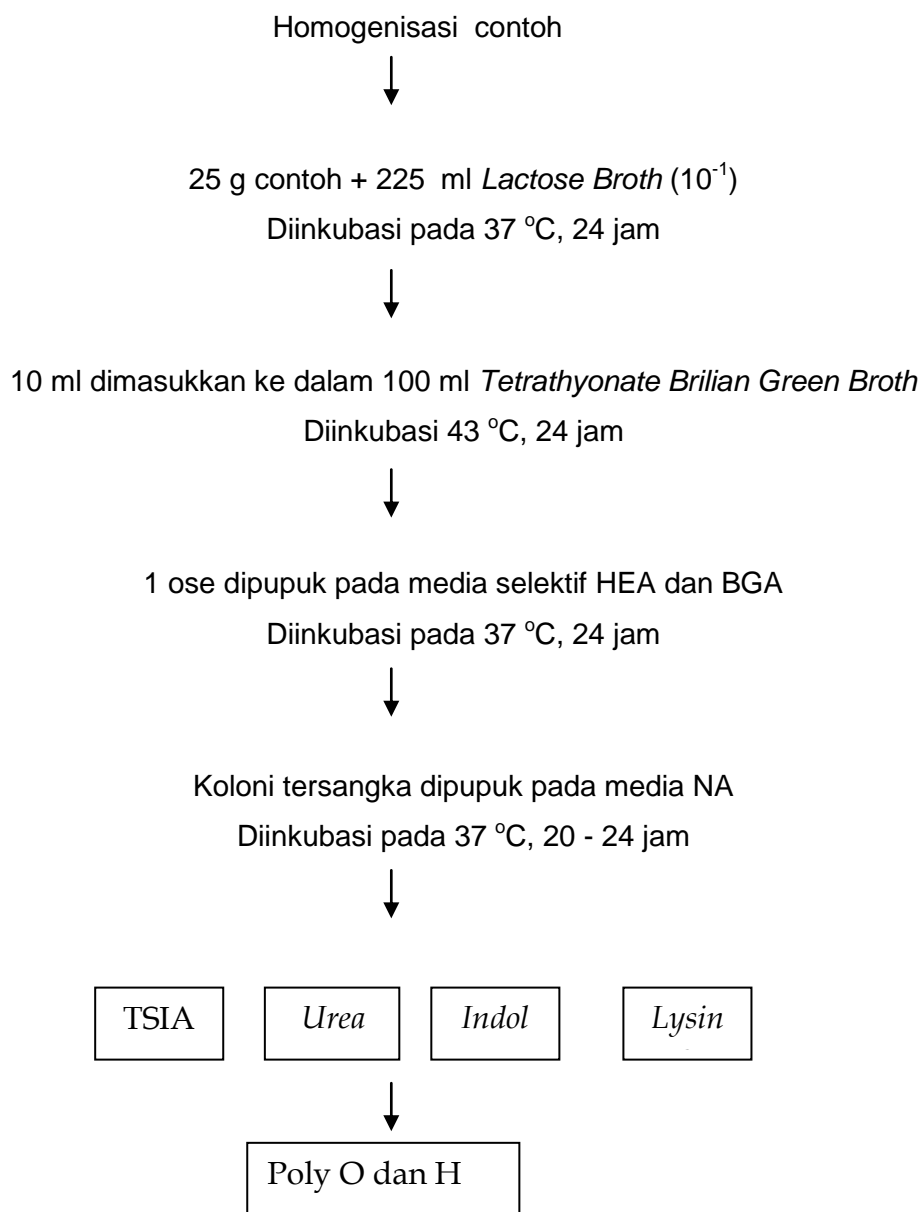
Dari biakan pengkayaan, diambil satu sengkeli kemudian digoreskan pada cawan Petri berisi media selektif *Hektoen Enteric Agar* (HEA) dan *Brilliant Green Agar* (BGA), kemudian diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 24 jam. Koloni tersangka pada media HEA jika koloni berwarna biru hijau dengan atau tanpa bintik hitam di tengah, sedangkan

pada media BGA, jika koloni berwarna merah muda hingga merah atau bening hingga buram dengan lingkaran merah muda sampai merah.

Uji penegasan (uji biokimia) dilakukan dengan terlebih dahulu mengambil koloni tersangka dan digoreskan pada permukaan media *Nutrient Agar* dalam cawan petri dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 – 24 jam. Dari biakan ini diambil satu sengkeli, dipindahkan ke dalam media *Triple Sugar Iron (TSI) Agar*, *Urea Agar*, *Lysine Decarboxylase Medium* dan *Indol Medium*.

Reaksi biokimia *Salmonella* jika pada TSI Agar, bagian tegaknya berwarna kuning dengan atau tanpa warna hitam (H₂S), bagian miring berwarna merah atau tidak berubah. Pada media *Urea Agar*, warna media tidak berubah (reaksi negatif), dan pada *Lysine Decarboxylase* berwarna ungu (reaksi positif). Untuk uji Indol, bereaksi negatif dengan warna jingga.

Uji serologi, jika reaksi biokimia menunjukkan ada *Salmonella*. Satu sengkeli dari biakan TSI Agar diambil dan dioleskan pada gelas sediaan. Kemudian antisera ditetaskan disamping biakan. Dengan menggunakan sengkeli, tetesan antisera dan biakan dicampur, bila terjadi penggumpalan menunjukkan uji positif. Jika reaksi biokimia menunjukkan adanya *Salmonella* dan uji serologi positif, maka *Salmonella* dinyatakan positif.



2. PENGUJIAN AVIAN INFLUENZA

I. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah teknik molekuler yang sensitif untuk mendeteksi gen virus avian influenza. Teknik ini digunakan untuk mendeteksi genom virus avian influenza ketika virus telah kehilangan kemampuan untuk bereplikasi. Penggunaan teknik molekuler yang secara langsung dapat mendeteksi virus dalam cairan alantois yang telah diinfeksi membuat identifikasi dan karakterisasi genetik virus influenza A termasuk avian influenza menjadi cepat dan akurat.

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah teknik yang mempunyai banyak kelebihan dalam mengidentifikasi genom, termasuk dalam hal ini genom virus avian influenza, ketika virus tidak dalam jumlah yang banyak. Genom virus avian influenza adalah *single-strand* RNA, sehingga pada reaksi PCR dibutuhkan sintesa sebuah kopi DNA (cDNA) yang berkomplementari dengan RNA virus. *Reverse Transcriptase (RT)* adalah enzim polimerase yang digunakan untuk mensintesa cDNA. Sehingga reaksinya disebut RT-PCR. Metode RT-PCR sudah banyak digunakan untuk mendiagnosa adanya virus avian influenza, biasanya metode ini akan dilanjutkan dengan sekuensing DNA untuk melihat lebih jauh tentang karakter molekuler virus ini, seperti mutasi virus, hubungan kekerabatan dan untuk rekayasa genetik lainnya

a. Prinsip uji :

Viral RNA (vRNA) diekstraksi dan kemudian cDNA disintesa dengan *Reverse Transcriptase* menghasilkan complementary DNA (cDNA) yang kemudian digunakan sebagai templat untuk PCR, yang akan menghasilkan *complementary double strand* DNA (dsDNA). dsDNA dihasilkan dengan siklus denaturasi, annealing dan ekstensi yang berhasil dengan adanya primer sense dan antisense spesifik dan *thermal stable Taq polymerase*.

b. Alat, Bahan Dan Metode

Pencantuman nama/merek tertentu (alat, bahan, kit) tidak mengikat, karena hanya sebagai contoh. Masing-masing UPT bebas memilih merek yang menurut pengalaman paling cocok sesuai kondisi setempat.

