

# RSNI3

Rancangan Standar Nasional Indonesia 3

---

## Metode uji tapis (*screening test*) residu antibiotik menggunakan *bioassay* pada daging, jeroan, telur, dan susu

Apabila diketahui RSNI ini mengandung hak kekayaan intelektual, pihak yang berkepentingan diminta untuk memberikan informasi beserta data pendukung (pemilik hak kekayaan intelektual, bagian yang terkena hak kekayaan intelektual, alamat pemberi hak kekayaan intelektual, dan lain-lain).



## Daftar Isi

Daftar Isi .....	i
Prakata .....	ii
Pendahuluan .....	iii
1 Ruang lingkup .....	1
2 Acuan normatif .....	1
3 Istilah dan definisi .....	1
4 Singkatan .....	2
5 Prinsip pengujian .....	2
6 Mikroorganisme dan media .....	2
7 Bahan .....	3
8 Peralatan .....	3
9 Prosedur .....	4
Lampiran A (normatif) Pembuatan larutan dapar .....	16
Lampiran B (normatif) Pembuatan media agar .....	17
Lampiran C (normatif) Pembuatan spora dan sel vegetatif .....	19
Lampiran D (normatif) Pembuatan larutan trimetoprim .....	22
Bibliografi .....	23
Tabel 1 – Pengenceran dan konsentrasi larutan standar kerja natrium penisilin untuk golongan beta laktam .....	6
Tabel 2 – Pengenceran dan konsentrasi larutan standar kerja oksitetrasiklin hidroklorida untuk golongan tetrasiklin .....	6
Tabel 3 – Pengenceran dan konsentrasi larutan standar kerja kanamisin sulfat untuk golongan aminoglikosida .....	7
Tabel 4 – Pengenceran dan konsentrasi larutan standar kerja tilosin tartrat untuk golongan makrolida .....	7
Tabel 5 – Pengenceran dan konsentrasi larutan standar kerja sulfadiazin untuk golongan sulfonamida .....	8
Tabel 6 – Pengenceran dan konsentrasi larutan standar kerja enrofloksasin untuk golongan kuinolon .....	8
10 Pengendalian mutu pengujian .....	13
Tabel 7 – Larutan kurva standar kerja natrium penisilin untuk golongan beta laktam .....	13
Tabel 8 – Larutan kurva standar kerja oksitetrasiklin hidroklorida untuk golongan tetrasiklin .....	13
Tabel 9 – Larutan kurva standar kerja kanamisin tartrat untuk golongan aminoglikosida, tilosin tartrat untuk golongan makrolida, dan sulfadiazin untuk golongan sulfonamida .....	14
Tabel 10 – Larutan kurva standar kerja enrofloksasin untuk golongan kuinolon .....	14

## Prakata

SNI 7424:2024 *Metode uji tapis (screening test) residu antibiotik menggunakan bioassay pada daging, jeroan, telur, dan susu* yang dalam bahasa Inggris berjudul *Screening test of antibiotic residues in meat, offal, egg, and milk using bioassay* merupakan standar revisi dari SNI 7424:2008, *Metode uji tapis (screening test) residu antibiotika pada daging, telur, dan susu secara bioassay*. Standar ini disusun dengan jalur pengembangan sendiri dan ditetapkan oleh BSN Tahun 2024.

Perubahan dalam Standar ini meliputi:

1. Judul SNI;
2. Penambahan ruang lingkup terkait dengan matriks contoh uji dan golongan antibiotiknya; dan
3. Penyempurnaan metode uji.

Standar ini disusun oleh Komite Teknis 65-20 Kesehatan Masyarakat Veteriner. Standar ini telah dibahas dalam rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 29 Juli 2024 di Bogor secara *hybrid* yang dihadiri oleh para pemangku kepentingan (*stakeholders*) terkait, yaitu perwakilan dari pemerintah, pelaku usaha, konsumen, dan pakar.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal ----- sampai dengan ----- dan disetujui menjadi RASNI.

Untuk menghindari kesalahan dalam penggunaan Standar ini, disarankan bagi pengguna standar untuk menggunakan dokumen SNI yang dicetak dengan tinta berwarna.

Perlu diperhatikan bahwa kemungkinan beberapa unsur dari Standar ini dapat berupa hak kekayaan intelektual (HAKI). Namun selama proses perumusan SNI, Badan Standardisasi Nasional telah memperhatikan penyelesaian terhadap kemungkinan adanya HAKI terkait substansi SNI. Apabila setelah penetapan SNI masih terdapat permasalahan terkait HAKI, Badan Standardisasi Nasional tidak bertanggung jawab mengenai bukti, validitas, dan ruang lingkup dari HAKI tersebut.

## Pendahuluan

Keamanan pangan asal hewan mempunyai peranan penting dalam memenuhi protein hewani, karena mengandung asam amino esensial yang dibutuhkan manusia. Deklarasi WHO tahun 2003 menyatakan bahwa setiap manusia berhak mendapatkan pangan yang aman dan layak. Hal tersebut selaras dengan Undang-Undang Nomor 41 Tahun 2014 tentang Perubahan Atas Undang-Undang Nomor 18 Tahun 2009 tentang Peternakan dan Kesehatan Hewan dalam Pasal 58 ayat (1) dinyatakan bahwa dalam rangka penjaminan produk hewan yang aman, sehat, utuh, dan halal (ASUH), pemerintah dan pemerintah daerah berkewajiban melakukan pengawasan, pemeriksaan, pengujian, standardisasi, sertifikasi, dan registrasi produk hewan. Oleh karena itu, untuk mendapatkan pangan asal hewan yang aman dan layak untuk dikonsumsi perlu dilakukan pengawasan berbasis pengujian laboratorium terhadap residu antibiotik dengan menggunakan metode uji yang terstandarisasi. Metode ini mengacu pada sejumlah dokumen dari organisasi internasional, peraturan perundangan yang berlaku, dan pustaka lain yang telah dipublikasikan.



## Metode uji tapis (*screening test*) residu antibiotik menggunakan *bioassay* pada daging, jeroan, telur, dan susu

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan metode uji tapis (*screening test*) residu antibiotik menggunakan *bioassay* pada daging, jeroan, telur, dan susu. Telur hanya mencakup telur mentah yang berasal dari unggas untuk konsumsi. Susu mencakup susu mentah (*raw milk*), susu cair *plain*, dan susu bubuk.

Standar ini berlaku untuk pengujian residu antibiotik golongan beta laktam, tetrasiklin, aminoglikosida, makrolida, sulfonamida, dan kuinolon.

### 2 Acuan normatif

Dokumen acuan berikut sangat diperlukan untuk penerapan Standar ini. Untuk acuan bertanggal, hanya edisi yang disebutkan yang berlaku. Untuk acuan tidak bertanggal, berlaku edisi terakhir dari dokumen acuan tersebut (termasuk seluruh perubahan/amendemennya).

SNI ISO 4833-1, *Mikrobiologi rantai pangan – Metode horizontal untuk enumerasi mikroorganisme – Bagian 1: Penghitungan koloni pada suhu 30 °C dengan teknik cawan tuang*

### 3 Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan dokumen ini, istilah dan definisi berikut berlaku.

#### 3.1

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

suatu cara pengujian yang dilakukan untuk mendeteksi kandungan residu antibiotik secara kualitatif sesuai dengan batas deteksi tertentu pada daging, jeroan, telur, dan susu

#### 3.2

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

metode pengujian menggunakan mikroorganisme untuk mendeteksi residu antibiotik

#### 3.3

##### **residu antibiotik**

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

#### 3.4

##### **daging**

bagian otot skeletal dari karkas hewan ternak yang aman, layak, dan lazim dikonsumsi oleh manusia

**CATATAN** Daging dapat berupa daging hangat (*hot meat*), daging segar dingin (*chilled fresh meat*), atau daging beku (*frozen meat*).

