



## **Metode uji tapis (*screening test*) residu antibiotika pada daging, telur dan susu secara *bioassay***



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi .....	1
3 Singkatan.....	1
4 Prinsip pengujian .....	2
5 Media .....	2
6 Bahan .....	2
7 Peralatan .....	3
8 Prosedur .....	3
Lampiran A (normatif) Pembuatan larutan dapar.....	9
Lampiran B (normatif) Pembuatan media.....	10
Lampiran C (normatif) Pembuatan spora .....	13
Bibliografi.....	16

## **Prakata**

Standar Metode uji tapis (screening test) residu antibiotika pada daging, telur dan susu secara bioassay disusun dan dirumuskan oleh Panitia Teknis 67-03 Peternakan dan Produk Peternakan.

Standar ini telah dibahas dalam rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus tanggal 22 Mei 2007 di Bogor, yang dihadiri oleh anggota Panitia Teknis dan pihak terkait lainnya.

Standar ini juga telah melalui tahap jajak pendapat pada tanggal 7 April 2008 sampai dengan 7 Juni 2008, namun untuk mencapai kuorum diperpanjang sampai dengan tanggal 7 Juli 2008 dan langsung disetujui menjadi RASNI.

SNI ini disusun untuk mendukung perundangan-undangan negara Republik Indonesia yang berlaku di bidang keamanan pangan asal hewan.



## Metode uji tapis (*screening test*) residu antibiotika pada daging, telur dan susu secara *bioassay*

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan metode uji tapis residu antibiotika secara *bioassay* pada daging, telur dan susu.

Pengujian ini berlaku untuk antibiotika golongan penisilin, tetrasiklin, aminoglikosida, dan makrolida.

### 2 Istilah dan definisi

#### 2.1

##### **metode uji tapis**

suatu cara melakukan pengujian untuk mendeteksi kandungan residu antibiotika secara kualitatif sesuai dengan batas deteksi tertentu pada daging, telur, dan susu

#### 2.2

##### ***bioassay***

suatu pengujian yang menggunakan mikroorganisme untuk mendeteksi senyawa antibiotika yang masih aktif

#### 2.3

##### **residu antibiotika**

zat antibiotika termasuk metabolitnya yang terkandung dalam daging, telur, dan susu, baik sebagai akibat langsung maupun tidak langsung dari penggunaan antibiotika

#### 2.4

##### **daging**

bagian otot skeletal dari karkas ternak/hewan yang aman, layak dan lazim dikonsumsi oleh manusia, dapat berupa daging segar, daging segar dingin, atau daging beku

#### 2.5

##### **telur**

telur yang dihasilkan oleh unggas yang belum mengalami proses pengolahan dan pengeraman untuk dikonsumsi manusia

#### 2.6

##### **susu**

cairan yang berasal dari ambing ternak perah sehat dan bersih, yang diperoleh dengan cara pemerahan yang benar sesuai ketentuan yang berlaku, yang kandungan alaminya tidak dikurangi atau ditambah sesuatu apapun dan belum mendapat perlakuan apapun kecuali proses pendinginan

### 3 Singkatan

*psi* = *pressure square inche*;

*rpm* = rotasi per menit;

*ATCC* = *American Type Culture Collection*;

*IU* = International Unit;  
*HIB* = Heart Infusion Broth.

#### **4 Prinsip pengujian**

Residu antibiotika akan menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada media agar. Penghambatan dapat dilihat dengan terbentuknya daerah hambatan disekitar kertas cakram atau *silinder cup* atau *agar well*. Besarnya diameter daerah hambatan menunjukkan konsentrasi residu antibiotika. Pengujian ini harus dilakukan secara aseptis dengan memperhatikan kaidah berlaboratorium yang baik di laboratorium mikrobiologi.

#### **5 Media**

##### **5.1 Kuman**

- Spora *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 untuk golongan penisilin.
- Spora *Bacillus cereus* ATCC 11778 untuk golongan tetrasiklin.
- Spora *Bacillus subtilis* ATCC 6633 untuk golongan aminoglikosida.
- Vegetatif *Kocuria rizophila* (*Micrococcus luteus*) ATCC 9341 untuk golongan makrolida.