Peralatan

LAF (Laminar Air Flow), Mikropipet 1000 μ l, 200 μ l, dan 10 μ l Aerosol Resistant Tips (ART) 1000 μ l, 200 μ l, dan 10 μ l, Vortex, Mesin Sentrifugasi 4°C (refrigerated centrifuge), PCR sprint, Hybaid, Tabung PCR 0,5 ml, Tabung ependorf 1,5 ml, Horizontal agarose gel electrophoresis apparatus (GC Plus), Well-forming combs (sisir pembentuk sumur), Power supply, Microwave, UV transilluminator, Kamera polaroid, Alat timbang (balance) dan Parafilm

Bahan

- Cairan alantois atau sampel usapan kloaka dalam media transport
- Reagent Trizol-LS
- Kloroform
- Isopropanol
- Etanol 70% + Dietil Pirokarbonat (DEPC)
- Distilled water
- Primer M52C 5'-CTTCTAACCGAGGTCGAAACG-3'
- Primer M253 5'-AGGGCATTGACAAAG/TCGTCTA-3'
- Primer H5-F 5'-ACACATGCYCARGACATACT
- Primer H5-R 5'-CTYTGRTTYAGTGTTGATGT
- Buffer TBE (Tris Borat Acid EDTA)
- Ethidium bromide (10 mg/mL)
- Agarose
- DNA ladder 1000 bp / 1 kb
- Loading dye
- Transpor media berupa *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)
- QIAamp Viral RNA kit (untuk metode isolasi 2)

C. Prosedur Kerja :

I. Isolasi RNA Virus Dengan Trizol

Metode isolasi RNA virus pada praktikum ini adalah dengan menggunakan TRIZOL Reagent (Invitrogen) :

1. Ambil cairan alantois / larutan / supernatan swab kloaka sebanyak 250 ul, masukkan dalam tabung eppendorf 1.5 ml, kemudian tambahkan TRIZOL-LS sebanyak 750 ul
2. Vortek selama 15 detik
3. Inkubasi selama 5 menit pada temperatur ruang
4. Tambahkan kloroform sebanyak 200 ul
5. Vortek selama 15 detik
6. Inkubasi selama 10 menit pada temperatur ruang
7. Putar dengan microcentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm pada temperatur 4°C selama 15 menit
8. Siapkan tabung eppendorf baru
9. Ambil cairan bening bagian atas, jangan sampai cairan pada batas ataupun bawah (berwarna merah) ikut terambil
10. Pindahkan cairan bening (400-500 ul) tersebut ke tabung eppendorf baru
11. Tambahkan isopropanol sebanyak 500 ul
12. Vortek selama 15 detik
13. Inkubasi selama 10-15 menit
14. Putar dengan microcentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm pada temperatur 4°C selama 15 menit
15. Buang seluruh cairan (pada sisi bawah tabung mungkin akan tampak pellet putih RNA), jangan sampai pellet tersebut ikut terbuang

16. Tambahkan ethanol- 70% sebanyak 500 ul
17. Putar dengan microcentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm pada temperatur 4°C selama 15 menit
18. Aspirasi semua ethanol- 70% dengan hati-hati
19. Keringkan pellet yang terbentuk dengan vacuum pump atau biarkan di temperatur ruang selama 15-10 menit
20. Setelah semua sisa cairan dalam tabung kering, resuspensi pellet RNA yang terbentuk dengan 10 ul RNase free water
21. Sususpensi RNA dapat langsung digunakan atau dapat disimpan suspensi RNA pada temperatur -20°C

II. Metode Isolasi RNA Virus Dengan Qiamp Viral RNA Kit

1. Pipet 560 ul AVL ke dalam 1.5 ml tabung centrifuge
2. Tambahkan 140 ul viral culture/original sample
3. Vortex 15 detik
4. Inkubasi pada temperature ruangan selama 10 menit
5. Sentrifugasi sebentar saja (satu menit)
6. Tambahkan 560 ethanol dan vortex selama 15 detik
7. Sentrifugasi sebentar saja (satu menit)
8. Masukkan 630 ul mixture ke dalam QIAamp column
9. Sentrifugasi 8000 rpm selama 1 menit
10. Letakkan kolom ke dalam tabung koleksi yang baru (collection tube)
11. Tambahkan 500 ul buffer AW1 ke dalam kolom
12. Sentrifugasi 8000 rpm selama 1 menit
13. Letakkan kolom ke dalam tabung koleksi yang baru (collection tube)
14. Tambahkan 500 ul buffer AW2 ke dalam kolom
15. Sentrifugasi 8000 rpm selama 3 menit
16. Letakkan kolom ke dalam 1.5 tabung microcentrifuge
17. Tambahkan 60 ul buffer AVE dan inkubasi pada temperature ruang selama 1 menit
18. Sentrifugasi 8000 rpm selama 1 menit
19. Simpan elusi RNA dalam microcentrifuge pada temp -20°C

II. RT-PCR VIRUS AVIAN INFLUENZA

RT-PCR dilakukan dengan menggunakan metode One Step RT-PCR system (Invitrogen) dengan menggunakan primer Matrix dan H5 :

Cara Kerja RT-PCR dengan primer Matrix :

1. Buat campuran pada tabung PCR sebagai berikut :

a. React. Mix	25 ul
b. Primer Matrix Forward (50 pmol/ul)	1 ul
c. Primer Matrix Reverse (50 pmol/ul)	1 ul
d. Template (Suspensi RNA)	10 ul
e. ddH ₂ O	12 ul

f. Taq/RT II	1 ul
TOTAL REAKSI	50 ul

2. Masukkan tabung dalam mesin Thermal Cycler

- a. Program RT-PCR adalah sebagai berikut :
- b. Program RT-PCR adalah sebagai berikut :
 - 42°C ---- 30 menit (Reverse Transcripatase)
 - 95°C ---- 4 menit
 - sebanyak 1 siklus

95°C ---- 1 menit
 45°C ---- 1 menit
 72°C ---- 3 menit
 sebanyak 40 siklus

CARA KERJA RT-PCR dengan primer H5:

1. Buat campuran pada tabung PCR sebagai berikut :

a. React. Mix	25 ul
b. Primer H5 Forward (20 pmol/ul)	2 ul
c. Primer H5 Reverse (20 pmol/ul)	2 ul
d. Template (Suspensi RNA)	10 ul
e. ddH2O	10 ul
f. Taq/RT II	1 ul
g. TOTAL REAKSI	50 ul

