PENGUJIAN *Salmonella* sp PADA DAGING IKAN TUNA (*Thunnus albacore*) LOIN BEKU SEGAR (*FRESH FROZEN LOIN)*

TUGAS AKHIR

IMRANA. ALI

1422030050

TEKNOLOGI PENGOLAHAN HASIL PERIKANAN

POLITEKNIK PERTANIAN NEGERI PANGKAJENE KEPULAUAN PANGKEP

2017

Pengujian *Salmonella* sp Pada Daging Ikan Tuna (*Thunnus Albacore*) Loin Beku Segar (*Fresh Frozen Loin*)

TUGAS AKHIR

IMRANA. ALI

1422030050

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Menyelesaikan Studi pada Politeknik Pertanian Negeri Pangkajene Kepulauan

Telah Diperiksa dan Disetujui oleh Pembimbing

PEMBIMBING I	PEMBIMBING II
Syamsuar, S.Pi, M.Si	Ir. Imran Muhtar, M.Si
NIP.19700802 199803 1 008	NIP.19671231 19923 1 031

Diketahui oleh:

Direktur	Ketua Jurusan
Dr. Ir. H. Darmawan, M.P	Ir. Nurlaeli Fattah, M.Si
Nip. 19670202 199803 1 002	Nip. 19660807 199512 2 001

Tanggal Lulus: 16 Agustus 2017

Judul Tugas Akhir	**: Pengujian *Salmonella* sp Pada Daging Ikan Tuna (*Thunnus Albacore*) Loin Beku (*Fresh Frozen Loin*)**
Nama	**: Imrana. Ali**
Nim	**: 142203050**
Jurusan	**: Teknologi Pengolahan Hasil Perikanan**

Telah Diperiksa dan Disetujui Oleh :

TIM PENGUJI

1. **Syamsuar, S. Pi, M.Si** (.....)
2. **Ir. Imran Muhtar, M. Si** (.....)
3. **Fifi Arfini, S. TP** (.....)
4. **Arham Rusli, S. Pi, M. Si** (.....)

RINGKASAN

IMRANA ALI, 1422030050. **Pengujian Bakteri *Salmonella* sp Pada Daging Ikan Tuna (*Thunnus Albacore*) Loin Beku (*Fresh Frozen Loin*)** dibawah bimbingan Syamsuar dan Imran Muhtar.

Salah satu masalah di bidang pangan adalah masih tingginya tingkat kontaminasi mikroba pada produk hasil perikanan yang diproduksi oleh berbagai industri pengolahan atau unit pengumpulan ikan. Produk ikan serta olahannya merupakan jenis makanan yang berisiko tinggi terhadap bahaya kontaminasi. Dengan demikian perlu dilakukan pengamanan produk terhadap pencemaran mikroba, khususnya yang berasal dari produk perikanan mentah terkait dengan rantai produk perikanan mulai dari proses produksi sampai sebelum dikonsumsi. Salah satu persyaratan yang harus dipenuhi oleh negara pengimpor khususnya dalam bidang perikanan yaitu produk hasil perikanan harus terbebas dari bakteri patogen.

Tujuan penulisan tugas akhir ini untuk mengidentifikasi bakteri *Salmonella* sp pada Daging Ikan Tuna (*Thunnus albacore*) Loin Beku Segar (Fresh Frozen Loin), sehingga produk tersebut dinyatakan aman untuk dikonsumsi dan memenuhi persyaratan untuk diekspor.

Penyusunan tugas akhir ini menggunakan metode praktek langsung dan hasil wawancara dengan pihak yang terkait di di Labratorium Balai Besar Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Makassar.

yang dimulai tanggal 26 Januari – 26 Maret 2017.

Prinsip pengujian *Salmonella* sp dimulai dari tahap **pra pengkayaan**,; tahap **pengkayaan**; **tahap media selektif agar** beberapa media agar yang direkomendasikan sebagai media selektif antara lain adalah *Bhismut Sulfit Agar* (BSA), *xylase lysine Desoxycholate* (XLD) dan *Hektoen enteric* (HE); **Tahap Uji Biokimia, Tahap Uji Serlogi,**

Hasil pengujian *Salmonella* sp yang telah dilakukan pada Daging Tuna (*Thunnus albacore*) negatif mengandung *Salmonella* sp dan layak untuk diekspor dan dikonsumsi.

KATA PENGANTAR



Puji syukur penyusun panjatkan kehadirat ALLAH SWT. yang selalu memberikan rahmat dan hidayah serta nikmat terhadap hamba-hambanya, dan tak lupa pula kita kirimkan salam dan shalawat kepada nabi Muhammad SAW. Nabi sebagai suri tauladan, petunjuk untuk para pengikutnya, serta Kedua orang tua, saudara, yang selalu memberi do'a, motivasi, material dalam penyusunan laporan kegiatan ini. Sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan laporan Tugas Akhir yang berjudul "Pengujian Bakteri *Salmonella* sp Pada Daging Tuna (*Thunnus Albacore*) Loin Beku (Fresh Processed Loin)" di Balai Besar Karatina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Makassar, Sulawesi Selatan.

Dalam penyusunan Tugas Akhir ini, berbagai kesulitan dihadapi, namun kesulitan tersebut dapat teratasi berkat bantuan dan bimbingan Bapak Syamsuar, S.Pi, M.Si selaku pembimbing pertama dan Bapak Ir. Imran Muhtar, M.Si selaku pembimbing kedua yang telah memberi arahan selama proses penyusunan laporan tugas akhir hingga selesai. Pada kesempatan ini penulis menghaturkan terima kasih kepada :

1. Bapak Dr. Ir. H. Darmawan, M.P selaku Direktur Politeknik Pertanian Negeri Pangkep.
2. Ibu Ir. Nurlaeli Fattah, M. Si selaku ketua jurusan Teknologi Pengolan Hasil Perikanan .
3. Ibu Suriati, S. Pi, MM selaku penanggung jawab di Balai Besar Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan keamanan Hasil Hasil Perikanan Makassar, Sulawesi Selatan.
4. Bapak Syamsuar, S. Pi, M.Si selaku pembimbing pertama dan Bapak Ir. Imran Muhtar, M.Si selaku pembiming kedua

5. Ibu Fifi Arfini, S.TP selaku penguji pertama dan Bapak Arham Rusli, S.Pi, M.Si
6. Bapak Muhammad Jafar,A. Pi selaku pembimbing lapangan yang telah memberi arahan dan informasi teknis pengujian bakteri di Balai Besar Karantina Ikan Pengendalian Mutu danKeamanan Hasil Perikanan Makassar, Sulawei Selatan.
7. Teman - teman mahasiswa seperjuangan Teknologi Pengolahan Hasil Perikanan Politeknik Pertanian Negeri Pangkep dan rekan-rekan praktik di lapangan mahasiswa dari Stitek Balikdewa Makassar, mahasiswa dari UNHAS, dan Mahasiswa dari Universitas Islam Negeri (UIN)

Semoga Tugas Akhir ini bermanfaat bagi penulis dan berguna bagi orang yang memerlukannya, Amin.