**CATATAN** Kuman ATCC dapat digantikan dengan kuman yang setara.

##### **5.2 Media**

- Media agar *Bacillus stearothermophilus*: yeast extract, peptone, bacto agar, dextrose.
- Media agar *B. cereus* : yeast extract, beef extract, peptone, bacto agar.
- Media agar *B. subtilis* : beef extract, peptone, bacto agar.
- Media agar *Kocuria rizophila* : yeast extract, beef extract, peptone, bacto agar, glucose.
- Media cair HIB.

#### **6 Bahan**

##### **6.1 Baku pembanding**

- Baku pembanding Natrium penisilin untuk golongan Penisilin.
- Baku pembanding Oksitetrasiklin hidroklorida untuk golongan Tetrasiklin.
- Baku pembanding Kanamisin sulfat untuk golongan Aminoglikosida.
- Baku pembanding Tilosin-tartrat untuk golongan Makrolida.

##### **6.2 Bahan kimia/Dapar**

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Kalium dihidrogen fosfat);
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Dinatrium hidrogen fosfat);
- $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Asam fosfat);
- NaOH (Natrium hidroksida);
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Dikalium hidrogen fosfat);
- HCl (Asam klorida);
- NaCl (Natrium klorida).

### 6.3 Bahan lainnya

Kertas cakram (*paper disc*) yang steril tebal (*thick*) yang mampu menyerap larutan minimal 75 µl dengan diameter 8 mm atau 10 mm.

## 7 Peralatan

### 7.1 Bahan gelas

- cawan petri 100 x 12 mm;
- tabung reaksi ukuran 7 ml, 20 ml, 50 ml;
- tabung sentrifus ukuran 50 ml;
- labu ukur 50 ml, 100 ml;
- gelas ukur 100 ml, 500 ml;
- *Erlenmeyer* 250 ml, 500 ml;
- botol timbang ukuran 20 ml;
- pipet volumetrik ukuran 1 ml, 2 ml, 3 ml, 5 ml, 10 ml, 18 ml;
- pipet graduasi ukuran 1 ml, 5 ml, 7 ml, 10 ml, 20 ml;
- botol media (*roux's bottle*).

### 7.2 Alat

- pengocok tabung;
- sentrifus 3.000 rpm;
- penangas air;
- lemari steril (*clean bench*);
- *homogenizer / ultrasonic homogenizer*;
- autoklaf;
- lemari pendingin (*refrigerator*);
- *freezer*;
- timbangan analitik;
- tiga (3) jenis inkubator (30 °C ± 1 °C, 36 °C ± 1 °C dan 55 °C ± 1 °C);
- magnet pengaduk;
- pH Meter.

### 7.3 Penunjang

- pipet mikro 50 µl – 300 µl;
- jangka sorong (*caliper*) atau alat lain yang sesuai untuk mengukur diameter daerah hambatan;
- *burner*;
- *ose*;
- pinset;
- gunting.

## 8 Prosedur

### 8.1 Larutan baku pembanding

#### 8.1.1 Larutan stok baku pembanding

**8.1.1.1** Sebelum melakukan penimbangan, perlu diperhitungkan potensi dari masing-masing standar yang tertera pada label.

**8.1.1.2** Penimbangan baku pembanding harus dilakukan pada ruang timbang yang terkendali suhu dan kelembabannya ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\leq 50\%$ ), terutama yang bersifat sangat higroskopis.

**8.1.1.3 Prosedur pembuatan larutan**

**8.1.1.3.1** Baku pembanding untuk penisilin

Larutkan sejumlah baku pembanding Natrium penisilin dalam larutan dapar nomor 1 sehingga didapat konsentrasi 1.000 IU/ml. Cara pembuatan larutan dapar dapat dilihat pada Lampiran A.

**8.1.1.3.2** Baku pembanding untuk oksitetrasiklin

Larutkan sejumlah baku pembanding Oksitetrasiklin hidroklorida dalam air suling hingga didapat konsentrasi 1.000  $\mu\text{g/ml}$ .

**8.1.1.3.3** Baku pembanding untuk kanamisin

Larutkan sejumlah baku pembanding Kanamisin sulfat dalam larutan dapar nomor 3 sehingga didapat konsentrasi 1.000  $\mu\text{g/ml}$ . Cara pembuatan larutan dapar dapat dilihat pada Lampiran A.

**8.1.1.3.4** Baku pembanding untuk tilosin

Larutkan sejumlah baku pembanding Tilosin tartrat dalam 10 % methanol dalam air suling sehingga didapat konsentrasi 1.000  $\mu\text{g/ml}$ .