2. Masukkan tabung dalam mesin Thermal Cycler

- a. Program RT-PCR adalah sebagai berikut :
 - 42°C ---- 45 menit (Reverse Transcripatase)
 - 95°C ---- 3 menit
 - sebanyak 1 siklus
 - 95°C ---- 30 detik
 - 55°C ---- 40 detik
 - 72°C ---- 40 detik
 - sebanyak 35 siklus
 - 72°C ---- 10 menit -> final extention

Set Primer Matrix :

M52C 5'- CTTCTAACCGAGGTCGAAACG-3'
 M253R 5'- AGGGCATTGTTGGACAAAG/TCGTCTA-3'
 Produk PCR yang dihasilkan 212 bp

Set Primer H5 :

H5 - F 5'-ACACATGCYCARGACATACT
 H5 - R 5'- CTYTGRTTYAGTGTGATGT
 Produk PCR yang dihasilkan 545 bp

Visualisasi Hasil RT-PCR

- a. Pembuatan gel agarose 2%.
 1. Gel agarose 2% dibuat dengan ditimbang 1 gr agarose dan dilarutkan dalam 50 ml 1X bufer TBE pada labu erlemeyer, kemudian dikocok sampai merata.
 2. Larutan agarose dipanaskan dalam microwave sampai mendidih dan sampai larutan menjadi jernih.
 3. Kemudian ditambahkan 2 µl ethidium bromida, dicampur hingga merata.
 4. Setelah itu larutan dituang ke dalam tray dan dipasang *well forming combs*.
 5. Larutan agarose dibiarkan mengeras.
 6. Bila gel telah mengeras *well forming combs* dilepas secara perlahan-lahan dan gel agarose siap digunakan untuk elektroforesis
- b. Elektroforesis
 1. Tray yang berisi gel agarose diletakkan di dalam tank elektroforesis dan dimasukkan larutan 1X buffer TBE ke dalam tank elektroforesis tersebut hingga sekitar 1 mm di atas permukaan gel.
 2. Kemudian diambil 2 µl *loading dye buffer* diletakkan di atas parafilm.
 3. Dalam *loading dye buffer* ditambahkan sampel (hasil PCR) sebanyak 4-5 µl dan disuspensikan hingga merata.
 4. Setelah itu larutan dimasukkan dalam sumur yang terdapat pada gel, tank elektroforesis ditutup dan dihubungkan arus listrik sebesar 100 volt selama 30 sampai 60 menit.
 5. Bila proses elektroforesis selesai (*loading dye* berada satu cm dari batas bawah gel), arus listrik dimatikan dan diambil tray dengan menggunakan sarung tangan.
 6. Gel hasil elektroforesis diletakkan pada UV transilluminator.
 7. Dokumentasikan hasil elektroforesis dengan camera Polaroid atau Bioprint

Keberhasilan diagnosis virus secara garis besar tergantung pada kualitas spesimen dan kondisi transportasi pada saat spesimen tersebut dikirim dan penyimpanan spesimen sebelum di proses lebih lanjut di laboratorium.

3. PEMERIKSAAN ASPERGILOSIS

Aflatoxin merupakan hasil metabolisme *mycotoxin* yang dihasilkan oleh kapang *Aspergillus flavus* dan *Aspergillus parasiticus* (Kendrick E 2004). Aflatoxin adalah racun yang dihasilkan oleh metabolisme kapang pada makanan dan pakan ternak. Penyakit yang disebabkan oleh keracunan aflatoxin disebut aflatoxicosis biasanya terjadi pada ternak, binatang peliharaan dan manusia. Tahun 1960 terjadi wabah penyakit yang menyebabkan kematian 100.000 ekor kalkun muda pada peternakan unggas di Inggris, penyakit ini disebut "*Turkey X Disease*". Hal ini juga menimbulkan kematian yang cukup tinggi pada 20.000 anak itik, anak burung merpati dan unggas lainnya. Wabah ini diduga terjadi karena mengkonsumsi pakan ternak yang berasal dari tepung kacang tanah Brazilia. Pada tahun 1961 toxin yang dihasilkan oleh *A. flavus* dapat teridentifikasi yang diberi nama aflatoxin yang berasal dari *A. flavus* → afla → Aflatoxin

Untuk mendeteksi adanya mikotoksin dalam hasil pertanian dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri inframerah dimana mikotoksin terlihat berupa titik hitam. Ada tiga cara untuk mendeteksi aflatoxin yaitu :

1. Test Sinar Hitam (Black Light Test) dengan memeriksa biji-bijian dengan dengan sinar infra merah ditempatkan pada bagian yang diduga terkontaminasi dengan aflatoxin.
2. The Fluorometric Iodine Rapid Screening and Minicolum Test prosedur penyaringan secara cepat untuk menentukan ada tidaknya aflatoxin.
3. Pemeriksaan prosedur laboratorium secara kuantitatif yang menentukan adanya aflatoxin seperti Thin - Layer Chromatography, Gas – Liquid Chromatography, High – Pressure Chromatography, Fluorometric Iodine dan ELISA.

Media dan reagen

- Saboround glucose agar,
- Saboround dextrosa agar,

Bahan yang digunakan Pepton 10,gr, dextrose 40,gr, agar 15 gr, aquadest 10000ml

Larutkan bahan-bahan tadi sambil dipanaskan, sterilisasi 121°C selama 15 menit, dinginkan selama 15 menit sehingga suhunya berkisar 56°C. Tambahkan 20 -100IU Penicillin, 30-100 ug streptomycin, 0,4 ug chloramphenicol permiliter medium untuk menghindari kontaminasi bakteri, setelah tercampur rata tuang ke dalam cawan petri @ ± 15 ml

- Lactophenol cotton blue,

Digunakan untuk deteksi elemen jamur

Bahan Lactophenol R/ Carbolic acid 20 ml, lactic acid 20 ml, aquadest 20 ml, aquadest 20 ml, glycerin 40 ml.

Campurkan secara berurutan carbolic acid dengan aquadest, baru tambahkan lacyic acid dan glycerin.

Lactophenol cotton blue: campurkan lactophenol acid yang telah dibuat 1000 ml dengan methylene blue (Cl.52015) 0,05 gr

Cara pemeriksaan :

- Taruh 1 -2 tetes lactophenol cotton blue pada obyek glass, campur dengan sampel sarang burung walet, tutup dengan obyek glass, panaskan sampai terbentuk uap (jangan sampai mendidih), biarkan dingin, periksa di bawah mikroskop.
- Hasil spora jamur terwarnai biru termasuk dinding selnya dengan latar belakang jernih.

- KOH 10%

Peralatan

Timbangan, penangas air, pipet, pinset, autoklave, erlemeyer, kaca preparat, skalpel, inkubator, botol reagen, cover glass, cawan petri.