Pangkep, 17 Mei 2017

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

RINGKASAN ..... **iii**

KATA PENGANTAR ..... **iv**

DAFTAR ISI ..... **vi**

DAFTAR TABEL ..... **viii**

DAFTAR GAMBAR ..... **ix**

DAFTAR LAMPIRAN ..... **x**

I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang 1

1.2 Tujuan dan Manfaat..... 2

II TINJAUAN PUSTAKA

2.2 Klasifikasi dan Morfologi Ikan Tuna (*Thunnus* sp) 3
2.3 Komposisi Kimia dan Nilai Gizi Ikan Tuna..... 4
2.3 Kemunduran Mutu Ikan Tuna
2.3.1 Kemunduran Mutu Secara Kimiawi 5
2.3.2 Kemunduran Mutu Secara Autolisis..... 5
2.3.3 Kemunduran Mutu Secara Oksidas 6
2.3.4 Kemunduran Muu Akibat Histidin dan Histamin..... 6
2.3.5 Kemunduran Mutu Secara Fisik 7
2.3.6 Kemunduran Mutu Secara Bakteriologis..... 8
2.4 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Penurunan Mutu Ikan Tuna
2.4.1 Suhu 9

2.4.2 Lama Proses Penanganan 10
2.4.3 Kebersihan 10
2.4.4 Cara Kerja 10
2.5 *Salmonella* sp 12
2.6 Klasifikasi dan Morfologi *Salmonella* sp 12
2.7 Media Tumbuh *Salmonella* sp 13

2.8 Uji Kualitatif *Salmonella* sp
2.8.1 Tahap Prapengkayaan 14
2.8.2 Tahap Pengkayaan 15
2.8.3 Tahap Media Selektif Agar 15
2.8.4 Tahap Uji Biokimia 17
2.8.5 Tahap Uji Serlogi 19
2.9 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Pertumbuhan Mikroorganisme
2.9.1 Air (a_w) 19
2.9.2 Suhu 20
2.9.3 Atmosfer Gas 21
2.9.4 Keasaman atau Kebasaan (pH) 21
2.9.5 Kondisi Lain-lain 21
2.10 Pertumbuhan Bakteri 22

2.11 Persyaratan Mutu dan Keamanan Pangan Ikan Beku 23

III METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat 24

3.2 Metode Penulisan 24

3.3 Alat Dan Bahan 24

3.4 Prosedur Kerja 25

IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil 33

4.2 Pembahasan..... 34

V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan 37

5.2 Saran..... 37

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

RIWAYAT HIDUP

DAFTAR TABEL

No **Teks** **Halaman**

1. Komposisi Kimia Ikan Tuna 5
2. Tahap- tahap Kerusakan Ikan 11
3. Fase Pertumbuhan Bakteri 22
4. Persyaratan mutu dan keamanan pangan ikan beku 23
5. Reaksi TSI dan LIA 29
6. Hasil pengujian *Salmonella* sp 33

DAFTAR GAMBAR

No **Teks** **Halaman**

1. Jenis-jenis Ikan Tuna 3
2. Mikroskopis Bakteri *Salmonella* sp..... 13
3. Kurva Pertumbuhab Bakteri 22

DAFTAR LAMPIRAN

No **Teks** **Halaman**

1. Skema Alur Pengujian *Salmonella* sp 39
2. Media Selektif yang Terduga Positif *Salmonella* sp..... 40
3. Pengujian *Salmonella* sp..... 41
4. Reaksi Biokimia dan serologi untuk *Salmonella* sp 43

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakakang

Salah satu masalah di bidang pangan adalah masih tingginya tingkat kontaminasi mikroba pada makanan yang disajikan oleh berbagai industri makanan. Produk ikan serta olahannya merupakan jenis makanan yang berisiko tinggi terhadap bahaya kontaminasi. Dengan demikian perlu dilakukan pengamanan makanan terhadap pencemaran mikroba, khususnya yang berasal dari bahan makanan mentah terkait dengan rantai makanan mulai dari proses produksi sampai sebelum dikonsumsi. Pengujian sampel produk pangan selalu mengacu kepada persyaratan makanan yang sudah ditetapkan.

Metode yang digunakan untuk pengujian mikrobiologis sesuai dengan persyaratan yang diminta oleh konsumen. Identifikasi mikroba dilakukan dengan cara pengujian secara cepat, disamping menggunakan reaksi biokimia. Saat ini permintaan konsumen untuk kebutuhan ekspor produk perikanan terus mengalami peningkatan, hal itu juga diikuti dengan permintaan para konsumen yang menghendaki makanan terbebas dari cemaran mikroba. Salah satu persyaratan yang harus dipenuhi oleh negara pengimpor khususnya dalam bidang perikanan yaitu produk hasil perikanan harus terbebas dari bakteri patogen. Eropa mempersyaratkan produk hasil perikanan harus terbebas dari bakteri yaitu *Escherichia coli* dan *Salmonella.* Penyebab timbulnya bakteri tersebut adalah kurangnya penerapan sanitasi dan higiene saat budidaya dan pada waktu pengolahannya (Purnawijayanti, 2001).

Bakteri *Salmonella* sp adalah penyebab utama dari penyakit yang disebarkan melalui makanan (*foodborne diseases*). Pada umumnya, serotipe *Salmonella* sp menyebabkan penyakit pada organ pencernaan. Infeksi Salmonella dapat berakibat fatal kepada bayi, balita, ibu hamil dan kandungannya serta orang lanjut usia. Hal ini disebabkan karena kekebalan tubuh mereka yang

menurun. Kontaminasi *Salmonella* sp dapat dicegah dengan mencuci tangan dan menjaga kebersihan makanan yang dikonsumsi.

Beberapa produk perikanan khsusnya Daging Tuna (*Thunnus* sp) Beku besar kemunngkinan mengandung bakteri *Salmonella* sp sehingga pihak konsumen meminta untuk dilakukan uji *Salmonella* sp. Pegujian bakteri *Salmonella* sp sangat rutin dilakukan di Labratorium Balai Besar Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Kemanan Hasil Perikanan Makassar.

I.2. Tujuan dan Manfaat

Tujuan penulisan tugas akhir ini adalah untuk mengidentifikasi bakteri *Salmonella* sp pada Daging Tuna (*Thunnus Albacore*)

Manfaat penulisan tugas akhir ini adalah untuk memperluas wawasan, kompotensi keahlian mahasiswa dalam melakukan pengamatan dan pengujian khususnya mengenai pengujian *Salmonella* sp pada Daging Tuna (*Thunnus albacore*) serta memberi jaminan kesehatan pada masyarakat terhadap penyakit yang disebabkan dari cemaran bakteri *Salmoenlla* sp.

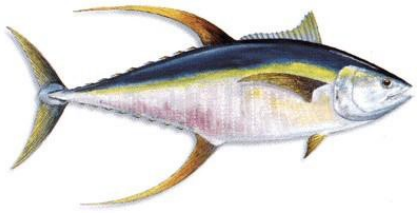
II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klasifikasi dan Morfologi Ikan Tuna (*Thunnus* sp)

Menurut Saanin (1984), ikan tuna berdasarkan taksonominya dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Filum : Chordata
Subfilum :Vertebrata
Kelas : Teleostei
Subkelas : Actinopterygii
Ordo : Perciformes
Subordo : Scombridei
Family : Scombridae
Genus : Thunnus
Spesies : *Thunnus* sp

Berdasarkan ukuran tuna, di Indonesia terdapat dua kelompok tuna yaitu tuna besar dan tuna kecil. Ikan tuna besar yang hidup di perairan laut Indonesia yaitu tuna madidihang (*Thunnus albacares*), tuna mata besar (*Thunnus obesus*), tuna albakora (*Thunnus alalunga*) dan tuna sirip biru (*Thunnus maccoyii*). Gambar dari beberapa jenis ikan tuna besar seperti pada Gambar



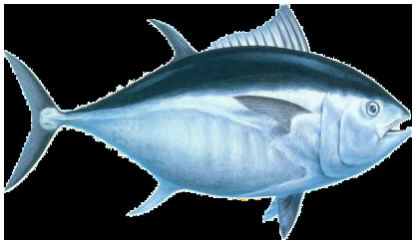
A. Tuna madidihang
(*Thunnus albacares*)



B. Tuna mata besar
(*Thunnus obesus*)



C. Tuna albakora
(*Thunnus alalunga*)



D. Tuna sirip biru
(*Thunnus maccoyii*)

Gambar 1 . Jenis-jenis Ikan Tuna (Maulana, 2012)

Ikan tuna madidihang dan tuna mata besar terdapat di seluruh wilayah perairan laut Indonesia. Tuna albakora hidup di perairan sebelah Barat Sumatera, Selatan Bali sampai dengan Nusa Tenggara Timur. Ikan tuna sirip biru hanya hidup di perairan sebelah Selatan Jawa sampai ke perairan Samudera Hindia bagian Selatan yang bersuhu rendah (Widiastuti 2008).

Menurut Widiastuti (2008), ikan tuna memiliki warna biru kehitaman pada bagian punggung dan berwarna keputih-putihan pada bagian perut. Tubuh ikan tuna berbentuk cerutu menyerupai torpedo serta tertutup oleh sisik sisik kecil. Ikan tuna pada umumnya mempunyai panjang antara 40–200 cm dengan berat antara 3-130 kg (Novriyanti 2007). Daging yang dimiliki berwarna merah muda sampai merah tua. Hal ini karena otot tuna lebih banyak mengandung myoglobin dari pada ikan lainnya (Mc Afee *et al*. 2009).