### 3.5

#### **jeroan**

organ dari hewan ternak yang aman, layak, dan lazim dikonsumsi oleh manusia

**CATATAN** Jeroan dapat berupa jeroan hangat (*hot offal*), jeroan segar dingin (*chilled fresh offal*), atau jeroan beku (*frozen offal*).

### 3.6

#### **susu mentah (*raw milk*)**

cairan yang berasal dari ambung hewan ternak sehat dan bersih, yang diperoleh dengan cara pemerahan yang benar, yang kandungan alaminya tidak dikurangi atau ditambah sesuatu apapun dan belum mendapat perlakuan apapun kecuali pendinginan

### 3.7

#### **susu cair *plain***

produk susu cair yang diperoleh dari susu mentah atau susu rekonstitusi atau susu rekombinasi tanpa bahan tambahan pangan yang mempunyai sifat antimikrob yang telah mengalami proses pasteurisasi atau sterilisasi

### 3.8

#### **susu bubuk**

produk susu yang diperoleh melalui pengeringan susu tanpa bahan tambahan pangan yang mempunyai sifat antimikrob

## 4 Singkatan

Psi = *pressure square inch*;  
rpm = *rotation per minute*;  
ATCC = *American Type Culture Collection*;  
IU = *International Unit*; dan  
HIB = *Heart Infusion Broth*.

## 5 Prinsip pengujian

Residu antibiotik akan menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada media agar. Penghambatan dapat dilihat dengan adanya zona hambatan di sekitar kertas cakram.

## 6 Mikroorganisme dan media

### 6.1 Mikroorganisme

- Spora *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 untuk golongan beta laktam;
- Spora *Bacillus cereus* ATCC 11778 untuk golongan tetrasiklin;
- Spora *Bacillus subtilis* subspecies *spizizenii* ATCC 6633 untuk golongan aminoglikosida dan golongan sulfonamida;
- Sel vegetatif *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 untuk golongan makrolida; dan
- Sel vegetatif *Escherichia coli* ATCC 11303 untuk golongan kuinolon.

### 6.2 Media

- Media agar *Bacillus stearothermophilus*: *yeast extract, tryptone, bacto agar, dextrose*;
- Media agar *Bacillus cereus*: *yeast extract, beef extract, peptone, bacto agar, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>*;



- c. Media agar *Bacillus subtilis* subspecies *spizizenii*: *beef extract*, *peptone*, *bacto agar*;
- d. Media agar *Kocuria rhizophila*: *yeast extract*, *beef extract*, *peptone*, *bacto agar*, *glucose*;
- e. Media agar *Escherichia coli*: *yeast extract*, *beef extract*, *peptone*, *bacto agar*, *glucose*; dan
- f. Media cair untuk sel vegetatif (*Kocuria rhizophila* dan *Escherichia coli*): HIB.

## 7 Bahan

### 7.1 Standar

- a. Standar natrium penisilin untuk golongan beta laktam;
- b. Standar oksitetrasiklin hidroklorida untuk golongan tetrasiklin;
- c. Standar kanamisin sulfat untuk golongan aminoglikosida;
- d. Standar tilosin-tartrat untuk golongan makrolida;
- e. Standar sulfadiazin untuk golongan sulfonamida; dan
- f. Standar enrofloksasin untuk golongan kuinolon.

### 7.2 Bahan kimia/dapar

- a. Kalium dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ );
- b. Dinatrium hidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ );
- c. Asam fosfat ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ );
- d. Natrium hidroksida ( $\text{NaOH}$ );
- e. Dikalium hidrogen fosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ );
- f. Asam klorida ( $\text{HCl}$ );
- g. Natrium klorida ( $\text{NaCl}$ );
- h. Standar trimetoprim;
- i. Alkohol 70%;
- j. Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ );
- k. Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ); dan
- l. Air distilasi atau akuabides atau air dengan *grade* yang setara atau lebih (contoh: air demineralisasi, *reverse osmosis water*).

### 7.3 Bahan lainnya

Kertas cakram (*paper disc*) yang steril tebal (*thick*) yang mampu menyerap larutan minimum 75  $\mu\text{l}$  dengan diameter 8 mm atau 10 mm.

## 8 Peralatan

### 8.1 Bahan gelas

- a. Cawan petri ukuran 100 mm x 12 mm;
- b. Tabung reaksi ukuran 7 ml, 20 ml, 50 ml;
- c. Tabung sentrifus ukuran 50 ml;
- d. Labu ukur 50 ml, 100 ml;
- e. Gelas ukur 100 ml, 500 ml, 1.000 ml;
- f. Gelas piala;
- g. Erlenmeyer 250 ml, 500 ml;
- h. Botol timbang ukuran 20 ml;
- i. Pipet volumetrik ukuran 1 ml, 2 ml, 3 ml, 5 ml, 10 ml, 18 ml;
- j. Pipet graduasi ukuran 1 ml, 5 ml, 7 ml, 10 ml, 20 ml;
- k. *Roux's bottle*;

- l. Botol media; dan
- m. Tabung pengenceran minimum 25 ml.

**CATATAN** Semua bahan gelas yang digunakan dalam pengujian ini dalam keadaan steril, kecuali pipet volumetrik.

## **8.2 Alat**

- a. Sentrifus;
- b. Penangas air;
- c. *Clean bench* atau *laminar air flow* atau *biosafety cabinet* (BSC);
- d. *Homogenizer* atau *ultrasonic homogenizer*;
- e. Autoklaf;
- f. Lemari pendingin (*refrigerator*);
- g. *Freezer*;
- h. Timbangan analitik;
- i. Inkubator;
- j. Magnet pengaduk (*spin bar*);
- k. pH Meter;
- l. *Tube shaker*;
- m. *Bulb*;
- n. Rak tabung;
- o. *Magnetic stirrer*;
- p. Pipet mikro 20 µl s.d. 1.000 µl;
- q. Kaliper atau jangka sorong atau alat lain yang sesuai untuk mengukur diameter zona hambatan;
- r. *Burner*;
- s. *Loop needle (öse)*;
- t. *Hot plate*;
- u. Pinset;
- v. Gunting; dan
- w. Kapas steril.

## **9 Prosedur**

### **9.1 Larutan standar**

#### **9.1.1 Larutan stok standar**

- a. Sebelum membuat larutan standar antibiotik, terlebih dahulu lakukan pengecekan potensi standar yang tertera pada label kemasan standar tersebut. Timbang standar tersebut dalam botol timbang.
- b. Buat larutan stok standar dengan konsentrasi 1.000 µg/ml atau 1.000 IU/ml dengan volume minimum 4 ml.
- c. Penimbangan standar dilakukan di ruang timbang yang terkendali pada suhu  $\leq 25$  °C dan kelembapan  $\leq 50\%$ .

**CONTOH** Apabila standar antibiotik mempunyai potensi 98%, maka untuk membuat larutan standar 1.000 µg/ml, diperlukan 4,9 mg (5 mg x 98%) standar tersebut dalam 4,9 ml masing-masing pelarut.

## 9.1.2 Pembuatan larutan stok standar

### 9.1.2.1 Standar natrium penisilin

Larutkan sejumlah standar natrium penisilin dalam larutan dapar fosfat Nomor 1 (lihat Lampiran A.1) sehingga diperoleh konsentrasi 1.000 IU/ml.

### 9.1.2.2 Standar oksitetrasiklin hidroklorida

Larutkan sejumlah standar oksitetrasiklin hidroklorida dalam air distilasi hingga diperoleh konsentrasi 1.000 µg/ml.

### 9.1.2.3 Standar kanamisin sulfat

Larutkan sejumlah standar kanamisin sulfat dalam larutan dapar fosfat Nomor 3 (lihat Lampiran A.3) sehingga diperoleh konsentrasi 1.000 µg/ml.