Pemeriksaan

1. Pemeriksaan langsung

Sampel dalam jumlah sesedikit mungkin diletakkan di atas kaca preparat, lalu beri 1-2 tetes KOH 10% atau lactophenol blue, tutup dengan cover glass dan hindari gelembung, lihat dengan mikroskop akan terlihat struktur khas dari spora, sporangiophore atau chonidiophore ataupun myselium bila ada cendawannya, biasanya utuh, bentuk struktur tadi dalam keadaan pendek atau terpisah

2. Pemeriksaan secara kultur

Inokulasi media agar dalam petridish dengan potongan kecil sampel yang diduga mengandung aspergillus pada bagian tengahnya, segel cawan petri dengan menggunakan plastik perekat/ isolasi/selotif agar kelembaban di dalamnya terjaga, inkubasi pada suhu 37°C selama kurang 7 hari dengan dialasi kertas saring membasahi air, amati pertumbuhan setiap hari, Pengamatan koloni dilakukan setiap hari dengan memperhatikan pertumbuhannya, bentuk koloni dan warnanya, Aspergillus sp. Biasanya akan tumbuh pada hari ke 3 – 5 atau bisa lebih.

3. Pemeriksaan secara mikroskopik

Dengan ujung jarum atau skalpel ambil/potong koloni yang tumbuh pada media agar, letakkan ditengah preparat, beri 1 – 2 tetes lactophenol cotton blue, lalu tutup dengan cover glass dan hindari adanya gelembung. Lihat dimikroskop hasil seperti pada pemeriksaan langsung kan terlihat struktur khas dari spora, sporangiophore atau chonidiophore ataupun myselium bila ada cendawannya, biasanya utuh, bentuk struktur tadi berbeda antara cendawan yang satu dengan lainnya.

Cara menentukan hasil

Cendawan Aspergillus sp. Ditinjau dari segi koloni akan mempunyai sifat sebagai berikut :

- Pertumbuhan lambat
- Mula-mula berwarna putih
- Kemudian terlihat perubahan warna mulai dari bagian tengah koloni :

Aspergillus niger berwarna coklat - hitam dari sporanya dengan tepi koloni berwarna putih, Aspergillus fumigatus pada bagian tengahnya berwarna biru-kehijauan untuk kemudian warnanya lebih gelap, Aspergillus flavus akan berwarna kuning – kuning kehijauan.

Secara mikroskopik semua spesies dari aspergillus akan menunjukkan adanya konidiospora yang besar dengan vesikel yang jelas, folikeldan konidia yang jelas pada mycelium terlihat septa-septanya.

4. PEMERIKSAAN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Preparasi sampel

Sarang burung walet yang telah dicuci ditimbang sebanyak 25 gram digerus dengan krus porcelain, kemudian dilarutkan dengan larutan pengencer BPW 0,1% sebanyak 225 ml (1 : 10)/dianggap sudah 10^{-1} , dihomogenkan dengan bantuan *stomacher* 15.000 – 20.000 rpm. Selanjutnya dibuat pengenceran dari 10^{-1} menjadi 10^{-2} dengan cara : 1 ml larutan sampel pengenceran 10^{-1} dimasukkan ke dalam 9 ml BPW 0,1%, kemudian dihomogenkan. Dengan cara yang sama dibuat pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} dan 10^{-6} .

Media dan Reagen yang digunakan

BPW 0,1%, media *Baird-Parker Agar* (BPA) yang sudah ditambahkan dengan 5% *Egg Yolk Tellurite Emulsion* (5 ml ke dalam 95 ml medium BPA), *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) dan plasma kelinci.

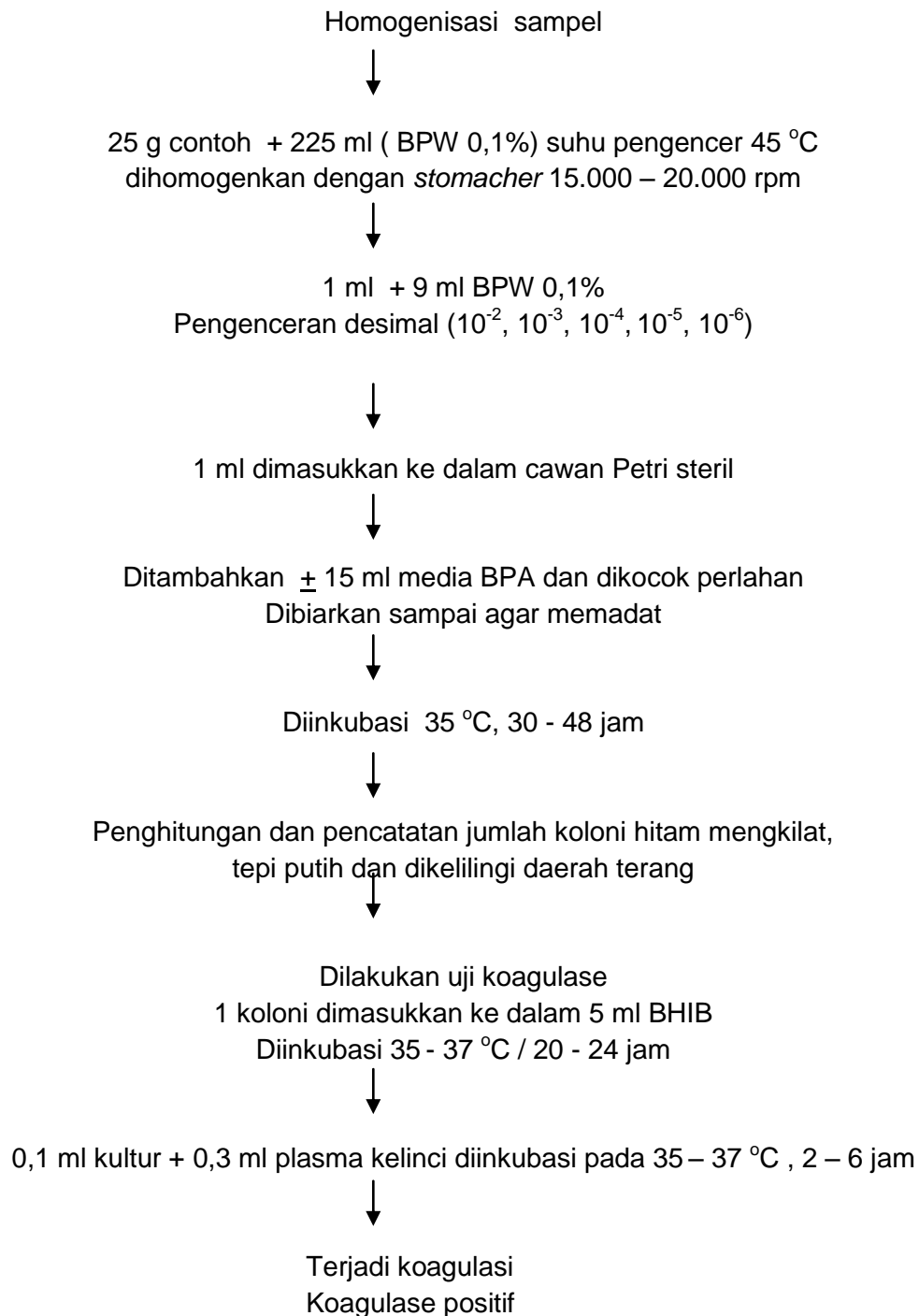
Peralatan

Cawan petri, tabung, reaksi, tabung serologi, pipet, botol media, guntung, pinset, jarum inokulasi (ose), *stomacher*, pembakar bunsen, pH meter, timbangan, *magnetic stirrer*, pengocok tabung (*vortex*), inkubator, penangas air, autoklaf, lemari steril (*clean bench*), lemari pendingin (*refrigerator*), *freezer*.