2.2 Komposisi Kimia dan Nilai Gizi Ikan Tuna

Ikan tuna merupakan jenis ikan yang mengandung lemak rendah (kurang dari 5%) dan protein yang sangat tinggi (lebih dari 20%). Komposisi kimia ikan tuna ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Kimia Ikan Tuna

Komponen	Komposisi Kimia g/100 gram		
	Madidihang	Tuna ekor biru	Cakalang
Air	74,0±0,28	70,1±1,98	69,9±0,71
Protein	23,2±1,34	25,5±4,03	26,0±0,28
Lemak	2,4±1,41	2,1±0,92	2,0±0,07
Karbohidrat	1,0±1,27	0,9±1,13	0,7±0,42
Abu	1,3±0,4	1,4±0,21	1,4±0,07

Tabel 1. Komposisi Kimia Ikan Tuna (SNI; 01-2332.2006)

2.3 Kemunduran Mutu Ikan Tuna

Ikan tuna yang mati setelah ditangkap akan mengalami serangkaian perubahan yang mengarah pada proses penurunan mutu yang disebabkan oleh tiga kegiatan utama yaitu penurunan secara bakteriologis, kimia, dan fisik. Seluruh proses perubahan ini pada akhirnya dapat mengarah pada pembusukan (Murniyati dan Sunarman 2000).

2.3.1 Kemunduran Mutu Secara Kimiawi

Menurut Hadiwiyoto (1993) penurunan mutu secara kimia adalah penurunan mutu yang berhubungan dengan komposisi kimia dan susunan tubuhnya. Penurunan mutu secara kimia terdiri dari penurunan mutu secara autolisis, oksidasi dan akibat histidin.

2.3.2 Kemunduran Mutu Secara Autolisis

Autolisis adalah penguraian protein dan lemak menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti asam amino dan asam lemak. Menurut Ilyas (1983) enzim yang berperan dalam autolisis yaitu enzim proteolysis (pengurai protein) dan enzim liposis (pengurai lemak). Penurunan mutu ditandai dengan rasa, warna, tekstur, dan kenampakan yang berubah. Penurunan mutu secara autolisis berlangsung sebagai aksi kegiatan enzim yang merupakan proses penguraian pertama setelah ikan tuna mati.

Kecepatan autolisis sangat tergantung pada suhu, semakin rendah suhu semakin lambat kecepatan autolisis. Kecepatan autolisis tidak dapat dihentikan namun hanya dapat memperlambat laju proses autolisis. Kegiatan enzim dapat direduksi dan dikontrol dengan cara pendinginan, penggaraman, pengeringan, dan pengasaman atau dapat dihentikan dengan cara pemasakan ikan (Ilyas 1983).

2.3.3 Kemunduran Mutu Secara Oksidasi

Menurut Faustman dan Cassens (1990), oksidasi adalah reaksi antara suatu senyawa kimia dengan oksigen. Salah satu kemunduran mutu ikan tuna yang disebabkan oleh proses oksidasi yaitu terjadinya penambahan kation Fe2+ (*ferrous*) dalam mioglobin menjadi bentuk Fe3+ (*ferric*) yang dapat mengakibatkan perubahan warna daging ikan tuna dari merah segar menjadi coklat.

Penyuntikan karbonmonoksida pada daging ikan tuna dapat mempertahankan warna merah daging ikan tuna pada saat penyimpanan dan pengangkutan. Senyawa karbonmonoksida dapat bereaksi dengan myoglobin menjadi karboksimioglobin yang merupakan bentuk stabil dari pigmen merah dalam daging ikan tuna. Karboksimioglobin dapat mencegah terjadinya proses oksidasi dibanding oksimioglobin karena senyawa karbonmonoksida memiliki daya ikat yang lebih kuat terhadap mioglobin dibanding oksigen (Livingston dan Brown 1981).

2.3.4 Kemunduran Muu Akibat Histidin dan Histamin

Menurut Hadiwiyoto (1993), histamin terbentuk dari degradasi histidin yang dikatalis oleh enzim *histidine dekarboksilase*. Senyawa histamin tidak berbau busuk, tetapi keberadaannya dalam daging ikan menjadi berbahaya. Senyawa histamin bersifat racun dan dapat menimbulkan keracunan yang disebut *"Scromboid Food Poisoning"*.

Kandungan histidin pada protein daging antara 3% dan 5%, tetapi ikan jenis *Horse mackerel*, *Japanese pilchard*, *mackerel*, dan *Pacific saury*

mengandung antara 4% dan 6% histidin, bahkan cakalang, *yellowtail*, madidihang, daging *bluefin* tuna mengandung histidin antara 8% dan 9% (Alasalvar *et al.* 2011). Kandungan histidin bebas pada jaringan ikan tuna lebih tinggi dari spesies ikan lainnya, sehingga kadar histamin dapat meningkat jika dilakukan penyimpanan dan penanganan yang salah (Wahyuni 2011).

Penyimpanan ikan pada kondisi suhu rendah sejak ikan ditangkap hingga dikonsumsi merupakan hal yang sangat penting untuk mengurangi kerusakan ikan dan menghindari terjadinya keracunan histamin. Suhu rendah mengontrol bakteri penghasil histamin selama ikan ditangani dan diolah (Widiastuty 2007).

2.3.5 Kemunduran Mutu Secara Fisik

Penurunan mutu secara fisik adalah kerusakan pada bagian luar tubuh ikan tuna yang terjadi akibat penanganan dan perlakuan yang kurang baik sehingga dapat mempengaruhi mutu. Penanganan lebih awal akan sangat berpengaruh terhadap kualitas mutu yang dihasilkan. Menurut Kushardiyanto (2010), perubahan fisik ikan yang terjadi pada proses kematian ikan karena diangkat dari air adalah:

1) Lendir yang berada dipermukaan ikan akan keluar secara berlebih saat ikan mati dan ikan akan menggelepar mengenai benda disekelilingnya. Ikan yang terkena benturan benda yang keras, kemungkinan besar tubuh ikan akan menjadi memar dan luka-luka.

2) Ikan mati akan mengalami kekakuan tubuh (rigormortis) yang diawali dari ujung ekor menjalar ke arah bagian kepalanya. Lama kekakuan tergantung dari tingkat kelelahan ikan pada saat kematiannya. Kerusakan ikan akan mulai terlihat yaitu berupa perubahan-perubahan seperti berkurangnya kekenyalan perut dan daging ikan, berubahnya warna insang, berubahnya kecembungan dan warna mata ikan, sisik lebih mudah lepas dan kehilangan kecemerlangan warna ikan, berubahnya bau dari segar menjadi asam.

3) Perubahan tersebut akan meningkat intensitasnya sesuai dengan bertambahnya tingkat penurunan mutu ikan, sehingga ikan menjadi tidak layak untuk dikonsumsi atau busuk.

Kesegaran ikan dapat dinilai menggunakan metode inderawi atau organoleptik dengan mengamati bagian tubuh ikan yang sensitif terhadap perubahan mutu dagingnya. Perubahan mutu tersebut seperti warna, rasa, kekenyalan dan kekompakan daging, kondisi mata, kondisi insang, dinding perut, bau atau aroma.

2.3.6 Kemunduran Mutu Secara Bakteriologis

Penurunan mutu secara bakteriologis yaitu suatu proses penurunan mutu yang terjadi karena adanya kegiatan bakteri yang berasal dari lingkungan dan dalam tubuh ikan (Junianto 2003). Menurut Sarmono (2002), ikan hidup memiliki kemampuan untuk mengatasi aktivitas bakteri yang terdapat dalam tubuh ikan. Bakteri yang hidup dalam saluran pencernaan, insang, saluran darah, serta permukaan kulit tidak dapat menyerang bagian-bagian tubuh ikan karena masih memiliki daya tahan terhadap serangan bakteri.