**8.1.1.3.5** Semua larutan stok baku pembanding simpan dalam *freezer* (temperatur  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) paling lama 1 bulan. Sebelum digunakan, larutan stok baku pembanding dicairkan (*thawing*) dengan cara diletakkan dalam *refrigerator*.

**8.1.2 Larutan baku kerja**

**8.1.2.1** Penisilin

Pipet 2 ml larutan stok baku penisilin, diencerkan sampai dengan 20 ml dengan dapar nomor 2 kocok hingga homogen sehingga akan diperoleh larutan baku kerja 100 IU/ml, selanjutnya lakukan pengenceran serial hingga diperoleh konsentrasi 0,01 IU/ml. Cara pembuatan larutan dapar dapat dilihat pada Lampiran A.

**8.1.2.2** Oksitetrasiklin

Pipet 2 ml larutan stok baku tetrasiklin, diencerkan sampai dengan 20 ml dengan dapar nomor 2 dihomogenkan agar diperoleh larutan baku kerja 100  $\mu\text{g/ml}$ . Selanjutnya lakukan pengenceran serial hingga diperoleh konsentrasi 1,0  $\mu\text{g/ml}$ . Cara pembuatan larutan dapar dapat dilihat pada Lampiran A.

**8.1.2.3** Kanamisin

Pipet 2 ml larutan stok baku kanamisin, diencerkan sampai dengan 20 ml dengan dapar nomor 2 dihomogenkan agar diperoleh larutan baku kerja 100  $\mu\text{g/ml}$ . Selanjutnya lakukan pengenceran serial hingga diperoleh konsentrasi 1,0  $\mu\text{g/ml}$ . Cara pembuatan larutan dapar dapat dilihat pada Lampiran A.

**8.1.2.4** Tilosin

Pipet 2 ml larutan stok baku tilosin, diencerkan sampai dengan 20 ml dengan dapar nomor 2 dihomogenkan agar diperoleh larutan baku kerja 100  $\mu\text{g/ml}$ . Selanjutnya lakukan pengenceran serial hingga diperoleh konsentrasi 1,0  $\mu\text{g/ml}$ . Cara pembuatan larutan dapar dapat dilihat pada Lampiran A.



**8.1.2.5** Semua larutan baku kerja dibuat pada saat akan dipergunakan untuk pengujian. (Tabel 1 dan Tabel 2)

**Tabel 1 - Larutan baku kerja oksitetrasiklin, kanamisin, dan tilosin**

Konsentrasi larutan (µg/ml)	Volume yang diambil (ml)	Diencerkan sampai dengan (ml)	Konsentrasi (µg/ml)
1.000	2	20	100
100	2	20	10
10	2	20	1*)

**KETERANGAN**  
\*) konsentrasi yang dipakai sebagai larutan baku kerja.

**Tabel 2 - Larutan baku kerja untuk penisilin**

Konsentrasi larutan (IU/ml)	Volume yang diambil (ml)	Diencerkan sampai dengan (ml)	Konsentrasi (IU/ml)
1.000	2	20	100
100	2	20	10
10	2	20	1
1	2	20	0.1
0,1	2	20	0.01*)

**KETERANGAN**  
\*) konsentrasi yang dipakai sebagai larutan baku kerja.

## 8.2 Pembuatan kurva baku

**8.2.1** Siapkan media dalam keadaan cair pada temperatur  $55\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Tambahkan mikroorganisme atau spora (Lampiran C) sesuai dengan golongan residu antibiotika yang akan diuji. Kemudian tuangkan ke dalam cawan petri sebanyak 8 ml per cawan, biarkan pada temperatur kamar sampai membeku. Cara pembuatan media dapat dilihat pada Lampiran B.

**8.2.2** Siapkan larutan baku kerja untuk oksitetrasiklin, kanamisin, dan tilosin, dengan variasi konsentrasi 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 2,0 µg/ml, 4,0 µg/ml (Tabel 3). Untuk penisilin dengan variasi konsentrasi 0,0025 IU/ml, 0,005 IU/ml, 0,01 IU/ml, 0,02 IU/ml, 0,04 IU/ml (Tabel 4).