### 9.1.2.4 Standar tilosin tartrat

Larutkan sejumlah standar tilosin tartrat dalam 10% metanol dalam air distilasi sehingga diperoleh konsentrasi 1.000 µg/ml.

### 9.1.2.5 Standar sulfadiazin

Larutkan sejumlah standar sulfadiazin dalam 10% metanol dalam air distilasi sehingga diperoleh konsentrasi 1.000 µg/ml.

### 9.1.2.6 Standar enrofloksasin

Larutkan sejumlah standar enrofloksasin dalam 1 N larutan NaOH sehingga diperoleh konsentrasi 1.000 µg/ml.

**CATATAN** Simpan semua larutan stok standar di dalam *freezer* pada suhu minimum  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  paling lama 1 bulan. Sebelum digunakan, cairkan (*thawing*) larutan stok standar dengan cara diletakkan dalam *refrigerator*.

## 9.1.3 Pembuatan larutan standar kerja

### 9.1.3.1 Natrium penisilin untuk golongan beta laktam

- Pipet 2 ml larutan stok standar natrium penisilin ke dalam tabung pengencer;
- Encerkan hingga 20 ml dengan dapar fosfat Nomor 2 (lihat Lampiran A.2) sehingga diperoleh larutan standar kerja 100 IU/ml, homogenkan dengan *tube shaker*;
- Lakukan pengenceran serial hingga diperoleh konsentrasi 0,01 IU/ml; dan
- Larutan standar kerja mengacu pada Tabel 1.

**CATATAN** Semua larutan standar kerja dibuat pada saat akan dipergunakan untuk pengujian dan tidak digunakan untuk pengujian berikutnya.

**Tabel 1 – Pengenceran dan konsentrasi larutan standar kerja natrium penisilin untuk golongan beta laktam**

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*)

**CATATAN** \*) Konsentrasi yang digunakan sebagai larutan standar kerja.

**9.1.3.2 Oksitetrasiklin hidroklorida untuk golongan tetrasiklin**

- Pipet 2 ml larutan stok standar oksitetrasiklin hidroklorida ke dalam tabung pengencer;
- Encerkan hingga 20 ml dengan dapar fosfat Nomor 2 (lihat Lampiran A.2) sehingga diperoleh larutan standar kerja 100 µg/ml, homogenkan dengan *tube shaker*;
- Lakukan pengenceran serial hingga diperoleh konsentrasi 0,5 µg/ml; dan
- Larutan standar kerja mengacu pada Tabel 2.

**CATATAN** semua larutan standar kerja dibuat pada saat akan dipergunakan untuk pengujian dan tidak digunakan untuk pengujian berikutnya

**Tabel 2 – Pengenceran dan konsentrasi larutan standar kerja oksitetrasiklin hidroklorida untuk golongan tetrasiklin**

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
1	5	5	0,5*)

**CATATAN** \*) Konsentrasi yang digunakan sebagai larutan standar kerja

**9.1.3.3 Kanamisin sulfat untuk golongan aminoglikosida**

- Pipet 2 ml larutan stok standar kanamisin sulfat ke dalam tabung pengencer;
- Encerkan hingga 20 ml dengan dapar fosfat Nomor 2 (lihat Lampiran A.2) sehingga diperoleh larutan standar kerja 100 µg/ml, homogenkan dengan *tube shaker*;
- Lakukan pengenceran serial hingga diperoleh konsentrasi 1,0 µg/ml; dan
- Larutan standar kerja mengacu pada Tabel 3.

**CATATAN** Semua larutan standar kerja dibuat pada saat akan dipergunakan untuk pengujian dan tidak digunakan untuk pengujian berikutnya.

**Tabel 3 – Pengenceran dan konsentrasi larutan standar kerja kanamisin sulfat untuk golongan aminoglikosida**

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*)

**CATATAN** \*) Konsentrasi yang digunakan sebagai larutan standar kerja.

#### 9.1.3.4 Tilosin tartrat untuk golongan makrolida

- Pipet 2 ml larutan stok standar tilosin tartrat ke dalam tabung pengencer;
- Encerkan hingga 20 ml dengan dapar fosfat Nomor 2 (lihat Lampiran A.2) sehingga diperoleh larutan standar kerja 100 µg/ml, homogenkan dengan *tube shaker*;
- Lakukan pengenceran serial hingga diperoleh konsentrasi 1,0 µg/ml; dan
- Larutan standar kerja mengacu pada Tabel 4.

**CATATAN** Semua larutan standar kerja dibuat pada saat akan dipergunakan untuk pengujian dan tidak digunakan untuk pengujian berikutnya.

**Tabel 4 – Pengenceran dan konsentrasi larutan standar kerja tilosin tartrat untuk golongan makrolida**

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*)

**CATATAN** \*) Konsentrasi yang digunakan sebagai larutan standar kerja.

#### 9.1.3.5 Sulfadiazin untuk golongan sulfonamida

- Pipet 2 ml larutan stok standar sulfadiazin ke dalam tabung pengencer;
- Encerkan hingga 20 ml dengan air distilasi steril sehingga diperoleh larutan standar kerja 100 µg/ml, homogenkan dengan *tube shaker*;
- Lakukan pengenceran serial hingga diperoleh konsentrasi 1,0 µg/ml; dan
- Larutan standar kerja mengacu pada Tabel 5.

**CATATAN** Semua larutan standar kerja dibuat pada saat akan dipergunakan untuk pengujian dan tidak digunakan untuk pengujian berikutnya.

**Tabel 5 – Pengenceran dan konsentrasi larutan standar kerja sulfadiazin untuk golongan sulfonamida**

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*)

**CATATAN** \*) Konsentrasi yang digunakan sebagai larutan standar kerja.

### 9.1.3.6 Enrofloksasin untuk golongan kuinolon

- Pipet 2 ml larutan stok standar enrofloksasin ke dalam tabung pengencer;
- Encerkan hingga 20 ml dengan air distilasi steril sehingga diperoleh larutan standar kerja 100 µg/ml, homogenkan dengan *tube shaker*;
- Lakukan pengenceran serial hingga diperoleh konsentrasi 0,1 µg/ml; dan
- Larutan standar kerja mengacu pada Tabel 6.

**CATATAN** Semua larutan standar kerja dibuat pada saat akan dipergunakan untuk pengujian dan tidak digunakan untuk pengujian berikutnya.

**Tabel 6 – Pengenceran dan konsentrasi larutan standar kerja enrofloksasin untuk golongan kuinolon**

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
1	2	20	0,1*)

**CATATAN** \*) Konsentrasi yang digunakan sebagai larutan standar kerja.

## 9.2 Persiapan contoh uji

Persiapan contoh uji dapat dilakukan dengan metode langsung atau metode ekstraksi.

### 9.2.1 Metode langsung

#### 9.2.1.1 Penyiapan contoh daging dan/atau jeroan

- Buat sayatan pada daging dan/atau jeroan;
- Tempelkan kertas cakram pada bagian dalam sayatan selama beberapa menit hingga seluruh bagian kertas cakram menyerap contoh uji; dan
- Pindahkan kertas cakram pada cawan petri dan siap digunakan sebagai contoh uji.

#### 9.2.1.2 Penyiapan contoh telur

- Bersihkan permukaan cangkang telur menggunakan alkohol 70% dengan kapas steril dan biarkan hingga kering;

- b. Buat lubang pada bagian yang lancip untuk mengeluarkan putih telur (albumen) dengan hati-hati sehingga terpisah dengan kuning telur;
- c. Pindahkan kuning telur ke dalam gelas piala dan homogenkan; dan
- d. Celupkan kertas cakram selama beberapa menit ke dalam kuning telur hingga seluruh bagian kertas cakram menyerap contoh uji, dan siap digunakan sebagai contoh uji.