Menurut Murniyati dan Sunarman (2000), ikan yang telah mati tidak dapat mempertahankan aktivitas bakteri karena kemampuan daya tahan tubuh ikan telah hilang, sehingga bakteri mulai berkembang biak dengan sangat pesat dan menyerang tubuh ikan. Bakteri menjadikan daging ikan sebagai makanan dan tempat hidupnya. Sasaran utamanya adalah protein ataupun hasil-hasil penguraiannya dalam proses autolisis, dan substansi-substansi non-nitrogen. Penguraian yang dilakukan oleh bakteri ini (disebut *bacterial decomposition*) menghasilkan pecahan-pecahan protein yang sederhana dan berbau busuk, seperti CO2, H2S, amoniak, indol, skatol, dan lain-lain.

Menurut Murniyati dan Sunarman (2000), setiap jenis bakteri memerlukan suhu tertentu untuk dapat hidup dengan baik.. Pencegahan yang dilakukan untuk menghambat aktivitas bakteri yaitu dengan menurunkan suhu hingga di bawah 0^0C atau menaikkan hingga di atas 100^0C.

2.4 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Penurunan Mutu Ikan Tuna

Menurut Ilyas (1983), faktor-faktor yang mempengaruhi mutu produk perikanan adalah suhu, lama proses penanganan, kebersihan, serta cara kerja.

2.4.1 Suhu

Suhu memiliki peranan penting dalam upaya mempertahankan mutu produk beku. Faktor suhu berperan dalam keseluruhan usaha produk, baik sejak awal ditangkap hingga menjadi produk akhir. Suhu ikan tuna di atas 0^0C akan mengalami kemunduran mutu yang terjadi secara kimia maupun mikrobiologi (Hadiwiyoto 1993). Proses pembusukan pada ikan tuna yang disimpan pada suhu 3^0C-5^0C terjadi pada hari ke 12. Bakteri pembusuk hidup pada suhu antara 0^0C-30^0C dengan suhu optimal 15^0C. Suhu yang diturunkan dengan cepat hingga di bawah 0^0C atau pada kisaran suhu -1^0C-5^0C maka proses pembusukan akan terhambat, pada suhu ini kegiatan enzim perusak akan terhambat, sedangkan kegiatan bakteri patogen akan terhenti (Moelyanto 1992). Dasar inilah yang digunakan untuk proses penanganan pada tuna loin beku, yakni penggunaan suhu rendah dengan teknik pendinginan dan pembekuan.

Pendinginan merupakan proses pengawetan dengan suhu rendah (-1^0C-5^0C) yang bertujuan untuk menghambat aktivitas mikroorganisme, proses kimia, dan proses fisik lainnya yang dapat mempengaruhi kesegaran mutu. Pembekuan tuna loin merupakan salah satu cara menghentikan terjadinya proses penurunan mutu dengan suhu yang digunakan yaitu -18^0C sampai -30^0C (Ilyas 1993). Menurut BSN (2006), proses penanganan tuna loin beku harus mempertahankan suhu produk maksimal 4,4^0C dan proses pembekuan maksimal -18^0C. Suhu tuna loin yang tidak diperhatikan akan berpengaruh terhadap mutu produk akhir tersebut. Keberhasilan penanganan tergantung pada stabilitas suhu selama penanganan. Semakin rendah suhu yang dapat diturunkan dan semakin stabil suhu tersebut dipertahankan selama penanganan, maka mutu atau kualitas yang didapat akan semakin baik (Afrianto dan Liviawaty 1989).

2.4.2 Lama Proses Penanganan

Lama proses berkaitan dengan lamanya waktu suatu proses penanganan, perlakuan dan waktu penyimpanan yang dialami oleh produk beku. Tertundanya waktu proses penanganan dapat mempengaruhi mutu dari produk tersebut, maka dari itu proses penanganan harus dilakukan sesegera mungkin dengan menggunakan suhu rendah antara -1^0C – 5^0C. Semakin panjang waktu penyimpanan produk pada suhu rendah, maka semakin besar pengaruhnya terhadap produk beku tersebut (Ilyas 1983). Produk yang disimpan dalam waktu lama sebaiknya digunakan suhu penyimpanan yang rendah yaitu berkisar pada -18oC untuk mencegah terjadinya dehidrasi pada produk.

2.4.3 Kebersihan

Faktor kebersihan memiliki peranan yang sangat penting dalam pemantapan mutu produk. Faktor kesehatan dan higienis selalu ditunjukkan oleh keadaan bakteri dari kesegaran produk dan faktor suhu produk. Indikator yang digunakan yaitu jumlah bakteri yang terdapat pada produk beku, kondisi tempat penanganan, peralatan, dan bahan yang terlihat dalam proses produksi (Nasution 2009).

Sanitasi perlu diperhatikan baik bagi produknya maupun yang berhubungan selama proses penanganan. Sarana dan peralatan yang digunakan serta kebersihan para pekerja diusahakan agar terhindar dari kontaminasi silang dengan produk (Ilyas 1983). Faktor kebersihan ini harus diperhatikan karena akan mempengaruhi mutu produk akhir yang dihasilkan. 17

2.4.4 Cara Kerja

Kecermatan dalam penanganan harus dilakukan agar tuna loin tidak rusak, maka dari itu digunakan prosedur penanganan tiap jenis, ukuran dan tujuan pemanfaatan serta pemasarannya. Semua kerusakan tuna loin akan menyebabkan tuna loin tidak terjual, masa simpan yang singkat, berkurang mutunya, dan terjadi penolakan dari negara ekspor (Ilyas 1983). Proses penanganan diperlukan tenaga

kerja yang cermat, cepat dan teliti agar didapatkan produk yang memiliki mutu baik dan sesuai standar.

Tabel 2. Tahap-tahap kerusakan ikan

Tingkat	**Perubahan jaringan**	**Perubahan organoleptik**	**Total bakteri**	**Perubahan kimia****
Tahap I(0-5 hari dalam es)	Rigor mortis ATP → inosin sedikit naik, TMA perubahan jenis bakteri	Mata cerah Daging segar Warna baik Insang cerah bau segar	10^2-10^3/cm^2	TMA ≤ 1-1,5 mg% VRS ≤ 2-8 unit
Tahap II (5-10 hari dalam es)	Perubahan bakteri jadi nyata inosin → hipoxantin TMA↛ TMA NH_3 meningkat	Mata mulai redup Warna insang pucat Warna kulit pucat Bau netral sampai bau anyir Tekstur melunak	10^3-10^6/cm^2	TMA <5 mg% VRSCA 5-10 unit TBV ≤15 mg%
Tahap III (10-14 hari dalam es)	Bakteri tumbuh cepat Penetrasi jaringan Hipoxantin → xanthin Asam urat dan lain-lain TMA meningkat cepat TVB dan TVA naik	Mata tenggelam Insang berubah warna dan berlendir Bau asam dan hanyir Tekstur lunak	10^6-10^8/cm^2	TMA ~ 10 mg% VRS ~10-15 unit TVB 20-30 mg% TVA 15-20 mg%
Tahap IV (lebih dari 14 hari dalam es)	Jumlah bakteri tetap Beberapa perubahan spesies Kerusakang umum daging TVB dan	Mata opak dan tenggelam Insang memuutih dan berlendir Kulit sangat berlendir Tekstur sangat	10^8/cm^2	TMA >10 mg% VRS > 20 unit TVB > 30 mg% TVB ≥ 60 mg% H_2S indol dan

	TVA naik Proteolisis mulai H_2S dan produk lain terbentuk	lunak Bau menyengat		lain-lain Nyata

*) silliker et al (1980)

**)TMA : Trimetilamin dinyatakan sebagai mg/100 g ikan; TVB : Total Basa Volatil dinyatakan sebagai mg/100 g ikan; TVA : Total Asam Volatil dinyatakan sebagai mg/100 g ikan; VRS: senyawa produksi volatil, dinyatakan sebagai mg/100 g ikan.

2.5 *Salmonella* sp

Salmonella sp adalah penyebab utama dari penyakit yang disebarkan melalui makanan (*foodborne diseases*). Pada umumnya, serotipeSalmonella menyebabkan penyakit pada organ pencernaan. Penyakit yang disebabkan oleh Salmonella disebut salmonellosis.