**8.2.3** Teteskan terlebih dahulu masing-masing larutan baku kerja yang telah disiapkan pada kertas cakram atau yang sejenis sebanyak 75 µl (diameter 8 mm) atau 100 µl (diameter 10 mm) dan biarkan sampai menyerap seluruhnya sebelum diletakkan pada media dalam cawan petri. Teteskan juga larutan dapar fosfat masing-masing pelarut dari baku kerja sebagai kontrol negatif, selanjutnya cawan petri ditempatkan pada bidang datar pada temperatur kamar selama 1 jam sampai dengan 2 jam.

**8.2.4** Kemudian masukkan ke dalam inkubator pada temperatur  $55\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  untuk penisilin, temperatur  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  untuk oksitetrasiklin, dan pada temperatur  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  untuk kanamisin dan tilosin masing-masing selama 16 jam sampai dengan 18 jam.

**8.2.5** Diameter daerah hambatan yang terbentuk diukur dengan menggunakan alat ukur yang sesuai.

**8.2.6** Buat kurva yang menyatakan hubungan (linier regresi) antara konsentrasi antibiotika dengan diameter daerah hambatan. Hal ini dapat dilakukan secara manual atau dengan menggunakan program komputer.

**8.2.7** Gunakan kurva baku sebagai dasar pengujian residu antibiotika dengan uji tapis. Larutan kurva baku oksitetrasiklin, kanamisin, tilosin dan penisilin dapat dilihat pada Tabel 3 dan Tabel 4.

**Tabel 3 - Larutan kurva baku oksitetrasiklin, kanamisin, dan tilosin**

Konsentrasi larutan ( $\mu\text{g/ml}$ )	Volume yang diambil (ml)	Diencerkan sampai dengan (ml)	Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )
1.000	2	20	100
100	2	20	10
10	8	20	4*
4	10	20	2*
2	10	20	1*
1	10	20	0.5*
0,5	10	20	0.25*

**KETERANGAN**  
\* konsentrasi yang dipakai sebagai larutan kurva standar.

**Tabel 4 - Larutan kurva baku penisilin**

Konsentrasi larutan (IU/ml)	Volume yang diambil (ml)	Diencerkan sampai dengan (ml)	Konsentrasi (IU/ml)
1.000	2	20	100
100	2	20	10
10	2	20	1
1	8	20	0,4
0,4	2	20	0,04*
0,04	10	20	0,02*
0,02	10	20	0,01*
0,01	10	20	0,005*
0,005	10	20	0,0025*

**KETERANGAN**  
\* konsentrasi yang dipakai sebagai larutan kurva baku.

### 8.3 Persiapan contoh

#### 8.3.1 Penyiapan contoh daging

Timbang contoh daging sebanyak 10 g potong kecil-kecil tambahkan pelarut dapar fosfat nomor 2 sebanyak 20 ml, homogenkan dengan menggunakan alat *homogenizer*, kemudian sentrifus 3.000 rpm selama 10 menit. Ambil supernatan dan siap untuk digunakan sebagai larutan contoh uji. Cara pembuatan larutan dapar dapat dilihat pada Lampiran A.

#### 8.3.2 Penyiapan contoh telur

Timbang contoh telur (putih dan atau kuning telur) sebanyak 10 g tambahkan pelarut dapar fosfat nomor 2 sebanyak 20 ml, homogenkan dengan menggunakan alat *homogenizer* kemudian sentrifus 3.000 rpm selama 10 menit. Ambil supernatan dan siap untuk digunakan sebagai larutan contoh uji. Cara pembuatan larutan dapar dapat dilihat pada Lampiran A.

#### 8.3.3 Penyiapan contoh susu

Contoh susu langsung digunakan sebagai larutan contoh uji.

### 8.4 Pelaksanaan pengujian

**8.4.1** Cairkan media agar yang telah dibuat dengan pemanasan, kemudian letakkan pada penangas air hingga temperatur mencapai  $55\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**8.4.2** Pipet 1 ml biakan kuman uji vegetatif atau spora, dan campurkan ke dalam 100 ml media yang telah dicairkan hingga merata. (Khusus untuk media agar *B.stearothermophilus* : pipet 1 ml biakan spora, dan tambahkan 2,5 % larutan *dextrose* 2 %, kemudian campurkan ke dalam 100 ml media yang telah dicairkan hingga merata).

**8.4.3** Kemudian pipet 8 ml media yang telah mengandung kuman uji atau spora ke dalam setiap cawan petri sesuai dengan jenis golongan antibiotika yang akan diuji.