#### 9.2.1.3 Penyiapan contoh susu mentah (*raw milk*) dan susu cair *plain*

Contoh susu mentah (*raw milk*) dan susu cair *plain* langsung dapat digunakan sebagai larutan contoh uji.

### 9.2.2 Metode ekstraksi

#### 9.2.2.1 Penyiapan contoh daging dan/atau jeroan

- a. Timbang contoh daging dan/atau jeroan sebanyak 10 g;
- b. Potong kecil-kecil, tambahkan pelarut dapar fosfat Nomor 2 (lihat Lampiran A.2) sebanyak 20 ml, homogenkan menggunakan *homogenizer*;
- c. Sentrifus 3.000 rpm selama 10 menit; dan
- d. Ambil supernatan dan siap digunakan sebagai larutan contoh uji.

#### 9.2.2.2 Penyiapan contoh telur

- a. Bersihkan permukaan cangkang telur menggunakan alkohol 70% dengan kapas steril dan biarkan hingga kering;
- b. Buat lubang pada bagian lancip untuk mengeluarkan putih telur (albumen) dengan hati-hati sehingga terpisah dengan kuning telur;
- c. Pindahkan kuning telur ke dalam gelas piala;
- d. Timbang contoh kuning telur sebanyak 10 g, tambahkan pelarut dapar fosfat Nomor 2 (lihat Lampiran A.2) sebanyak 20 ml, homogenkan menggunakan *homogenizer*;
- e. Sentrifus 3.000 rpm selama 10 menit; dan
- f. Ambil supernatan dan siap digunakan sebagai larutan contoh uji.

#### 9.2.2.3 Penyiapan contoh susu bubuk

- a. Timbang contoh susu sebanyak 10 g;
- b. Tambahkan pelarut dapar fosfat Nomor 2 (lihat Lampiran A.2) sebanyak 20 ml, homogenkan menggunakan *tube shaker*;
- c. Sentrifus 3.000 rpm selama 10 menit; dan
- d. Ambil supernatan dan siap digunakan sebagai larutan contoh uji.

### 9.3 Pembuatan media kultur

Media kultur digunakan untuk pengujian dan pengendalian mutu pengujian.

Letakkan media agar yang telah dibuat dalam penangas air hingga suhu mencapai  $48\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Media agar yang tidak habis digunakan pada pengujian sebelumnya dapat disimpan maksimum 14 hari pada suhu  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$  s.d.  $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dan dapat digunakan untuk pengujian berikutnya.

**CATATAN** Cara pembuatan media agar dapat dilihat pada Lampiran B.

### 9.3.1 Pembuatan media kultur *Bacillus stearothermophilus* untuk golongan beta laktam

- a. Pipet 1 ml atau berdasarkan hasil verifikasi biakan mikroorganisme uji, dan campurkan ke dalam 100 ml media;
- b. Homogenkan dengan cara menggoyangkan botol media menggunakan tangan hingga merata;
- c. Tambahkan 2,5% larutan *dextrose* 2%, kemudian campurkan ke dalam 100 ml media, homogenkan dengan cara menggoyangkan botol media menggunakan tangan hingga merata;
- d. Pipet 8 ml media yang telah mengandung mikroorganisme uji ke dalam setiap cawan petri, gunakan minimum tiga cawan petri (triplo) dan tambahkan satu cawan petri untuk uji peneguhan; dan
- e. Tempatkan cawan petri yang berisi media kultur pada permukaan yang datar sampai media memadat.

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

### 9.3.2 Pembuatan media kultur *Bacillus cereus* untuk golongan tetrasiklin

- a. Pipet 1 ml atau berdasarkan hasil verifikasi biakan mikroorganisme uji, dan campurkan ke dalam 100 ml media;
- b. Homogenkan dengan cara menggoyangkan botol media menggunakan tangan hingga merata;
- c. Pipet 8 ml media yang telah mengandung mikroorganisme uji ke dalam setiap cawan petri, gunakan minimum tiga cawan petri (triplo); dan
- d. Tempatkan cawan petri yang berisi media kultur pada permukaan yang datar sampai media memadat.

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

### 9.3.3 Pembuatan media kultur *Bacillus subtilis* subspesies *spizizenii* untuk golongan aminoglikosida

- a. Pipet 1 ml atau berdasarkan hasil verifikasi biakan mikroorganisme uji, dan campurkan ke dalam 100 ml media;
- b. Homogenkan dengan cara menggoyangkan botol media menggunakan tangan hingga merata;
- c. Pipet 8 ml media yang telah mengandung mikroorganisme uji ke dalam setiap cawan petri, gunakan minimum tiga cawan petri (triplo); dan
- d. Tempatkan cawan petri yang berisi media kultur pada permukaan yang datar sampai media memadat.

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

### 9.3.4 Pembuatan media kultur sel vegetatif *Kocuria rhizophila* untuk golongan makrolida

- a. Pipet 1 ml atau berdasarkan hasil verifikasi biakan mikroorganisme uji, dan campurkan ke dalam 100 ml media;
- b. Homogenkan dengan cara menggoyangkan botol media menggunakan tangan hingga merata;



- c. Pipet 8 ml media yang telah mengandung mikroorganisme uji ke dalam setiap cawan petri, gunakan minimum tiga cawan petri (triplo); dan
- d. Tempatkan cawan petri yang berisi media kultur pada permukaan yang datar sampai media memadat.

#### 9.3.5 Pembuatan media kultur *Bacillus subtilis* subspecies *spizizenii* untuk golongan sulfonamida

- a. Pipet 1 ml atau berdasarkan hasil verifikasi biakan mikroorganisme uji, dan campurkan ke dalam 100 ml media;
- b. Homogenkan dengan cara menggoyangkan botol media menggunakan tangan hingga merata;
- c. Tambahkan 1 ml larutan trimetoprim 50 µg/ml (lihat Lampiran D), homogenkan dengan cara menggoyangkan botol media menggunakan tangan hingga merata;
- d. Pipet 8 ml media yang telah mengandung mikroorganisme uji ke dalam setiap cawan petri, gunakan minimum tiga cawan petri (triplo) dan tambahkan satu cawan petri untuk uji peneguhan; dan
- e. Tempatkan cawan petri yang berisi media kultur pada permukaan yang datar sampai media memadat.

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

#### 9.3.6 Pembuatan media kultur *Escherichia coli* untuk golongan kuinolon

- a. Pipet 1 ml atau berdasarkan hasil verifikasi biakan mikroorganisme uji, dan campurkan ke dalam 100 ml media;
- b. Homogenkan dengan cara menggoyangkan botol media menggunakan tangan hingga merata;
- c. Pipet 8 ml media yang telah mengandung mikroorganisme uji ke dalam setiap cawan petri, gunakan minimum tiga cawan petri (triplo); dan
- d. Tempatkan cawan petri yang berisi media kultur pada permukaan yang datar sampai media memadat.