Pengujian Bakteri *Staphylococcus aureus*

Diambil 1 ml larutan sampel pada pengenceran 10^{-1} dengan pipet steril dimasukkan ke dalam 9 ml larutan BPW 0,1% untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} . Dengan cara yang sama dibuat pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . Sebanyak 1 ml sampel dari masing-masing pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} dimasukkan ke dalam cawan petri steril. Ditambahkan 15 – 20 ml media *Baird-Parker Agar* (BPA) yang sudah ditambahkan dengan 5% *Egg Yolk Tellurite Emulsion* (5 ml ke dalam 95 ml medium BPA) pada masing-masing cawan yang sudah berisi larutan sampel. Supaya larutan sampel dan media BPA homogen dilakukan pemutaran cawan membentuk angka delapan. Diinkubasikan pada suhu 35 °C selama 24 – 48 jam dan cawan petri diletakkan terbalik. Dipilih cawan petri yang mengandung koloni 20 – 200. Koloni *S. aureus* berwarna hitam mengkilat, tepi koloni putih dan dikelilingi daerah yang terang.

Uji koagulase dilakukan dengan cara mengambil satu koloni tersangka dan dimasukkan ke dalam 5 ml *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) steril dan dihomogenkan. Diinkubasi pada suhu 35 °C selama 20 – 24 jam. Kemudian dari biakan ini diambil 0,1 ml dan ditambahkan ke dalam tabung steril yang berisi plasma darah kelinci 0,3 ml. Diinkubasi pada suhu 35 °C selama 2 – 6 jam. Jika terjadi koagulasi menunjukkan reaksi positif. Penghitungan jumlah *S. aureus* dalam 1 gram sampel adalah jumlah koloni dalam cawan yang memberikan reaksi koagulase positif dikalikan faktor pengenceran



Metoda pengujian *S. aureus* (SNI 19-2897-1992)

5. PEMERIKSAAN *LISTERIA* SP

a. Bahan Media dan Reagen

Bahan kimia yang digunakan *listeria enrichment broth* (LEB, CM 0862, Oxoid, England), *oxford agar* (OXA, CM 0856, Oxoid, England), *trypticase soy agar* dengan *yeast extract* (TSAye, Difco TM, USA), *tryptone soya broth* dengan *yeast extract* (TSBye, Bacto TM-Difco, USA), media semisolid yaitu *sulfide, indol, motility* (SIM), *kaliium hydroxide* (KOH) 3%, pereaksi *hydrogen peroxide* (H_2O_2) 3%, gula-gula mannitol, xylosa, rhamnosa, pewarnaan Gram, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *ammonium sulfat* ($[NH_4]_2 SO_4$), media agar darah domba (5-7%), *phosphat buffer saline* (PBS) serta biakan *L. monocytogenes* (isolat lapang/feldstamm) sebagai kontrol positif.

b. Alat

Alat yang digunakan adalah cawan petri (diameter 100 mm, tinggi 15 mm), tabung reaksi berpenutup, botol media, gelas *Erlenmeyer*, pipet volumetrik, bola karet pipet, öse, *laminar flow*, mikroskop, pembakar bunsen, timbangan, *tube shaker (vortex)*, inkubator bersuhu $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, inkubator bersuhu $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, penangas air, autoklaf, lemari steril (*clean bench*) dan lemari pendingin (*refrigerator*).

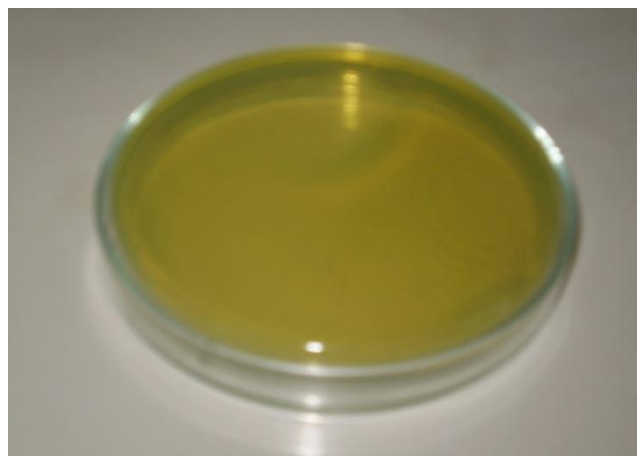
c. Metode Pengujian

Metode uji konvensional untuk isolasi dan identifikasi *L. monocytogenes* yang mengacu pada *Bacteriological Analytical Manual, US Food and Drug Administration* dan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Bergey 1994) dan metode uji kekeruhan (*Aschaffenburg test*) untuk mengetahui kesempurnaan proses sterilisasi.

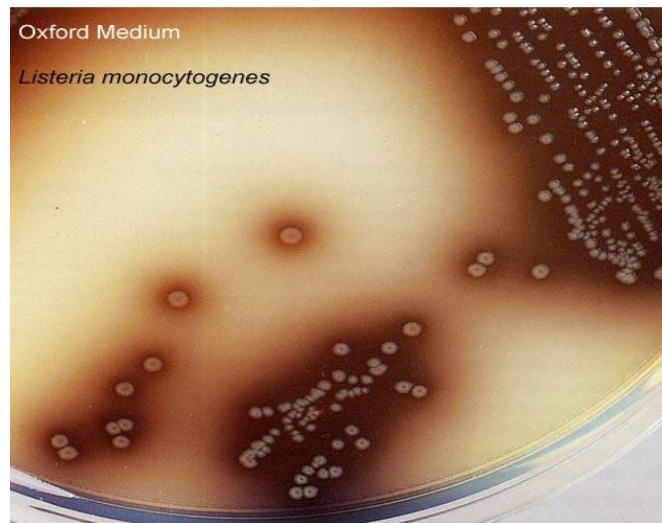
Tatacara Pengujian Isolasi dan Identifikasi

Tahap pengayaan dilakukan sebagai berikut: sebanyak 25 ml contoh susu UHT ditambahkan ke dalam 225 ml LEB, kemudian diinkubasi pada suhu $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam, 48 jam dan 7 hari. Setelah inkubasi 24 jam, dilakukan tahap isolasi dengan menumbuhkan sebanyak satu öse larutan tersebut di atas pada media oxford secara duplo, kemudian satu set contoh diinkubasi pada $35 - 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 – 48 jam dan satu set lain diinkubasi pada suhu $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 dan 48 jam. Cara yang sama dilakukan setelah inkubasi pada media LEB selama 48 jam dan 7 hari.