**8.4.4** Setiap jenis golongan antibiotika menggunakan minimal 3 cawan petri (triplo).

**8.4.5** Tempatkan cawan petri pada bidang yang datar sampai media membeku.

**8.4.6** Teteskan terlebih dahulu masing-masing larutan baku pembanding yang telah disiapkan ke dalam kertas cakram atau yang sejenis sebanyak 75  $\mu\text{l}$  (diameter 8 mm) atau 100  $\mu\text{l}$  (diameter 10 mm) dan biarkan sampai menyerap seluruhnya sebelum diletakkan pada media dalam cawan petri. Teteskan juga larutan baku pembanding sebagai kontrol positif dan larutan dapar sebagai kontrol negatif.

**8.4.7** Tempatkan masing-masing cawan petri pada bidang datar dalam ruangan dengan temperatur kamar selama 1 jam.

**8.4.8** Inkubasikan dalam inkubator selama 16 jam sampai dengan 18 jam untuk golongan makrolida dan aminoglikosida pada temperatur  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , golongan tetrasiklin pada temperatur  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dan golongan penisilin pada temperatur  $55\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**CATATAN** Cara pembuatan media dan spora dapat dilihat pada Lampiran B dan Lampiran C.

### 8.5 Cara menyatakan hasil

**8.5.1** Amati dan ukur diameter daerah hambatan yang terbentuk di sekeliling kertas cakram atau yang sejenis dengan menggunakan alat ukur yang sesuai.

**8.5.2** Kontrol positif harus membentuk daerah hambatan dari tepi kertas cakram atau yang sejenis.

**8.5.3** Kontrol negatif harus tidak membentuk daerah hambatan.

**8.5.4** Secara berkala laboratorium harus menentukan kurva baku untuk mengetahui linearitas metode pengujian.

**8.5.5** Diameter hambatan yang terbentuk pada contoh sebaiknya berada dalam kisaran/*range* kurva baku, apabila diameter hambatan yang terbentuk melebihi nilai kurva baku maka contoh harus diencerkan.



**Lampiran A**  
(normatif)  
**Pembuatan larutan dapar**

**A.1 Dapar fosfat nomor 1**

Timbang 7 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , dan 6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  kemudian masing-masing larutkan ke dalam sebagian air suling, selanjutnya campurkan kedua larutan tersebut dan tambahkan air suling sampai 1.000 ml. Atur pH sehingga menjadi  $6,0 \pm 0,1$  dan sterilkan dengan autoklaf pada temperatur  $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , dengan tekanan 15 psi atau  $1,03421 \times 10^5$  pascal selama 15 menit.

**A.2 Dapar fosfat nomor 2**

Timbang 6,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dan 18,9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  kemudian masing-masing larutkan ke dalam sebagian air suling, selanjutnya campurkan kedua larutan tersebut dan tambahkan air suling sampai 1.000 ml. Atur pH sehingga menjadi  $7,0 \pm 0,1$  dan sterilkan dengan autoklaf pada temperatur  $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , dengan tekanan 15 Psi atau  $1,03421 \times 10^5$  Pascal selama 15 menit.

**A.3 Dapar fosfat nomor 3**

Timbang 3,5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dan 3 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  kemudian masing-masing larutkan ke dalam sebagian air suling, selanjutnya campurkan kedua larutan tersebut dan tambahkan air suling sampai 1.000 ml. Atur pH sehingga menjadi  $6,0 \pm 0,1$  dan sterilkan dengan autoklaf pada temperatur  $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , dengan tekanan 15 Psi atau  $1,03421 \times 10^5$  Pascal selama 15 menit.

**A.4 Larutan metanol 10 %**

Pipet 10 ml metanol ditambah air suling hingga volume 100 ml.

**Lampiran B**  
(normatif)  
**Pembuatan media**

**B.1 Media biakan *Bacillus.stearothermophilus***

**B.1.1 Pembuatan media**

**B.1.1.1** Timbang bahan-bahan sebagai berikut:

- *peptone* sebanyak 5,0 g;
- *yeast extract* sebanyak 12,0 g;
- *bacto agar* sebanyak 15 g sampai dengan 18 g;
- *dextrose* sebanyak 1,0 g;
- air suling s/d 1.000 ml.

**B.1.1.2** *Peptone*, *dextrose* dan *yeast extract* larutkan dalam sebagian air suling kemudian tambahkan *bacto agar*, selanjutnya tambahkan air suling sehingga volume keseluruhan menjadi 1.000 ml.