### 9.4 Pelaksanaan pengujian

- a. Tempelkan kertas cakram yang sudah berisi contoh uji (metode langsung) atau kertas cakram yang telah ditetesi contoh uji (metode ekstraksi) sebanyak 75 µl (diameter 8 mm) atau 100 µl (diameter 10 mm) pada media kultur;
- b. Teteskan larutan standar pada kertas cakram kosong sebanyak 75 µl (diameter 8 mm) atau 100 µl (diameter 10 mm) sebagai kontrol positif dan larutan dapar fosfat Nomor 2 (lihat Lampiran A.2) sebagai kontrol negatif;
- c. Khusus untuk pengujian golongan beta laktam, teteskan sebanyak 20 µl enzim penisilinase pada kertas cakram contoh uji dan larutan standar pada satu cawan petri tambahan, dan untuk golongan sulfonamida, teteskan sebanyak 20 µl *para-aminobenzoic acid* (PABA) pada kertas cakram contoh uji dan larutan standar pada satu cawan petri tambahan;
- d. Tempatkan masing-masing cawan petri yang berisi media kultur, contoh uji, dan kontrol pada permukaan datar pada suhu ruang selama 30 menit; dan
- e. Inkubasikan dalam inkubator selama 16 jam s.d. 18 jam, untuk:
  - (1) golongan makrolida, aminoglikosida, sulfonamida, dan kuinolon pada suhu  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
  - (2) golongan tetrasiklin pada suhu  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; dan
  - (3) golongan beta laktam pada suhu  $55\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 9.5 Interpretasi hasil uji

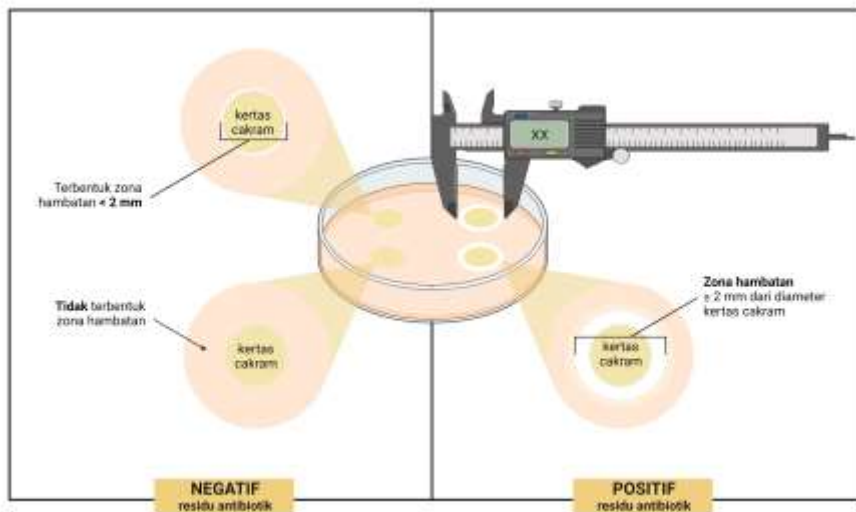
- Amati dan ukur diameter zona hambatan yang terdapat di sekeliling kertas cakram dengan menggunakan kaliper atau jangka sorong;
- Kontrol positif harus terdapat zona hambatan di sekeliling kertas cakram dengan diameter > 18 mm; dan
- Kontrol negatif harus tidak terdapat zona hambatan.

### 9.5.1 Pembacaan hasil uji positif

- Hasil uji positif ditunjukkan dengan adanya zona hambatan  $\geq 2$  mm dari diameter kertas cakram (lihat Gambar 1);
- Hasil uji positif untuk golongan beta laktam, selain memenuhi kriteria pada huruf a, juga ditunjukkan dengan tidak adanya zona hambatan pada cawan petri tambahan untuk peneguhan; dan
- Hasil uji positif untuk golongan sulfonamida, selain memenuhi kriteria pada huruf a, juga ditunjukkan dengan tidak adanya zona hambatan pada cawan petri tambahan untuk peneguhan.

### 9.5.2 Pembacaan hasil uji negatif

Hasil uji negatif ditunjukkan dengan tidak adanya zona hambatan atau adanya zona hambatan < 2 mm dari diameter kertas cakram (lihat Gambar 1).



Gambar 1 – Interpretasi hasil uji

## 10 Pengendalian mutu pengujian

### 10.1 Kurva standar

Kurva standar pada metode ini diperlukan dalam rangka pengendalian mutu pengujian.

Pembuatan kurva standar dilakukan:

- secara berkala minimum 6 bulan sekali; dan
- pada saat pergantian stok mikroorganisme.

### 10.2 Pembuatan kurva standar

- Siapkan larutan kurva standar kerja natrium penisilin untuk golongan beta laktam dengan variasi konsentrasi sesuai Tabel 7.

**Tabel 7 – Larutan kurva standar kerja natrium penisilin untuk golongan beta laktam**

Konsentrasi awal (IU/ml)	Volume yang diambil (ml)	Diencerkan sampai dengan (ml)	Konsentrasi akhir (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 <sup>*)</sup>
0,04	10	20	0,02 <sup>*)</sup>
0,02	10	20	0,01 <sup>*)</sup>
0,01	10	20	0,005 <sup>*)</sup>
0,005	10	20	0,0025 <sup>*)</sup>

**CATATAN** \*) Konsentrasi yang digunakan sebagai larutan kurva standar kerja.

- Siapkan larutan kurva standar kerja oksitetrasiklin hidroklorida untuk golongan tetrasiklin dengan variasi konsentrasi sesuai Tabel 8.

**Tabel 8 – Larutan kurva standar kerja oksitetrasiklin hidroklorida untuk golongan tetrasiklin**

Konsentrasi awal (µg/ml)	Volume yang diambil (ml)	Diencerkan sampai dengan (ml)	Konsentrasi akhir (µg/ml)
1.000	2	20	100
100	2	20	10
10	4	20	2 <sup>*)</sup>
2	10	20	1 <sup>*)</sup>
1	10	20	0,5 <sup>*)</sup>
0,5	10	20	0,25 <sup>*)</sup>
0,25	10	20	0,125 <sup>*)</sup>

**CATATAN** \*) Konsentrasi yang digunakan sebagai larutan kurva standar kerja.

- c. Siapkan larutan standar kerja kanamisin tartrat untuk golongan aminoglikosida, tilosin tartrat untuk golongan makrolida, dan sulfadiazin untuk golongan sulfonamida, dengan variasi konsentrasi sesuai Tabel 9.

**Tabel 9 – Larutan kurva standar kerja kanamisin tartrat untuk golongan aminoglikosida, tilosin tartrat untuk golongan makrolida, dan sulfadiazin untuk golongan sulfonamida**

Konsentrasi awal (µg/ml)	Volume yang diambil (ml)	Diencerkan sampai dengan (ml)	Konsentrasi akhir (µg/ml)
1.000	2	20	100
100	2	20	10
10	8	20	4 <sup>*)</sup>
4	10	20	2 <sup>*)</sup>
2	10	20	1 <sup>*)</sup>
1	10	20	0,5 <sup>*)</sup>
0,5	10	20	0,25 <sup>*)</sup>

**CATATAN** \*) Konsentrasi yang digunakan sebagai larutan kurva standar kerja.

- d. Siapkan larutan kurva standar kerja enrofloksasin untuk golongan kuinolon dengan variasi konsentrasi sesuai Tabel 10.

**Tabel 10 – Larutan kurva standar kerja enrofloksasin untuk golongan kuinolon**

Konsentrasi awal (µg/ml)	Volume yang diambil (ml)	Diencerkan sampai dengan (ml)	Konsentrasi akhir (µg/ml)
1.000	2	20	100
100	2	20	10
10	2	20	1
1	8	20	0,4 <sup>*)</sup>
0,4	10	20	0,2 <sup>*)</sup>
0,2	10	20	0,1 <sup>*)</sup>
0,1	10	20	0,05 <sup>*)</sup>
0,05	10	20	0,025 <sup>*)</sup>

**CATATAN** \*) Konsentrasi yang digunakan sebagai larutan kurva standar kerja.

### 10.3 Pengujian untuk pengendalian mutu

- Tempelkan kertas cakram kosong pada media kultur;
- Teteskkan kertas cakram sesuai dengan konsentrasi larutan kurva standar kerja sebanyak 75 µl (diameter 8 mm) atau 100 µl (diameter 10 mm);
- Teteskkan larutan dapar fosfat Nomor 2 (lihat Lampiran A.2) pada kertas cakram kosong sebanyak 75 µl (diameter 8 mm) atau 100 µl (diameter 10 mm) sebagai blangko;
- Letakkan cawan petri yang berisi media kultur, standar, dan blangko pada permukaan datar pada suhu ruang selama 30 menit;

- e. Inkubasikan dalam inkubator selama 16 jam s.d. 18 jam, untuk:
  - (1) golongan makrolida, aminoglikosida, sulfonamida, dan kuinolon pada suhu  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
  - (2) golongan tetrasiklin pada suhu  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; dan
  - (3) golongan beta laktam pada suhu  $55\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- f. Diameter zona hambatan diukur dengan menggunakan kaliper atau jangka sorong; dan
- g. Buat kurva yang menyatakan hubungan linier regresi antara konsentrasi antibiotik dengan diameter zona hambatan.