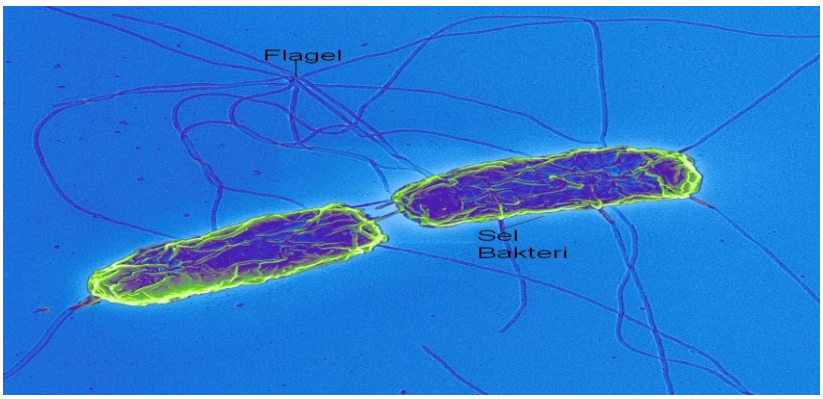
Ciri-ciri orang yang mengalami *salmonellosis* adalah diare, keram perut, dan demam dalam waktu 8-72 jam setelah memakan makanan yang terkontaminasi oleh *Salmonella* sp. Gejala lainnya adalah demam, sakit kepala, mual dan muntah-muntah. Tiga serotipe utama dari jenis *S. enterica* adalah *S. typhi*, *S. typhimurium*, dan *S. enteritidis*. S. typhi menyebabkan penyakit demam tifus (Typhoid fever), karena invasi bakteri ke dalam pembuluh darah dan gastroenteritis, yang disebabkan oleh keracunan makanan/intoksikasi. Gejala demam tifus meliputi demam, mual-mual, muntah dan kematian. *S. typhi* memiliki keunikan hanya menyerang manusia, dan tidak ada inang lain. Infeksi Salmonella dapat berakibat fatal kepada bayi, balita, ibu hamil dan kandungannya serta orang lanjut usia. Hal ini disebabkan karena kekebalan tubuh mereka yang menurun. Kontaminasi Salmonella dapat dicegah dengan mencuci tangan dan menjaga kebersihan makanan yang dikonsumsi.

2.6 Klasifikasi dan Morfologi *Salmonella* sp

Menurut Salle (1976), klasifikasi bakteri *Salmonella* sp termasuk kedalam:

Kingdom : *Protophyta/protista*
Class : *Scizimycetes*
Ordo : *Eubacteriaceae*
Famili : *Eubacteriaceae*
Genus : *Salmonella*
Species : *Salmonella sp*

Salmonella sp merupakan bakteri bentuk batang denga ukuran 1 µm-3,5 µm × 0,5 µm-0,8 µm, motil kecuali *S. galinarum* dan *S. pullorum* nonmotil, tidak berspora dan bersifat gram negatif, bergerak dengan flagel peritrik, berukuran 2-4 µm x 0.5-0,8 µm. *Salmonella* sp tumbuh cepat dalam media yang sederhana (Jawet'z, dkk, 2005), hampir tidak pernah memfermentasi laktosa dan sukrosa, membentuk asam dan kadang gas dari glukosa dan manosa, biasanya memporoduksi hidrogen sulfide atau H2S, pada biakan agar koloninya besar bergaris tengah 2-8milimeter, bulat agak cembung, jernih, smooth, pada media BAP tidak menyebabkan hemolisis, pada media Mac Concey koloni *Salmonella* sp tidak memfermentasi laktosa (NLF), konsistensinya smooth (WHO, 2003), *Salmonella* sp dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Mikroskopis kuman *Salmonella* sp. (http//. www.Mikrobiologi Lab.com)

2.6 Media Tumbuh *Salmonella* sp

Untuk menumbuhkan *Salmonella* sp dapat digunakan berbagai macam media, salah satunya adalah media *Hektoen Enteric Agar* (HEA). Media lain yang dapat digunakan adalah SS agar, bismuth sulfite agar, brilliant green agar, dan xylose-lisine-deoxycholate (XLD) agar. HEA merupakan media selektif-diferensial. Media ini tergolong selektif karena terdiri dari bile salt yang berguna untuk menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan beberapa gram negatif, sehingga diharapkan bakteri yang tumbuh hanya *Salmonella* sp. Media ini digolongkan menjadi media diferensial karena dapat membedakan bakteri *Salmonella* sp dengan bakteri lainnya dengan cara memberikan tiga jenis karbohidrat pada media, yaitu laktosa, glukosa, dan salisin, dengan komposisi laktosa yang paling tinggi. *Salmonella* sp tidak dapat memfermentasi laktosa, sehingga asam yang dihasilkan hanya sedikit karena hanya berasal dari fermentasi glukosa saja. Hal ini menyebabkan koloni *Salmonella* sp akan berwarna hijau-kebiruan karena asam yang dihasilkannya bereaksi dengan indikator yang ada pada media HEA, yaitu fuksin asam dan bromtimol blue.

2.7 Uji Kualitatif *Salmonella* sp

Menurut Faradiaz (1993), *Salmonella* sp tergolong bakteri bakteri enterogenik yang pengujiannya dapat dibedakan menjadi dua yaitu: uji kualitatif dan uji kuantitatif. Bakteri enteropatogenik pada umumnya terdapat dalam jumlah yang kecil didalam makanan atau produk, namun jumlah tersebut sudah cukup untuk dapat menimbulkan gejala sakit bagi yang mengonsumsinya. Bakteri *Salmonella* sp dapat menyebabkan diare yang disertai mual-mual, demam dan muntah-muntah dimana dalam keadaan akut dapat merusak hati, ginjal dan empedu.

Bakteri-bakteri dalam uji kuantitatif tidak dapat terdeteksi, oleh karena pertumbuahan tertutup mikroba-mikroba lainnya yang terdapat dalam makanan, karena alasan inilah maka uji kuantitatif tidak efesien dilakukan terhadap bakteri enteropatogenik dan cukup dilakukan uji kualitatif.

Uji kualitatif terdiri dari beberapa tahap untuk memperbanyak jumlah bakteri-bakteri sehingga memudahkan untuk mendeteksi dan mengisolasinya. Tahap-tahap tersebut terdiri dari.

2.8.1 Tahap Pra pengkayaan

Pendeteksian *Salmonella* sp dengan adanya berbagai media spesifik yang cukup sensitif sangat membantu sensitifikasi dalam pengujian, selain itu sensitfikasi pada penguan *Salmonella* sp juga dapat dipertinggi dengan memperbanyak jumlah contoh yang diuji (Faraiaz, 1993). Rasio ukuran sampel yang umum untuk volume broth prapengkayaan 1 : 10, sedangkan ukuran sampel yang semakin besar misalnya 10 g/ 90 ml, 25 g/225 ml. Pada tahap ini sampel diperkaya dengan nutrisi media nonselektif yang bertujuan untuk meyimpan kembali *Salmonella* sp yang rusak/terluka pada saat pengolahan produk misalnya pembekuan sampai kondisi stabil.

2.8.2 Tahap Pengkayaan

Broth pengkayaan selekif digunakan dalam analisa makanan dengan tujuan untuk meningkatkan populasi *Salmonella* sp dan menghambat organisme pada sampel makanan (Speck, 1976). Broth atau media yang digunakan adalah Selenite *Cystine Broth* (SCB) dan *Tetrahionate Broth* (TTB). Maksud daripada penggunaan ini media tersebut adalah bahwa pada media SCB dengan adanya kandungan selenit pada media ini akan dapat menghambat bakteri *coliform* yang *enterecocci* yang terjadi paa inkibasi pertama (6-12 jam). Efek dari adanya *cystin* dapat mengurangi pertumbuhan bakteri hingga serendah mungkin dan selenit menghasilkan racun bagi beberpa jenis mikrooganisme *coliform* yang enterecocci (Fachlam, 1990). Media TTB dapat digunakan untuk pengkayaam *Salmonella* sp pada daging dan produk perikanan. Tetraionate dihasilkan dari thio sulfat dengan penambahan iodine pada kultur yang fungsinya dapat mengambat bakteri *coliform*. Sedangkan *Salmonella* sp tidak dihambat dengan adanya tetrahionate, akan tetapi dapat mengiragi kandungan tatrahinate dengan menggunakannya

dalam proses metabolisme. Kalsium karbonate sebagai buffer (penyangga) akan membebaskan asam sulfur ketika tetrahinate berkurag. Yang mana saat ini dapat merangsang pertumbuhan *Salmonella* sp dan menghambat jenis bakteri lainnya.