**B.1.1.3** Sesuaikan pada pH  $5,7 \pm 0,1$  dan didihkan sampai *bacto agar* tersebut larut.

**B.1.1.4** Sterilkan dalam autoklaf pada temperatur  $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , tekanan 15 Psi atau  $1,03421 \times 10^5$  Pascal selama 15 menit.

**B.1.2 Pembuatan larutan *dextrose* 2 %**

**B.1.2.1** Timbang 2 g *dextrose*, kemudian larutkan ke dalam air suling sampai 100 ml.

**B.1.2.2** Sterilkan dalam autoklaf pada temperatur  $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , tekanan 15 Psi atau  $1,03421 \times 10^5$  Pascal selama 15 menit.

**B.2 Media biakan *Bacillus subtilis***

**B.2.1** Timbang bahan-bahan sebagai berikut:

- *peptone* sebanyak 5,0 g;
- *beef extract* sebanyak 3,0 g;
- *bacto agar* sebanyak 15 g sampai dengan 18 g;
- air suling s/d 1.000 ml.

**B.2.2** *Peptone* dan *beef extract* larutkan dalam sebagian air suling kemudian tambahkan *bacto agar*, selanjutnya tambahkan air suling sehingga volume keseluruhan menjadi 1.000 ml.

**B.2.3** Sesuaikan pada pH  $8,5 \pm 0,1$  dan didihkan sampai *bacto agar* tersebut larut.

**B.2.4** Sterilkan dalam autoklaf pada temperatur  $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , tekanan 15 Psi atau  $1,03421 \times 10^5$  Pascal selama 15 menit.

**B.3 Media biakan *Bacillus cereus***

**B.3.1** Timbang bahan-bahan sebagai berikut:

- *peptone* sebanyak 6,0 g;
- *beef extract* sebanyak 1,5 g;
- *yeast extract* sebanyak 3,0 g;
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sebanyak 1,35 g;
- *bacto agar* sebanyak 15 g sampai dengan 18 g;
- air suling s/d 1.000 ml.

**B.3.2** *Peptone*, *beef extract*, *yeast extract* dan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  larutkan dalam sebagian air suling kemudian tambahkan *bacto agar*, selanjutnya tambahkan air suling sehingga volume keseluruhan menjadi 1.000 ml.

**B.3.3** Sesuaikan pada pH  $5.7 \pm 0.1$  dan didihkan sampai *bacto agar* tersebut larut.

**B.3.4** Sterilkan dalam autoklaf pada temperatur  $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , tekanan 15 Psi atau  $1,03421 \times 10^5$  Pascal selama 15 menit.

**B.4 Media biakan *Micrococcus luteus***

**B.4.1** Timbang bahan-bahan sebagai berikut:

- *peptone* sebanyak 6,0 g;
- *beef extract* sebanyak 1,5 g;
- *yeast extract* sebanyak 3,0 g;
- *glucose* sebanyak 1,0 g;
- *bacto agar* sebanyak 15 g sampai dengan 18 g;
- air suling s/d 1.000 ml.

**B.4.2** *Peptone*, *beef extract*, *yeast extract* dan *glucose* larutkan dalam sebagian air suling, kemudian tambahkan *bacto agar*, selanjutnya tambahkan air suling sehingga volume keseluruhan menjadi 1.000 ml.

**B.4.3** Sesuaikan pada pH  $8.5 \pm 0.1$  dan didihkan sampai *bacto agar* tersebut larut.

**B.4.4** Sterilkan dalam autoklaf pada temperatur  $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , tekanan 15 Psi atau  $1,03421 \times 10^5$  Pascal selama 15 menit.

**B.5 Media biakan *Spora* (Media nomor 1)**

**B.5.1** Timbang bahan-bahan sebagai berikut:

- *peptone* sebanyak 10,0 g;
- *beef extract* sebanyak 5,0 g;
- NaCl sebanyak 2,5 g;
- *bacto agar* sebanyak 20 g sampai dengan 25 g;
- air suling s/d 1.000 ml.

**B.5.2** *Peptone*, *beef extract*, NaCl dilarutkan dalam sebagian air suling, kemudian tambahkan *bacto agar*, selanjutnya tambahkan air suling sehingga volume keseluruhan menjadi 1.000 ml.

**B.5.3** Sesuaikan pada pH  $6,5 \pm 0,1$  dan didihkan sampai *bacto agar* tersebut larut.

**B.5.4** Sterilkan dalam autoklaf pada temperatur  $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , tekanan 15 Psi atau  $1,03421 \times 10^5$  Pascal selama 15 menit.