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

**A.1 Dapar fosfat Nomor 1**

- a. Timbang 7 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , dan 6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dalam gelas piala, dan larutkan dalam 500 ml air distilasi;
- b. Ukur pH larutan. Jika  $\text{pH} > 6,1$  teteskan larutan 1 N  $\text{H}_3\text{PO}_4$  atau jika  $\text{pH} < 5,9$  teteskan larutan 1 N NaOH sehingga larutan mencapai  $\text{pH } 6,0 \pm 0,1$ . Pindahkan larutan ke dalam botol media;
- c. Tambahkan air distilasi sampai 1.000 ml; dan
- d. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu  $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , dengan tekanan 15 Psi selama 15 menit.

**A.2 Dapar fosfat Nomor 2**

- a. Timbang 6,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dan 18,9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dalam gelas piala, dan larutkan dalam 500 ml air distilasi;
- b. Ukur pH larutan. Jika  $\text{pH} > 7,1$  teteskan larutan 1 N  $\text{H}_3\text{PO}_4$  atau jika  $\text{pH} < 6,9$  teteskan larutan 1 N NaOH sehingga larutan mencapai  $\text{pH } 7,0 \pm 0,1$ . Pindahkan larutan ke dalam botol media;
- c. Tambahkan air distilasi sampai 1.000 ml; dan
- d. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu  $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , dengan tekanan 15 Psi selama 15 menit.

**A.3 Dapar fosfat Nomor 3**

- a. Timbang 3,5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , dan 3 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dalam gelas piala, dan larutkan dalam 500 ml air distilasi;
- b. Ukur pH larutan. Jika  $\text{pH} > 6,1$  teteskan larutan 1 N  $\text{H}_3\text{PO}_4$  atau jika  $\text{pH} < 5,9$  teteskan larutan 1 N NaOH sehingga larutan mencapai  $\text{pH } 6,0 \pm 0,1$ . Pindahkan larutan ke dalam botol media;
- c. Tambahkan air distilasi sampai 1.000 ml; dan
- d. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu  $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , dengan tekanan 15 Psi selama 15 menit.

**A.4 Larutan metanol 10%**

Pipet 10 ml metanol kemudian tambahkan air distilasi hingga volume menjadi 100 ml.

**A.5 Larutan 1 N NaOH**

- a. Timbang 4 g NaOH;
- b. Larutkan ke dalam 50 ml air distilasi; dan
- c. Tambahkan air distilasi sampai volume 100 ml.

**A.6 Larutan etanol 50%**

Pipet 52,1 ml etanol 96% kemudian tambahkan air distilasi hingga volume menjadi 100 ml.

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

**B.1 Media biakan *Bacillus stearothermophilus*****B.1.1 Pembuatan media agar**

- a. Timbang dan siapkan bahan-bahan sebagai berikut:
  - (1) *tryptone* sebanyak 5,0 g;
  - (2) *yeast extract* sebanyak 12,0 g;
  - (3) *bacto agar* sebanyak 15 g s.d. 18 g;
  - (4) *dextrose* sebanyak 1,0 g; dan
  - (5) air distilasi s.d. 1.000 ml.
- b. Larutkan *tryptone*, *dextrose*, dan *yeast extract* pada gelas piala dengan 500 ml air distilasi;
- c. Ukur pH larutan. Jika pH > 5,8 teteskan larutan 1 N HCl atau jika pH < 5,6 teteskan larutan 1 N NaOH sehingga larutan mencapai pH  $5,7 \pm 0,1$ . Pindahkan larutan ke dalam botol media;
- d. Tambahkan *bacto agar*, selanjutnya tambahkan air distilasi sehingga volume keseluruhan menjadi 1.000 ml;
- e. Didihkan menggunakan *hot plate* sampai *bacto agar* tersebut larut; dan
- f. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tekanan 15 Psi selama 15 menit.

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

- a. Timbang 2 g *dextrose* dalam botol media, kemudian larutkan ke dalam air distilasi sampai 100 ml; dan
- b. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tekanan 15 Psi selama 15 menit.

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

- a. Timbang dan siapkan bahan-bahan sebagai berikut:
  - (1) *peptone* sebanyak 5,0 g;
  - (2) *beef extract* sebanyak 3,0 g;
  - (3) *bacto agar* sebanyak 15 g s.d. 18 g; dan
  - (4) air distilasi s.d. 1.000 ml.
- b. Larutkan *peptone* dan *beef extract* pada gelas piala dengan 500 ml air distilasi;
- c. Ukur pH larutan. Jika pH > 8,6 teteskan larutan 1 N HCl atau jika pH < 8,4 teteskan larutan 1 N NaOH sehingga larutan mencapai pH  $8,5 \pm 0,1$ . Pindahkan larutan ke dalam botol media;
- d. Tambahkan *bacto agar*, selanjutnya tambahkan air distilasi sehingga volume keseluruhan menjadi 1.000 ml;
- e. Didihkan menggunakan *hot plate* sampai *bacto agar* tersebut larut; dan
- f. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tekanan 15 Psi selama 15 menit.

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

- a. Timbang dan siapkan bahan-bahan sebagai berikut:
  - (1) *peptone* sebanyak 6,0 g;
  - (2) *beef extract* sebanyak 1,5 g;
  - (3) *yeast extract* sebanyak 3,0 g;
  - (4)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sebanyak 1,35 g;

- (5) *bacto agar* sebanyak 15 g s.d. 18 g; dan
- (6) air distilasi s.d. 1.000 ml.
- b. Larutkan *peptone*, *beef extract*, *yeast extract* dan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pada gelas piala dengan 500 ml air distilasi;
- c. Ukur pH larutan. Jika pH > 5,8 teteskan larutan 1 N HCl atau jika pH < 5,6 teteskan larutan 1 N NaOH sehingga larutan mencapai pH  $5,7 \pm 0,1$ . Pindahkan larutan ke dalam botol media;
- d. Tambahkan *bacto agar*, selanjutnya tambahkan air distilasi sehingga volume keseluruhan menjadi 1.000 ml;
- e. Didihkan menggunakan *hot plate* sampai *bacto agar* tersebut larut; dan
- f. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu  $121\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ , tekanan 15 Psi selama 15 menit.

#### **B.4 Media biakan *Kocuria rhizophila* dan media biakan *Escherichia coli***

- a. Timbang dan siapkan bahan-bahan sebagai berikut:
  - (1) *peptone* sebanyak 6,0 g;
  - (2) *beef extract* sebanyak 1,5 g;
  - (3) *yeast extract* sebanyak 3,0 g;
  - (4) *glucose* sebanyak 1,0 g;
  - (5) *bacto agar* sebanyak 15 g s.d. 18 g; dan
  - (6) air distilasi s.d. 1.000 ml.
- b. Larutkan *peptone*, *beef extract*, *yeast extract*, dan *glucose* pada gelas piala dengan 500 ml air distilasi;
- c. Ukur pH larutan. Jika pH > 8,6 teteskan larutan 1 N HCl atau jika pH < 8,4 teteskan larutan 1 N NaOH sehingga larutan mencapai pH  $8,5 \pm 0,1$ . Pindahkan larutan ke dalam botol media;
- d. Tambahkan *bacto agar*, selanjutnya tambahkan air distilasi sehingga volume keseluruhan menjadi 1.000 ml;
- e. Didihkan menggunakan *hot plate* sampai *bacto agar* tersebut larut; dan
- f. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu  $121\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ , tekanan 15 Psi selama 15 menit.