2.8.3 Tahap Media Selektif Agar

Beberapa media agar yang direkomendasikan sebagai media selektif antara lain adalah *Bhismut Sulfit Agar* (BSA), *xylase lysine Desoxycholate* (XLD) dan *Hektoen enteric* (HE).

Pembacaan koloni *Salmonella* sp pada BSA dan koloni berwarna keabu-aban atau kehitaman kadang-kadang metalik, media disekitarkoloni berwarna cokelat kemudian berubah hitam denga semakin lamanya inkubasi (anonim, 1994).

Media ini berfungsi untuk mengisolasi dan mengidentifikasikan pendugaan *Salmonella* sp dan *Sigella* yang lebih spesifik dari pada menggunakan media SCB. *Salmonella* sp dibedakan dari bakteri yang bukan pathogen dengan mempermentasi *xylose dan lysen* dalam media yang menyebabkan terdapat koloni warna pink dalam media. Bakteri yang bukan patogen tidak dapat mempermentasi *xylose dan lysine* keberadaan *Salmonella* sp ditandai dengan adanya indikaror H_2S yang berwarna hitam. XLD mengandung sodium *desoxycholate* untuk menghambat *coliform* tanpa menurunkan kemampuan pertumbuhan *Salmonella* sp (Fachlam, 1990)

Media ini merupakan media selektif yang digunakan untuk mengidentifikasi jenis *Salmonella* sp dan *sigella* dari bakteri patogen yang lainnya. Penambahan karbohidrat (sukrosa dan silisin) akan memberikan perbedaan pada koloni lactosa yang tidak mendapatkan penambahan (Fachlam, 1990). Ada dua indikator yaitu bromthymol blue dan asam *puchsyn* akan memberikan warna yang berbeda pada koloni lactosa positif dan negatif. Peningkatan kandungan laktosa lebih cepat membantu organisme fermentasi laktosa. Tiosulfat dan garam besi akan mendeteksi produksi H_2S pada *Salmonella* sp yang akan membentuk koloni positif yang berwarna hitam. Salah satu sifat

Salmonella sp adalah mampu menghasilkan H_2S yang diindikasikan dengan adanya warna hitam campuran garam bile akan menekan pertumbuhan mikroorganisme lainnya.

Pelaksanaan metode pengujian konfensional, koloni tersangka dari agar selektif dipindahkan ketabung-tabung agar selektif isolasi karakteristik biokimia pendahuluan. Media yang umum digunakan non yaitu *Triple Sugar Iron* (TSI) dan *Lysin Iron Agar* (LIA) (Speck, 1976).

TSI adalah media kultur yang digunakan untuk mengetahui adanya *enterobacteriaceae*. Media ini berfungsi untuk membedakan enterobakter menurut kemampuannya untuk memfermentasi laktosa, sukrosa dan glukosa dengan menghasilkan hidrogen sulfida (H_2S). penurunan gula terbentuk dari adanya produksi oleh adanya phenol red yang akan merubah warna dari orange kemerah-merahan menjadi kuning. Sedangkan pada kondisi alkalin (basa) akan menjadi merah (Chessbough, 1992).

LIA digunakan untuk mendeteksi bersama *dari lysine Decarboxylase* dan produksi H_2S dalam identifikasi *enterebactericeace* khususnya *Salmonella* sp. Pembacaan *Salmonella* sp untuk LIA miring adalah bult bersifat alkalin ditunjukan dengan warna ungu dan slant besifat alkalin ditunjukan dengan warna ungu pula (Anonim, 1994).

2.8.4 Tahap Uji Biokimia

Pada uji biokimia meliputi beberapa tahapan yaitu uji urase, tujuan dari uji urase adalah untuk mengetahui atau mendeteksi mikroorganisme yang mampu memetabolisme urea, dimana mikroorganisme yang memetabolisme urea menyebabkan media berubah warna dari kuning menjadi keruh. Hal ini disebabkan adanya pertumbuhan mikroorganisme tersangka (kloss, 1985). Inokulasi pada media yamg mengandung *Salmonella* sp ditunjukan tidak terjadinya perubahan warna. Reaksi spesifik *Salmonella* sp untuk uji urase memberikan hasil negatif yaitu tidak terjadi perubahan warna dan terjadi

pertumbuhan bakteri, sedangkan untuk hasil positif terjadi perubahan warna media dari merah jingga menjadi ungu sampai merah (Anonim, 1994).

Uji Dulcitol Broth pada hasil pada hasil positif ditujukan dengan perubahan warna dari kuning yang mengbah wananya menjadi ungu karena adanya indikator *bromerssol purple* hasil negatif ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna media (Merck, 1985)

Potassium Cyanide Broth (KCN broth) adalah media yang ditujukan untuk megetahui sensitifikasi mikroorganisme terhadap KCN. Cara kerja KCN terhadap mikroorganisme yang diuji yaitu dihambatnya pertumbuhan beberapa dengan konsentrasi yang sangat lambat dari KCN. Sebagian kecil mikroorganisme yang sensitif dapat tumbuh pada media ini dan menyebabkan kekeruhan. *Salmonella* sp menunjukan reaksi negatif terhadap KCN. Reaksi positif ditunjukan dengan adanya pertumbahan (Anonim, 1994).

Uji pada Malonate Broth terhadap mikrorganisme bila reaksi negaitif tidak terjadi perubahan warna media yaitu tetap berwarna hijau, sedangkan bila hasilnya positif akan bersifat alkalin ditunjukan dengan perubahan warna media yang semula berwarna hijau berubah menjadi biru karena reaksi alkalin dar indikator bromethymol blue. Sebagian besar *Salmonella* sp hasilnya negatif (Speck, 1976).

Media ini digunakan untuk uji indol *yaitu Tryptone Broth.* Media biakan yang kaya akan triptofan. Reaksi positif ditanai dengan terbentuknya cincin kuning. *Salmonella* sp bereaksi negatif terhadap indol (Anonim, 1994).

Uji Methyl Red dan *voges-Proskour* (MR-VP test) adalah uji mengetahui asam campuran. Tujuan uji ini digunakan sebagai pembeda pada kelompok *Coli aerogenes.* Beberapa bakteri menggunakan glukosa untuk membentuk asam dengan menghasilkan penurunan nilai pH mencapai 4,4. Beberapa spesies lain akan memproduksi asam sehingga pHnya akan turun (Chessbough, 1992). Perbedaan ini dapat divisualisasikan denan pnggunaan MR (kuning), pH : ,5,1 dan merah pH :4,4. Banyak mikroorganisme akan memetabolisme glukosa (dektosa) untuk memproduksi acetoin.

Vp bertujuan untuk mengetahui mikroorgisme yang dapa memfermentasi glukosa yang ditambahkan 0% KOH dan 5% larutan alfa naftol dalam etanol dapat menentukan adanya acetion, dimana senyawa ini dapat dideteksi dengan adanya reaksi oksidasi dibawah kondisi basa dan kontak dioksidasi dan menjadi *diachethyl* yang berwarna merah (Chessbough 1992). Pada umumnya *Salmonella* sp akan memberikan reaksi negatif ditandai dengan tidak adanya perubahan warna media menjadi pink.

Pengujian sitrat digunakan untuk mengetahui kemampuan mikroorganisme menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Simmon's Citrate agar merupakan media sintetik, yang dapat menyebabkan penigkaan pH dan mengubah warna dari hijau menjadi warna biru. Kebanyakan *Salmonella* sp memberikan hasil sitrat positif, reaksi negatif tidak atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna media (Bibiana, 1994).

2.8.5 Tahap Uji Serlogi

Uji serologi digunakan untuk mengetahui secara kualitatif dan kuantitatif respon tubuh terhap penyakit infeksi. Uji serologi digunakan dalam diagnostik penyakit infeksi karena reaksinya spesifik, selain itu hasil uji memerlukan waktu yang jauh lebih pendek dari pada uji diagnostik yang biasanya dilakukan. Kontrol positif dan negatif diperlukan dalam pengujian, karena untuk memastikan bahwa cara mengerjakan dan antiserum yang digunakan benar. Hasil pengujian absah bila kontrol positif dan negatif menunjukan hasil yang sesuai (Bibiana, 1994)

Menurut Ratna, *dkk*, (1988) antigen didalam reaksi dapat berupa sel atau partikel. Serotipe *Salmonella* sp ditandai dengan adanya antigen somatik (O) dan flagelar (H) sangat monolog dalam identifikasi. Uji aglutinasi polyvalen somatic (O) dilakukan dengan metode glass obyek yang menggunakan biakan bakteri dari TSI.