Adanya pertumbuhan *Listeria* ditandai dengan koloni pada media Oxford berwarna hitam dikelilingi zona jernih. Sebanyak 3 – 5 koloni tersebut kemudian ditumbuhkan pada TSAye dan diinkubasikan pada $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. Koloni yang tumbuh pada TSAye berwarna terang kebiruan kemudian diidentifikasi dengan pewarnaan Gram, uji katalase menggunakan H_2O_2 3%, uji KOH 3% dan uji CAMP. Koloni yang tumbuh pada TSAye tersebut juga diinokulasi dalam TSBye pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24-48 jam. Selanjutnya dari TSBye tersebut diuji gula-gula (mannitol, rhamnose dan xylose) dan motilitas menggunakan media SIM.



Media oxford tidak ditumbuhi *L. Monocytogenes*



Media oxford yang ditumbuhi *L. monocytogenes*

Tatacara Uji Pewarnaan Gram

Uji pewarnaan Gram yang dilakukan berdasarkan metode *Christian Gram* ini merupakan uji pewarnaan diferensial yang bertujuan untuk mengetahui morfologi bakteri *L. monocytogenes*. Tahapan uji tersebut sebagai berikut: satu koloni diambil dari media TSAye dengan menggunakan öse sucihama, diletakkan di atas gelas obyek, ditambahkan PBS satu tetes dan diratakan tipis. Preparat dianginkan hingga kering dan selanjutnya difiksasi di atas api Bunsen. Preparat direndam selama satu menit ke dalam pewarnaan *carbol fuchsin*, kemudian dicuci dengan air mengalir. Tahap selanjutnya, preparat direndam dengan larutan yodium selama satu menit dan dicuci dengan air mengalir. Berikutnya, preparat dicuci dengan larutan alcohol 95% selama 10-20 detik dan dicuci dengan air mengalir. Tahap terakhir preparat dicuci dengan air mengalir. Preparat dikeringkan dan selanjutnya dapat diamati dengan menggunakan mikroskop. Sel bakteri berwarna ungu menunjukkan bakteri Gram positif, sedangkan sel bakteri Gram negatif berwarna merah.

Tatacara Uji Katalase

Sebagian besar bakteri yang tumbuh dalam suasana aerob menghasilkan enzim katalase. Uji katalase dilakukan untuk mengetahui keberadaan enzim katalase pada bakteri tertentu. Tatacara uji ini adalah sebagai berikut, sejumlah satu öse koloni tersangka diambil dari media TSAye dan diletakkan di atas gelas obyek, kemudian ditambahkan dengan satu tetes H_2O_2 3% dan diaduk rata. Keberadaan enzim katalase ditandai dengan adanya buih akibat oksigen yang dibebaskan.

Tatacara Uji KOH

Sebanyak dua tetes larutan KOH 3% diletakkan di atas gelas obyek, ditambahkan dengan satu koloni bakteri tersangka *L. monocytogenes* yang diambil secara aseptik menggunakan öse sucihama. Campuran bakteri dan larutan KOH 3% kemudian diaduk dengan cepat di atas gelas obyek selama 60 detik. Beberapa saat kemudian akan terlihat campuran tersebut berserabut seperti benang kental yang terbentuk saat menaikkan dan menurunkan ose pada bakteri Gram negatif. Lendir

tersebut merupakan komponen kromosom sel bakteri Gram negatif yang membran selnya telah dirusak oleh KOH 3%.

Tatacara Uji CAMP

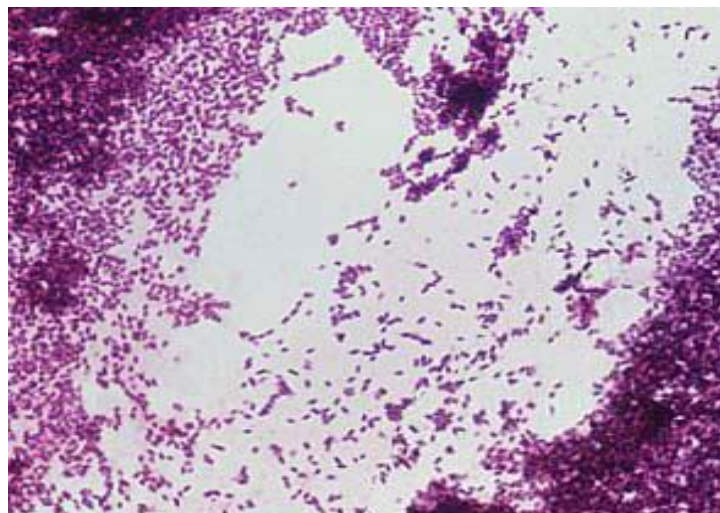
Aktivitas hemolitik *L. monocytogenes* dapat diketahui dengan uji CAMP. Uji ini dilakukan dengan cara menumbuhkan koloni yang diduga *L. monocytogenes* pada media agar darah domba (5-7%) yang menggunakan biakan *S. aureus* dan kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Adanya aktivitas hemolitik bakteri ditandai dengan adanya zona hemolisis di sekitar goresan *S. Aureus*.

Tatacara Uji Gula-gula

Uji ini dilakukan untuk mengetahui bakteri memfermentasi gula-gula dan menghasilkan asam tanpa gas. Sebanyak satu koloni tersangka diambil dari media TSBye, kemudian diinokulasikan pada media mannitol, rhamnosa dan xylosa. Media tersebut selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 24 jam. Hasil uji positif bila terjadi fermentasi pada media gula-gula di atas ditandai dengan perubahan warna dari ungu menjadi kuning dan hasil uji negatif bila media gula-gula tetap berwarna ungu.