**Lampiran C**  
(normatif)  
**Pembuatan spora**

**C.1 Cara Kerja Pembuatan Spora *Bacillus cereus* ATCC 11778**

**C.1.1** Buat Media Agar miring Nomor 1 dalam botol media (*roux's bottle*) sebanyak 100 ml.

**C.1.2** Inokulasikan kuman *B. cereus* ATCC 11778 ke dalam botol-botol yang telah berisi media Agar Nomor 1 tersebut dengan cara melakukan goresan dengan menggunakan ose, inkubasikan selama 1 minggu dalam inkubator dengan temperatur 30 °C, amati pertumbuhan setiap hari.

**C.1.3** Biakan yang telah membentuk spora dipanen dengan cara mengerok permukaan media yang ditumbuhi kuman dengan kawat steril dan dimasukkan dalam larutan NaCl fisiologis steril 20 ml sebanyak 4 tabung (tergantung pada banyaknya hasil panen spora).

**C.1.4** Panaskan dalam penangas air pada temperatur 65 °C selama 30 menit.

**C.1.5** Sentrifuse dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit dan buang supernatannya (lapisan atas). Kemudian tambahkan larutan NaCl fisiologis steril secukupnya, selanjutnya dikocok. Masukkan dalam refrigerator dengan kisaran temperatur 4 °C sampai dengan 8 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam.

**C.1.6** Panaskan kembali larutan tersebut dalam penangas air pada temperatur 65 °C selama 30 menit.

**C.1.7** Sentrifuse kembali dengan kecepatan 1.000 rpm selama 5 menit dan ambil supernatannya. Hasilnya disimpan sebagai spora dalam *refrigerator* dengan temperatur maksimal 10 °C

**C.2 Cara Kerja Pembuatan Spora *Bacillus subtilis* ATCC 6633**

**C.2.1** Buat Media Agar miring Nomor 1 dalam botol media sebanyak 100 ml.

**C.2.2** Inokulasikan kuman *B. subtilis* ATCC 6633 ke dalam botol-botol yang telah berisi media Agar Nomor 1 tersebut dengan cara melakukan goresan dengan menggunakan ose, inkubasikan selama 1 minggu dalam inkubator dengan temperatur 36 °C, amati pertumbuhan setiap hari.

**C.2.3** Biakan yang telah membentuk spora dipanen dengan cara mengerok permukaan media yang ditumbuhi kuman dengan kawat steril dan dimasukkan dalam larutan NaCl fisiologis steril 20 ml sebanyak 4 tabung (tergantung pada banyaknya hasil panen spora).

**C.2.4** Panaskan larutan tersebut dalam penangas air pada temperatur 65 °C selama 30 menit.

**C.2.5** Sentrifuse dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit dan buang supernatannya (lapisan atas). Kemudian tambahkan larutan NaCl fisiologis steril secukupnya, selanjutnya dikocok. Masukkan dalam *refrigerator* dengan temperatur 4 °C sampai dengan 8 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam.

**C.2.6** Panaskan kembali larutan tersebut dalam penangas air pada temperatur 65 °C selama 30 menit.

**C.2.7** Sentrifuse kembali dengan kecepatan 1.000 rpm selama 5 menit dan ambil supernatannya (lapisan atas). Hasilnya disimpan dalam *refrigerator* sebagai spora.

### **C.3 Pembuatan Spora *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953**

**C.3.1** Buat Media Agar miring Nomor 1 dalam botol media sebanyak 100 ml yang telah ditambahkan 2 % *dextrose* sebanyak 2,5 % ke dalam masing-masing botol.

**C.3.2** Inokulasikan kuman *B. Stearothermophilus* ATCC 7953 ke dalam botol-botol yang telah berisi media Agar Nomor 1 tersebut dengan cara melakukan goresan dengan menggunakan ose, inkubasikan selama 1 minggu dalam inkubator dengan temperatur 55 °C, amati pertumbuhan setiap hari.

**C.3.3** Biakan yang telah membentuk spora dipanen dengan cara mengerok permukaan media yang ditumbuhi kuman dengan kawat steril dan dimasukkan dalam larutan NaCl fisiologis steril 20 ml sebanyak 4 tabung (tergantung pada banyaknya hasil panen spora).