#### **B.5 Media biakan spora (media agar Nomor 1)**

- a. Timbang dan siapkan bahan-bahan sebagai berikut:
  - (1) *peptone* sebanyak 10,0 g;
  - (2) *beef extract* sebanyak 5,0 g;
  - (3) NaCl sebanyak 2,5 g;
  - (4) *bacto agar* sebanyak 20 g s.d. 25 g; dan
  - (5) air distilasi s.d. 1.000 ml.
- b. Larutkan *peptone*, *beef extract*, dan NaCl pada gelas piala dengan 500 ml air distilasi;
- c. Ukur pH larutan. Jika pH > 6,6 teteskan larutan 1 N HCl atau jika pH < 6,4 teteskan larutan 1 N NaOH sehingga larutan mencapai pH  $6,5 \pm 0,1$ . Pindahkan larutan ke dalam botol media;
- d. Tambahkan *bacto agar*, selanjutnya tambahkan air distilasi sehingga volume keseluruhan menjadi 1.000 ml;
- e. Didihkan menggunakan *hot plate* sampai *bacto agar* tersebut larut; dan
- f. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu  $121\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ , tekanan 15 Psi selama 15 menit.



**Lampiran C**  
(normatif)  
**Pembuatan spora dan sel vegetatif**

**C.1 Cara kerja pembuatan spora *Bacillus cereus* ATCC 11778**

- a. Buat media agar miring Nomor 1 (lihat Lampiran B.5) dalam *Roux's bottle* sebanyak 100 ml;
- b. Inokulasikan mikroorganisme *Bacillus cereus* ATCC 11778 ke dalam botol-botol yang telah berisi media agar Nomor 1 dengan cara melakukan goresan dengan menggunakan *loop needle* (öse). Inkubasikan selama 2 minggu dalam inkubator dengan suhu  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , amati pertumbuhan setiap hari;
- c. Biakan yang telah membentuk spora dipanen dengan cara mengerok permukaan media yang ditumbuhi mikroorganisme dengan *loop needle* (öse), dan masukkan ke dalam tabung yang berisi 20 ml NaCl fisiologis steril (jumlah tabung bergantung pada banyaknya hasil panen spora);
- d. Panaskan larutan tersebut dalam penangas air pada suhu  $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit;
- e. Sentrifus hasil dari huruf d dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit dan buang supernatannya (lapisan atas);
- f. Tambahkan maksimum 20 ml NaCl fisiologis steril, selanjutnya kocok hingga homogen. Masukkan dalam *refrigerator* dengan kisaran suhu  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  s.d.  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 18 jam s.d. 24 jam;
- g. Panaskan kembali larutan tersebut dalam penangas air pada suhu  $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit; dan
- h. Sentrifus kembali dengan kecepatan 1.000 rpm selama 5 menit dan ambil semua supernatan sebagai stok spora dan simpan dalam *refrigerator* dengan suhu  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  s.d.  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**C.2 Cara kerja pembuatan spora *Bacillus subtilis* ATCC 6633**

- a. Buat media agar miring Nomor 1 (lihat Lampiran B.5) dalam *Roux's bottle* sebanyak 100 ml;
- b. Inokulasikan mikroorganisme *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ke dalam botol-botol yang telah berisi media agar Nomor 1 dengan cara melakukan goresan dengan menggunakan *loop needle* (öse). Inkubasikan selama 2 minggu dalam inkubator dengan suhu  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , amati pertumbuhan setiap hari;
- c. Biakan yang telah membentuk spora dipanen dengan cara mengerok permukaan media yang ditumbuhi mikroorganisme dengan *loop needle* (öse) dan masukkan ke dalam tabung yang berisi 20 ml NaCl fisiologis steril (jumlah tabung bergantung pada banyaknya hasil panen spora);
- d. Panaskan larutan tersebut dalam penangas air pada suhu  $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit;
- e. Sentrifus dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit dan buang supernatannya (lapisan atas);
- f. Tambahkan maksimum 20 ml NaCl fisiologis steril, selanjutnya kocok hingga homogen. Masukkan dalam *refrigerator* dengan suhu  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  s.d.  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 18 jam s.d. 24 jam;
- g. Panaskan kembali larutan tersebut dalam penangas air pada suhu  $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit; dan
- h. Sentrifus kembali dengan kecepatan 1.000 rpm selama 5 menit dan ambil semua supernatan sebagai stok spora dan simpan dalam *refrigerator* dengan suhu  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  s.d.  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

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

- a. Buat media agar miring Nomor 1 (lihat Lampiran B.5) dalam *Roux's bottle* sebanyak 100 ml yang telah ditambahkan *dextrose* 2% sebanyak 2,5% ke dalam masing-masing botol;
- b. Inokulasikan mikroorganisme *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 ke dalam botol-botol yang telah berisi media agar Nomor 1 dengan cara melakukan goresan dengan menggunakan *loop needle* (öse), inkubasikan selama 4 minggu dalam inkubator dengan suhu  $55\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , amati pertumbuhan setiap hari;
- c. Biakan yang telah membentuk spora dipanen dengan cara mengerok permukaan media yang ditumbuhi mikroorganisme dengan *loop needle* (öse) dan masukkan ke dalam tabung yang berisi 20 ml NaCl fisiologis steril (jumlah tabung bergantung pada banyaknya hasil panen spora);
- d. Panaskan larutan tersebut dalam penangas air pada suhu  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit;
- e. Sentrifus dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit dan buang supernatannya;
- f. Tambahkan larutan NaCl fisiologis steril maksimum 20 ml, selanjutnya kocok hingga homogen. Masukkan dalam *refrigerator* dengan suhu  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  s.d.  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 18 jam s.d. 24 jam;
- g. Panaskan kembali larutan tersebut dalam penangas air pada suhu  $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit; dan
- h. Sentrifus kembali dengan kecepatan 1.000 rpm selama 5 menit dan ambil semua supernatan sebagai stok spora dan simpan dalam *refrigerator* dengan suhu  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  s.d.  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### C.4 Pembuatan sel vegetatif mikroorganisme *Kocuria rhizophila* (*Micrococcus luteus*) ATCC 9341

- a. Buat media agar miring Nomor 1 (lihat Lampiran B.5) sebanyak 10 ml dalam tabung reaksi steril;
- b. Inokulasikan mikroorganisme *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 dalam tabung reaksi yang telah berisi media agar Nomor 1 dengan cara melakukan goresan dengan menggunakan *loop needle* (öse). Inkubasikan selama 18 jam s.d. 24 jam dalam inkubator dengan suhu  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- c. Ambil 1 *loop needle* (öse) mikroorganisme biakan *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 dan masukkan ke dalam 10 ml media HIB;
- d. Inkubasikan selama 18 jam s.d. 24 jam dalam inkubator dengan suhu  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; dan
- e. Mikroorganisme siap digunakan untuk pengujian dan harus selalu dalam keadaan baru.