Tatacara Uji Motilitas

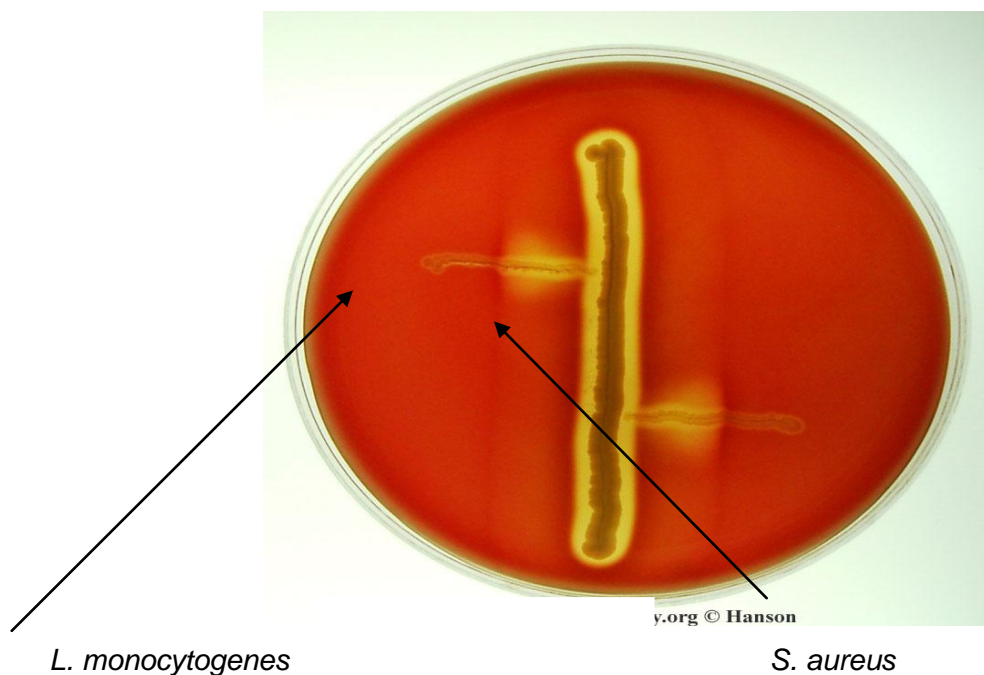
Uji motilitas merupakan uji yang dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui adanya pergerakan bakteri. Satu koloni tersangka diambil secara aseptik menggunakan ose jarum dari media TSBye, kemudian ditusukkan secara tegak lurus pada media semisolid SIM hingga kedalaman seperempat media. Media selanjutnya diinkubasikan pada suhu 35 °C selama 24 jam. Pergerakan bakteri dapat diamati dengan adanya pertumbuhan di sekitar media, sedangkan bakteri tidak motil ditandai dengan adanya pertumbuhan hanya di bagian tusukan ose jarum saat inokulasi.



L. monocytogenes pada pewarnaan Gram

Interpretasi Hasil Identifikasi *Listeria monocytogenes*

Listeria spp. termasuk mikroba Gram-positif dengan ditandai sel berbentuk batang dan berwarna ungu. Pada uji katalase adanya *L. monocytogenes* akan membentuk gas, sedangkan dengan uji KOH 3% , adanya mikroba tersebut ditandai dengan tidak terbentuknya lendir. Uji CAMP menunjukkan adanya zona hemolisis pada goresan *L. monocytogenes* yang membentuk ujung panah setengah lingkaran di sekitar goresan *S. aureus*, seperti yang ditampakkan. *Listeria* spp. ditandai dengan adanya pertumbuhan bakteri yang pergerakannya membentuk pola seperti payung di permukaan media (Wehr dan Frank 2004). Pada media SIM, *L. monocytogenes* menampilkan pertumbuhan hingga 0,5 cm di bawah permukaan agar membentuk payung. *L. monocytogenes* menghasilkan asam dan memfermentasi gula manitol, rhamnosa dan xylosa.



Interpretasi *L. monocytogenes* pada Uji CAMP (Anne 2006)

6. PEMERIKSAAN *LEPTOSPIRA* SP

Prinsip isolasi Leptospirosis mempunyai prinsip-prinsip yang terdiri dari isolasi dan identifikasi, pewarnaan, dan uji biokimia

Media dan pereaksi yang digunakan

Media EMJH yang dibuat dari:

- | | | | |
|---------------------------------------|-----------|-------------------------------------|---------|
| - NH ₄ Cl | 25,0 gr | ZnSo ₄ 7H ₂ O | 0,4 gr |
| - MgCl ₂ 6H ₂ O | 1,5 gr | CaCl ₂ 2H ₂ O | 1,5 gr |
| - FeSO ₄ 7H ₂ O | 0,5 gr | Sod Pyruvate | 10,0 gr |
| - Glycerol | 10,0 gr | Tween 80 | 10,0 gr |
| - Thiamine HCl | 0,5 gr | Cyanocabalamine | 0,2 gr |
| - Aquadest | 1000,0 ml | | |

Kemudian ditambahkan 10 gr Bovine serum albumin, 50 ml aquadest. Komposisi media tersebut dicampur kemudian ditambahkan ke tabung, dan disterilkan dengan autoclave 121° C selama 15 menit.

Peralatan

Cawan petri, pipet, autoclave, kaca preparat, penangas, centrifuge, kaca penutup, kaca datar, tabung reaksi, timbangan, inkubator, labu Erlenmeyer, mikroskop medan gelap, tabung centrifuge, kaca pengaduk dan mikrotiter plate.

Pengujian Bakteri *Leptospira sp.*

Sampel sarang burung walet dan sriti yang telah dipreparasi, dimasukkan ke dalam media EMJH, diinkubasi pada temperatur 30° C diperiksa dengan mikroskop medan gelap setiap 7 hari. Hasil yang positif terlihat bentuk dan gerakan khas dari *Leptospira*, bergerak maju mundur searah dengan proses memanjang tubuhnya.

7. PEMERIKSAAN *ESCHERICHIA COLI*

Preparasi sampel

Sarang burung walet yang telah dicuci ditimbang sebanyak 25 gram digerus dengan krus porcelain, kemudian dilarutkan dengan larutan pengencer BPW 0,1% sebanyak 225 ml (1 : 10)/dianggap sudah 10^{-1} , dihomogenkan dengan bantuan *stomacher* 15.000 – 20.000 rpm. Selanjutnya dibuat pengenceran dari 10^{-1} menjadi 10^{-2} dengan cara : 1 ml larutan sampel pengenceran 10^{-1} dimasukkan ke dalam 9 ml BPW 0,1%, kemudian dihomogenkan. Dengan cara yang sama dibuat pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} dan 10^{-6} .

Media dan Reagen yang digunakan

Indol, Methyl Red (MR), Voges-Proskauer (VP), Citrate (IMViC), medium LSTB, *EC Broth*, *Violet Red Bile Agar (VRBA)*, *Nutrient Agar*, *Tryptone Broth*, larutan *alfa naftol*, *dSimmons citrate*

Peralatan

Cawan petri, tabung, reaksi, tabung Durham, tabung serologi, pipet, botol media, gunting, pinset, jarum inokulasi (*ose*), *stomacer*, pembakar bunsen, pH meter, timbangan, *magnetic stirer*, pengocok tabung (*vortex*), inkubator, penangas air, autoklaf, lemari steril (*clean bench*), lemari pendingin (*refrigerator*), *freezer*.