2.9 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Pertumbuhan Mikroorganisme

Ada bebrapa faktor (baik faktor fisik maupun faktor fisilogi dan biokoimia) yang mempengaruhi pertumbuhan suatu mikrooganisme, sehingga menyebabkan suatu mikroorganisme dapat tumbuh dan berkembang biak pada suatu bsahan atau sediaan lainnya. Faktor-faktor trsebut atara lain :

2.9.1 Air (a_w)

Mikroorganisme memerlukan air untuk hidup dan berkembang biak, oleh krena itu pertumbuhan mikroorganisme dalam suatu makanan sangat dipengaruhi oleh jumlah air yang dapat digunakan oleh mikroorganisme tersebut. Mikroorganisme mempunyai a_w yang berbeda-beda untuk pertumbuhannya. Dibawah a_w minimal tesebut mikrooganisme tidak akan tumbuh dan berkembang biak dengan baik, meskipun mungkin tidak mati.

Bakteri-bakteri penyebab penyakit seperti *Sataphylococcus aureus*, pada umumnya tidak dapat tumbuh dan berkembng biak dengan baik pada a_w kurang dari 0,90 demikian juga halnya dengan *Pseudomonas* sp yang mepunyai beberapa spesies yang dapat menimbulkan penyakit hanya dapat tumbuh pada a_w minimal 0,97, sedangkan a_w minimal untuk *Escherichia coli* dan *Clostridium botolinum* penyebab intoksikasi yang dapat tumbuh pada a_w yang rendah yaitu kurang dari 0,90 bahkan ada beberapa strain masih dapat tumbuh pada a_w 0,86.

2.9.2 Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor penting di dalam mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme. Suhu dapat mempengaruhi mikroba dalam dua cara yang berlawanan:

1) Apabila suhu naik maka kecepatan metabolisme naik dan pertumbuhan dipercepat. Sebaliknya apabila suhu turun, maka kecepatan metabolism akan menurun dan pertumbuhan diperlambat.

2) Apabila suhu naik atau turun secara drastis, tingkat pertumbuhan akan terhenti, komponen sel menjadi tidak aktif dan rusak sehingga sel-sel menjadi mati.

Berdasarkan hal diatas, maka suhu yang berkaitan dengan pertumbuhan mikroorganisme digolongkan menjadi tiga, yaitu:

a. Suhu minimum yaitu suhu yang apabila berada di bawahnya maka pertumbuhan terhenti.
b. Suhu optimum yaitu suhu dimana pertumbuhan berlangsung paling cepat dan optimum disebut juga suhu inkubasi.
c. Suhu maksimum yaitu suhu yang apabila berada di atasnya maka pertumbuhannya tidak terjadi.

Semua proses pertumbuhan bergantung pada reaksi kimiawi dan area laju reaksi-reaksi ini dipengaruhi oleh suhu, maka pola pertumbuhan bakteri sangat dipengaruhi oleh suhu. Suhu juga mempengaruhi laju pertumbuhan dan jumlah total pertumbuhan organisme. Keragaman suhu dapat juga mengubah proses-proses metabolik tertentu serta morfologi sel. Setiap spesies bakteri tumbuh pada suhu tertentu, atas dasar ini maka bakteri dapat dilasifikasikan sebagai berikut: psikrofil yang tumbuh pada suhu 0^0C-30^0C; mesofil tumbuh pada suhu 25^0C sampai 40^0C; dan thermofil tumbuh pada suhu 50^0C atau lebih.

2.9.3 Atmosfer Gas

Gas-gas yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri adalah oksigen dan karbon dioksida. Berdasarkan atas keberadaan oksigen tersebut maka mikroorganisme dikelompokkan atas beberapa kelompok yaitu:

1) Mikroorganisme yang bersifat aerobik, yaitu mkroorganisme yang memerlukan oksigen yang cukup untuk pertumbhannya
2) Mikroorganisme yang bersifat anaerobik yaitu mikroorganisme yang hanya dapat tumbuh apabila tidak ada oksigen
3) Mikroorganisme yang bersifat fakultatif anaerobik yaitu mikroorganisme baik ada oksigen atau tidak ada oksigen akan tetap tumbuh. Namun pada

umumnya mikroorganisme yang bersifat fakultatif anaerobik akan tumbuh lebih baik pada keadaan anaerobik.

2.9.4 Keasaman atau kebasaan (pH)

pH optimum pertumbuhan bagi kebanyakan bakteri terletak antara 6,5 dan 7,5, namun beberapa spesies dapat tumbu dalam keadaan sangat asam atau sangat alakalin. Kebanyakan spesies nilai pH maksimum dan mnimum ialah antara 4 dan 9.

2.9.5 Kondisi Lain-lain

Beberapa kelompk bakteri mempunyai pesyaratan tumbuh, antara lain: fotoautotrof/fotosintetik (cahaya adalah sumber energinya), bakteri halofilik (hanya tumbuh bila medianya mengandung konsentrasi garam yang tinggi), bakteri yang dipengaruhi tekanan osmotik atau tekanan hidrostatik, halofil obligat tidak akan tumbuh kecuali bila konsentrasi garamnya tinggi, halofil fakultatif (tumbuh dalam lingkungan berkosentrasi garam rendah atau tingi).

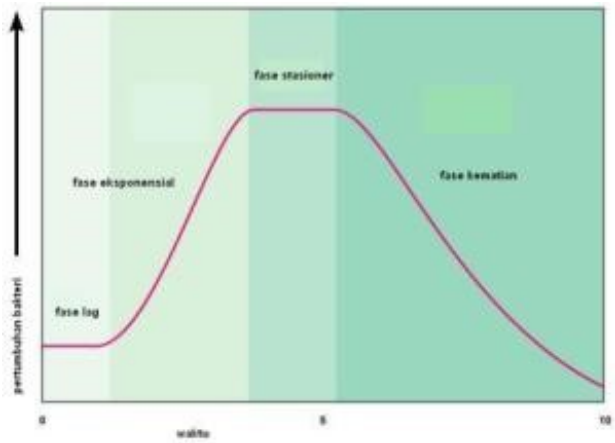
2.10 Pertumbuhan Bakteri

Reproduksi bakteri adalah pembelahan biner melintang; satu sel membelah diri menghasilkan dua sel, bila mulai dengan satu bakteri tunggal maka populasi bertambah secara geometrik:

$2^0 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow 2^3 \rightarrow 2^4 \rightarrow 2^n$

Atau dengan perhitungan sederhana,

$1 \rightarrow 2 \rightarrow 4 \rightarrow 8 \rightarrow 16 \rightarrow 32...$



Gambar 3. Kurva pertumbuhan bakteri (*Media unpad.ac.id/thesis*/PDF)

Tabel 3. Fase pertumbuhan bakteri

Fase Pertumbuhan	Ciri
Lamban (lag)	Tidak ada pertumbuhan populasi Sel mengalami perubahan dalam komposisi kimiawi dan bertambah ukurannya;substansi interseluler bertambah
Logaritma atau eksponensial	Sel membelah dengan laju yang konstan Massa menjadi dua kali lipat dengan laju yang sama Aktifitas metabolik konstan Keadaan pertumbuhan seimbang
Statis	Penumpukan produk beracun dan/atau kehabisan nutrien Beberapa sel mat, sdangkan yang lain tumbuh dan membelah Jumlah sel hidup menjadi tetap
Penurunan atau kematian	Sel mejadi mati lebih cepat dari pada terbentuknya sel-sel baru Laju kematian mengalami percepatan menjadi eksponesial Bergantung kepadaspesiesnya, semua sel mati waktu beberapa hari atau beberapa bulan

2.11 Persyaratan Mutu dan Keamanan Pangan Ikana Beku

Persyaratan dan keamanan pangan ikan beku dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Persyaratan mutu dan keamanan pangan ikan beku (BSN, 2014)