### C.5 Pembuatan sel vegetatif mikroorganisme *Escherichia coli* ATCC 11303

- a. Buat media agar miring Nomor 1 (lihat Lampiran B.5) sebanyak 10 ml dalam tabung reaksi steril;
- b. Inokulasikan mikroorganisme *Escherichia coli* ATCC 11303 dalam tabung reaksi yang telah berisi media agar Nomor 1 dengan cara melakukan goresan dengan menggunakan *loop needle* (öse). Inkubasikan selama 18 jam s.d. 24 jam dalam inkubator dengan suhu  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- c. Ambil 1 *loop needle* (öse) mikroorganisme biakan *Escherichia coli* ATCC 11303 dan masukkan ke dalam 10 ml media HIB;
- d. Inkubasikan selama 18 jam s.d. 24 jam dalam inkubator dengan suhu  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; dan
- e. Mikroorganisme siap digunakan untuk pengujian dan harus selalu dalam keadaan baru.

### C.6 Penghitungan spora

Hitung spora dengan mengacu pada cara uji angka lempeng total (ALT) sesuai dengan SNI ISO 4833-1.

**C.7 Verifikasi spora dan sel vegetatif**

- a. Siapkan media kultur untuk masing-masing golongan antibiotik;
- b. Buat variasi persentase spora dan sel vegetatif (1% s.d. 10% volume media), masing-masing variasi tersebut dicampurkan dengan media yang telah disiapkan;
- c. Tuang media yang telah dicampur spora atau sel vegetatif ke dalam cawan petri kemudian dibiarkan sampai memadat;
- d. Letakkan kertas cakram di atas permukaan media kultur;
- e. Teteskan larutan standar kerja sebanyak 75  $\mu\text{l}$  pada kertas cakram yang berdiameter 8 mm atau 100  $\mu\text{l}$  pada kertas cakram yang berdiameter 10 mm;
- f. Letakkan cawan petri yang berisi media kultur dan standar kerja pada permukaan datar pada suhu ruang selama 30 menit;
- g. Inkubasikan dalam inkubator selama 16 jam s.d. 18 jam, untuk:
  - (1) golongan makrolida, aminoglikosida, sulfonamida, dan kuinolon pada suhu  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
  - (2) golongan tetrasiklin pada suhu  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; dan
  - (3) golongan beta laktam pada suhu  $55\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- h. Ukur diameter zona hambatan dengan menggunakan kaliper atau jangka sorong untuk menentukan hasil uji; dan
- i. Gunakan persentase spora dan sel vegetatif yang menunjukkan zona hambatan dengan diameter  $> 18\text{ mm}$ .

**Lampiran D**  
(normatif)  
**Pembuatan larutan trimetoprim**

Pembuatan larutan trimetoprim 50 µg/ml dilakukan dengan cara:

- a. Sebelum membuat larutan stok standar trimetoprim, terlebih dahulu lakukan pengecekan potensi standar yang tertera pada label kemasan standar tersebut;
- b. Timbang standar tersebut dalam botol timbang, larutkan dalam pelarut etanol 50% sehingga diperoleh konsentrasi 1.000 µg/ml dengan volume minimum 4 ml;
- c. Pipet 2 ml larutan stok standar trimetoprim ke dalam tabung pengencer;
- d. Encerkan hingga 20 ml dengan air distilasi steril sehingga diperoleh larutan standar 100 µg/ml, homogenkan dengan *tube shaker*, dan
- e. Lakukan pengenceran serial hingga diperoleh konsentrasi 50 µg/ml.

## Bibliografi

- [1] Al-Mashhadany D A. Detection of antibiotic residues among raw beef in Erbil City (Iraq) and impact of temperature on antibiotic remains. *Italian Journal of Food Safety*, 2019, 8(1): 6-10.
- [2] Alla M B W, Mohamed T E, Abdelgadir A E. Detection of antibiotics residues in beef in Ghanawa Slaughterhouse, Khartoum State, Sudan. *African Journal of Food Science*, 2011, 5(10): 574-580.
- [3] Division of Microbiology. U.S. Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual [BAM]*. Gaithersburg: USA AOAC International, 1998.
- [4] Ferrini A M, Mannoni V, Aureli P. Combined Plate Microbial Assay (CPMA): A 6-plate-method for simultaneous first and second level screening of antibacterial residues in meat. *Food Additives and Contaminants*, 2006, 23(1): 16–24.
- [5] Gaudin V, Hedou C, Rault A, Verdon E. Validation of a five plate test, the STAR protocol, for the screening of antibiotic residues in muscle from different animal species according to the European decision 2002/657/EC. *Food Additives and Contaminants*, 2010, 27(07): 935-952.
- [6] Gaudin V, Maris P, Fuselier R, Ribouchon J L, Caudien N, Rault A. Validation of a microbiological method: the STAR protocol, a five plate test, for the screening of antibiotic residues in milk. *Food Additive Contaminant*, 2004, 21(5): 422-33.
- [7] Idowu F, Junaid K, Paul A, Gabriel O, Paul A, Sati N, Jarlath U. Antimicrobial screening of commercial eggs and determination of tetracycline residue using two microbiological methods. *International Journal of Poultry Science*, 2010, 9(10): 959-962.
- [8] Kozarova I, Janosova J, Mate D, Pipova M, Jevinova P. Utilisation of para-aminobenzoic acid (PABA) for the presumptive identification of sulphadimidine at its residue screening by using the microbiological four-plate test. *Bulletin Veterinary Institute in Pulawy*, 2005, 49: 59-64.
- [9] Liousia M, Gousia P, Economou V, Sakkas H, Papadopoulou C. Screening for antibiotic residues in swine and poultry tissues using the STAR test. *International Journal of Food Safety, Nutrition and Public Health*, 2015, 5(2): 173-183.
- [10] Myllyniemi A L, Nuotio L, Lindfors E, Rannikko R, Niemi A, Bäckman C. A microbiological six-plate method for the identification of certain antibiotic groups in incurred kidney and muscle samples. *The Analyst*, 2001, 126(5): 641-646.

- [11] Shahid M A, Muhammad Siddique M S, Sajjad-ur-Rehman S U R, Sajid Hameed S H, Muhammad Imran M I. Evaluation of a microbiological growth inhibition assay as a screening test for the presence of antibiotic residues in poultry meat. *American Journal of Food Technology*. 2007, 2(5): 457-461.
- [12] White A C, Dey B P, Reamer H R, Thaker H N. USDA/FSIS *Microbiology Laboratory Guidebook* 3<sup>rd</sup> Ed. *Bioassay for The Detection, Identification and Quantitation of Antimicrobial Residues in Meat and Poultry Tissue*. Philadelphia, PA: United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Government Printing Press, 1998.

## Informasi perumus SNI

### [1] Komite Teknis Perumusan SNI

Komite Teknis 65-20 Kesehatan Masyarakat Veteriner

### [2] Susunan keanggotaan Komite Teknis Perumusan SNI

Ketua : Fery Fahrudin Munier  
Wakil Ketua : Endang Ekowati  
Sekretaris : Aulia  
Anggota : Nuraini Triwijayanti  
Rini Prastyanty  
Juniawati  
Sri Usmiati  
Denny Widaya Lukman  
Hadri Latif  
Ratih Dewanti  
Retno Dewi Wiwiek Bagja  
Puji Rahayu  
Kanti Puji Rahayu  
Thia Gaffiana  
Achmad Fachmi  
Akhmad Sawaldi

### [3] Konseptor Rancangan SNI

1. Aulia
2. Puji Rahayu
3. Sani Susanty
4. Hadri Latif
5. Endang Ekowati
6. Dyah Ayu Widiasih
7. Nur Sabiq Assadah
8. Lynda Nugrahaning Imanjati
9. Inggarsetya Syah Audini
10. Dyah Ayu Kurniawati
11. Dianita Dwi Sugiartanti
12. Zaki Aminullah
13. Vinny Anisya Larasati

### [4] Sekretariat Pengelola Komite Teknis Perumusan SNI

Balai Besar Pengujian Standar Instrumen Veteriner  
Badan Standardisasi Instrumen Pertanian  
Kementerian Pertanian