**C.3.4** Panaskan larutan tersebut dalam penangas air pada temperatur 65 °C selama 30 menit.

**C.3.5** Sentrifuse dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit dan buang supernatannya. Kemudian tambahkan larutan NaCl fisiologis steril secukupnya, selanjutnya dikocok. Masukkan dalam *refrigerator* dengan temperatur 4 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam.

**C.3.6** Panaskan kembali larutan tersebut dalam penangas air pada temperatur 65 °C selama 30 menit.

**C.3.7** Sentrifuse kembali dengan kecepatan 1.000 rpm selama 5 menit dan ambil supernatannya. Hasilnya disimpan dalam *refrigerator* sebagai suspensi spora.

### **C.4 Pembuatan Vegetatif Kuman *Kocuria rizophilla* (*Micrococcus luteus*) ATCC 9341**

**C.4.1** Buat Media Agar miring Nomor 1 dalam tabung reaksi steril sebanyak 10 ml.

**C.4.2** Inokulasikan kuman *Kocuria rizophilla* ATCC 9341 dalam tabung reaksi yang telah berisi media Agar Nomor 1 tersebut dengan cara melakukan goresan dengan menggunakan ose, inkubasikan selama 18 jam sampai dengan 24 jam dalam inkubator dengan temperatur 36 °C.

**C.4.3** Ambil 1 ose kuman biakan *Kocuria rizophilla* ATCC 9341 ke dalam 10 ml Media HIB.

**C.4.4** Inkubasikan selama 18 jam sampai dengan 24 jam dalam inkubator dengan temperatur 36 °C.

**C.4.5** Kuman siap digunakan untuk pengujian harus selalu dalam keadaan baru (segar).

## C.5 Menghitung Spora

Spora dapat dihitung dengan menggunakan metode pengujian TPC.

## C.6 Kalibrasi Vegetatif Kuman dan Spora

**C.6.1** Kultur media agar disiapkan untuk masing-masing kelompok antibiotika.

**C.6.2** Buat variasi prosentase vegetatif kuman dan spora (1 % sampai dengan 10 % volume media), masing-masing variasi tersebut dicampurkan dengan media yang telah disiapkan.

**C.6.3** Tuang media yang telah dicampur vegetatif kuman/spora ke dalam cawan petri.

**C.6.4** Kertas cakram diletakkan diatas permukaan kultur media.

**C.6.5** Teteskan baku pembanding sebanyak 75  $\mu$ l untuk kertas cakram yang berdiameter 8 mm atau 100  $\mu$ l untuk kertas cakram yang berdiameter 10 mm.

**C.6.6** Sebelum diinkubasi, kultur media dibiarkan pada temperatur kamar selama 30 menit sampai dengan 60 menit.

**C.6.7** Inkubasikan di dalam inkubator, untuk oksitetrasiklin pada temperatur 30 °C, kanamisin dan tilosin pada temperatur 36 °C dan penisilin pada temperatur 55 °C, masing-masing selama 16 jam sampai dengan 18 jam.

**C.6.8** Hasil uji ditentukan dengan mengukur diameter daerah hambatan dengan menggunakan alat yang sesuai.

**C.6.9** Jumlah vegetatif kuman atau spora yang digunakan adalah yang memberikan daerah hambatan dengan diameter 20 mm  $\pm$  1 mm.

## Bibliografi

[AOAC]. 2000. *Official Methods of analysis*. Chp. 33. pp 33-42.

White A. Clarence, Dey B.P., Reamer H. Richard and Thaker H. Nitin. 1998. *Bioassay for The Detection, Identification and Quantitation of Antimicrobial Residues in Meat and Poultry Tissue*. USDA/FSIS *Microbiology Laboratory Guidebook* 3<sup>rd</sup> Ed.

USDA/FSIS. 2004. *Laboratory Guidebook*, revised MLG 34.01.

Gaudin V., Maris P., Fuselier R., Ribouchon JL., Caudien N., Rault A. 2004. *Validation of a mrobiological methode: the STAR protocol, a five-plate test, for the screening of antibiotic residues in milk*. *Food Additive Contaminant* 21(5):422-33.

*Division of Microbiology. U.S. Food and Drug Administration*.1998. *Bacteriological Analitical Manual [BAM]*. Gaithersburg, USA : AOAC Internasional.











**BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN**  
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4  
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270  
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : [bsn@bsn.go.id](mailto:bsn@bsn.go.id)