Pengujian Bakteri *E. coli*

Pengujian dilakukan dengan uji dugaan, uji peneguhan dan identifikasi melalui uji biokimiawi *Indol, Methyl Red (MR), Voges-Proskauer (VP) dan Citrate (IMViC)*. Pengujian dugaan *E. coli* dilakukan sama dengan uji penduga pada *Coliform* dengan medium LSTB. Selanjutnya uji peneguhan dilakukan dengan memindahkan biakan positif dari tabung LSTB dengan menggunakan *ose* dari setiap tabung ke dalam *EC Broth* yang berisi tabung Durham terbalik. Kemudian diinkubasikan pada penangas air suhu 44 – 45 °C selama 24 – 48 jam. Gas yang terbentuk didalamnya dicatat dan dianggap positif. Hasil uji dinyatakan dengan terbentuk tidaknya gas dalam tabung Durham. Jika terbentuk gas dengan menunjuk pada tabel APM/MPN, dapat dinyatakan APM/MPN *E. coli*. Kemudian dari tabung yang membentuk gas digoreskan pada perbenihan *Violet Red Bile Agar (VRBA)* dalam cawan Petri dan diinkubasi pada suhu 35 °C selama 18 – 24 jam. Dari perbenihan VRBA dipilih

koloni berwarna merah gelap yang berdiameter 0.5 mm atau lebih dan diinokulasikan pada *Nutrient Agar* miring dalam tabung, diinkubasi pada suhu 35 °C selama 18 – 24 jam. Dari biakan ini dilakukan pengujian IMViC. Sifat-sifat bakteri *Coliform* dengan uji IMViC.

Uji Indol dilakukan dengan menginokulasikan 1 sengkeli dari biakan murni *Nutrient Agar* miring ke dalam *Tryptone Broth*, dan diinkubasikan pada suhu 35 °C selama 18 – 24 jam. Ke dalam tabung ditambahkan 0,2 – 0,3 ml pereaksi indol (reagen Kovac). Warna merah tua pada permukaan menunjukkan reaksi indol positif, warna jingga menunjukkan reaksi indol negatif.

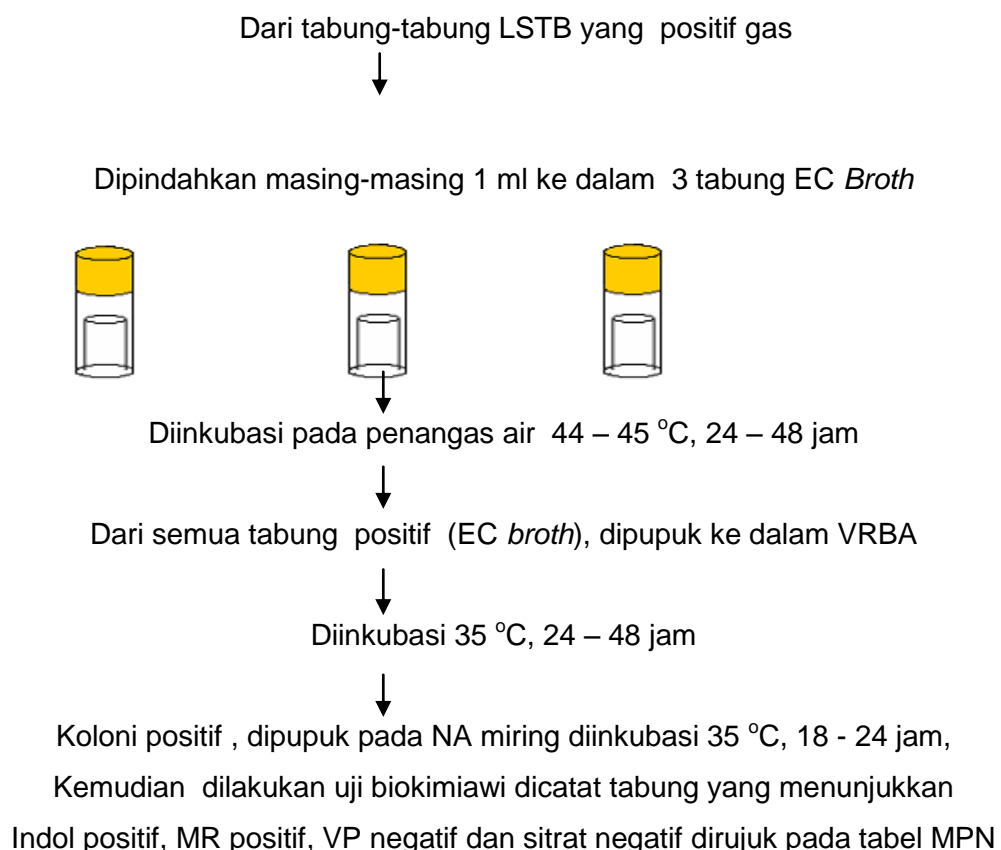
Uji *Methyl Red* dilakukan dengan menginokulasikan 1 sengkeli dari biakan *Nutrient Agar* ke dalam media MR-VP dan diinkubasikan pada suhu 35 °C selama 18 – 24 jam. Dengan menggunakan pipet, 5 ml dari larutan ini dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 5 tetes merah metil dan dikocok. Warna kuning menunjukkan reaksi negatif dan warna merah menunjukkan reaksi positif.

Uji *Voges Proskauer* (Uji VP) dilakukan dengan menginokulasikan 1 sengkeli dari biakan *Nutrient Agar* ke dalam MR-VP dan diinkubasikan pada suhu 35 °C selama 48 jam. Dengan menggunakan pipet, 1 ml dari larutan ini dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 0,6 ml larutan *alfa naftol* dan 0,2 ml larutan kalium hidroksida dan dikocok.

Didiamkan selama 2 – 4 jam. Warna merah muda hingga merah tua menunjukkan reaksi positif, warna tidak berubah menunjukkan reaksi negatif.

Uji Sitrat dilakukan dengan menginokulasikan 1 sengkeli dari biakan *Nutrient Agar* ke dalam perbenihan *Simmons citrate* dan diinkubasikan pada suhu 35 °C selama 48 – 96 jam. Warna biru menunjukkan reaksi positif, warna hijau menunjukkan reaksi negatif

Untuk uji penegasan dengan reaksi biokimiawi dengan menunjukkan uji Indol dan MR positif dan uji VP serta sitrat negatif, dapat dinyatakan penegasan adanya *E. coli*



Sifat-sifat bakteri *Coliform* dengan uji IMViC

<i>Indol</i>	<i>Methyl Red</i>	<i>Voges Proskauer</i>	<i>Citrat</i>	<i>Type</i>
+	+	-	-	<i>Typical E. coli</i>
-	+	-	-	<i>Atypical E. coli</i>
+	+	-	+	<i>Typical Intermediate</i>
-	+	-	+	<i>Atypical Intermediate</i>
-	-	+	+	<i>Typical E. aerogenes</i>
+	-	+	+	<i>Atypical E. Aerogenes</i>

Sumber : SNI 01-2897-1992

BAB V
PENUTUP

1. Realisasi kegiatan tindakan karantina hewan terhadap lalulintas pemasukan/ pengeluaran sarang burung walet dan sriti segera dilaporkan kepada Kepala Badan Karantina Pertanian;
2. Petunjuk Pelaksanaan Kepala Badan Karantina Pertanian ini supaya dapat dilaksanakan dengan penuh tanggung jawab.

Kepala Badan Karantina Pertanian,



Ir. Hari Priyono, M.Si.
195812141984031002