Parameter yang diuji	Satuan	Persyaratan
a. Sensori	-	Min.7 (Skor 1-9)
b. Kimia[a] - Histamin - TVB	 Mg/kg mgN%	 Maks. 100 Maks. 20
c. Fisika - Suhu pusat	 ºC	 Maks. -18
d. Cemaran mikroba - ALT - *Escherichia coli* - *Salmonella* sp - *Vibrio cholera*[a] - *Vibrio parahaemoliticus*[a] - *Listeria monocytogenes*[a, f]	 Koloni/g APM/g Per 25 g Per 25 g APM/g Per 25 g	 Maks. $5,0 \times 10^5$ < 3 Negatif Negatif < 3 Negatif
e. Cemaran logam[a] - Arsen (As) - Kadmium (Cd)	 Mg/kg Mg/kg Mg/kg Mg/kg	 Maks. 1,0 Maks. 0,1 Maks. 0,5[b] Maks. 0,05[d]
e. Cemaran logam[a] - merkuri (Hg) - Timah (Sn) - Timbal (Pb)	 Mg/kg Mg/kg Mg/kg Mg/kg Mg/kg	 Maks. 0,5 Maks. 1,0[b] Maks. 40,0 Maks. 0,3 Maks. 0,4[b] Maks. 0,2[d]
f. Cemaran fisik[a] - Filth		 0
g. Racun hayati[a] - Ciguatoksin[e]		 Negatif
h. parasit - Parasit cacing	 Ekor	 0

CATATAN:

a bila diperlukan

b untuk ikan predator

c untuk ikan *scomroid, clupedidae, scombresocidae, pomatomidae, coryphaenedae*

d untuk ikan yang dibudidayakan

e untuk ikan karang
untuk ikan salmonid.

III. METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat

Pengujian *Salmonella* sp pada Daging Tuna (*Thunnus* sp) Beku dilakukan di Laboratorium Balai Besar Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Makassar, Sulawesi Selatan, mulai tanggal 26 Januari – 26 Maret 2017.

3.2 Metode Penulisan

Untuk memperoleh data tentang analisis pengujian *Salmonea* sp pada Daging Tuna (*Thunnus* sp) Beku digunakan metode pelaksanaan dengan magang yaitu belajar dari lapangan dengan berperan aktif dalam setiap tahapan kegiatan pengujian. Adapun data yang dikumpulkan berupa data primer dan data sekunder yaitu:

1) Data primer adalah data yang dikumpulkan dan disatukan secara lansung dari hasil pengujian di Laboratorium Balai Besar Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Makassar, Sulawesi Selatan.
2) Data sekunder adalah data yang dikumpulkan dan disatukan oleh studi-studi sebelumnya dan beberapa literatur yang menyangkut dengan pengujian *Salmonella* sp

3.3 Alat dan Bahan

Semua alat dan media yang digunakan untuk pengujian *Salmonella* sp harus dalam keadaan steril. Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam pengujian *Salmonella* sp yaitu sebagai berikut:

Alat yang digunakan yaitu:

- Timbangan
- Blender
- Pipet skala
- Petridish
- Tabung reaksi
- Rak tabung reaksi
- Inkubator
- Waterbath

- Jarum ose
- Autoclave
- Alat pengocok (vortex mixer)
- Bunsen
- pH meter
- spatula
- oven
- Hot plate dan stirer

Media dan Pereaksi

- *Bismuth sufite Agar* (BSA)
- *Brain Heart Infusion Broth*
- *Hectoen Enteric* (HE) *Agar*
- *Lactose Broth* (LB)
- *Lysine Iron Agar* (LIA)
- *Malonate Broth*
- *Motility Test Medium*
- *MR-VP broth*
- Phenol red Carbohydrate Broth
- Purple Carbohydrate Broth
- Rapport-Vassiliadis (RV) medium
- Simmon Citrate Agar (SCA)
- Tetrathionate Broth (TTB)
- Triple Sugar Iron Agar (TSIA)
- Tripticase Soy-Triptose Broth
- Tryptone Broth
- Xylose Lysine Desoxycholate (XLD)
- Aquadest
- Ethanol 70%
- Larutan Brilian green dye
- Reagen covacs
- Indikator methyl Red
- Larutan Physiological Saline 0,85%
- Larutan Photasium Hidroxida 40%
- Reagen VP
- Bakteri Kontrol Positif

Bahan yang digunakan dalam pengujian *Salmonella* sp yaitu :

- Fresh Tuna Loin Fish

3.4 Prosedur Kerja (SNI, 2007)

Preparasi contoh

1) Dengan menerapka teknik aseptis, contoh diambill secara acak dan dipotong kecil-kecil hingga berat masing-masing contoh yang akan diuji sesuai ketentuan pada tabel. Contoh beku dilelehkan pada saat akan dianalisa. Pelelehan selama 18 jam pada suhu sekitar 2^0C – 5^0C atau dibawa 45^0C dan tiak lebih dari 15 menit.

Pra pengkayaan

1) Metode ini berdasarkan pada anilasa 25 gram atau 25 ml contoh perbandingan 1 : 9 untuk contoh dan media pengkayaan. Jika pengujian dilakukan secara komposit, maka ditambahkan media pengkayaan yang cukup untuk menjaga perbandingan 1 : 9;
2) Untuk contoh dengan berat lebih kecil atau sama dengan 1 kg atau 1 liter contoh uji dengan 4,5 kh atau 4,5 liter, ditimbang contoh padat sebanyak 25 g atau contoh cair sebanyak 25 liter dari contoh yang akan diuji, kemudian dimasukkan dalam wadah atau plastic steril dam\n dididitambahkan 225 ml larutan *Lactose Broth* (LB);
3) Selama 2 menit contoh dihomogenkan untuk dianalisa. Secara aseptic, dipindahkan larutan contoh dalam wadah steril yang sesuai dan dibiarkan pada suhu ruang selama 60 menit dengan wadah tertutup. Dikocok perlahan dan ditentukan pH sampai (6,8 ± 0,2). Dikocok rata dan dikendurkan tutup wadah secukupnya. Diinkibasi 24 jam ± 2 jam pada suhu 35^0C ± 1^0C. Dilanjutkan pengujian sesuai prosedur;
4) 1 ml isolate kontrol positif dipipet dan dimasukkan dalam larutan *Lactose Broth* (LB) 9 ml, dihomogenkan, diinkubasi selama 24 jam ± 2 jam pada suhu 35^0C ± 1^0C. Dilanjutkan pengujian sesuai prosedur.

Pengkayaan

1) Tutup wadah dikencangkan dan dikocok perlahan contoh dan kontrol positif yang dinkubasi. Untuk produk perikanan dengan tingkat kontaminasi tinggi, dipindahkan 0,1 ml larutan contoh kedalam 10 ml *Rappaport-Vassiliadis* (RV) medium dan 1 ml larutan conoh kedalam 10 ml *Tetrathionate Broth* (TTB);
2) Diinkubasi media pengkayaan selektif sebagai berikut: diinkubasi RV medium selama 24 jam ± 2 jam pada suhu 42^0C ± $0,2^0$C waterbath).

Isolasi *Salmonella* sp

1) Tabung dihomogenkan dengan vortex dan dengan menggunakan jarum ose digores TTB yang diinkubasi dalam media HE, XLD dan BSA. Disiapkan BSA sehari sebelum digunakan dan disimpan di tempat gelap pada suhu ruang;
2) Pada media yang sama digores dari RV broth;
3) Cawan BSA, HE, XLD diinkubasi selam 24 jam ± 2 jam pada suhu 35^0C ± 1^0C;

a) Pengamatan kemungkinan adanya koloni *Salmonella* sp Pengamatan morfologi koloni *Salmonella* sp yang khas (typical). Pengambilan 2 atau lebih koloni *Salmonella* sp dari masing-masing media Agar selektif setelah 24 jam ± 2 jam inkubasi. Koloni-koloni *Salmonella* sp yang khas (typical) adalah sebagai berikut:

- HE Agar. Koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Umumnya kultur *Salmonella* sp membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni berwarna hitam;
- XLD Agar. Koloni merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Umumnya kultur *Salmonella* sp membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni berwarna hitam;
- BSA. Koloni cokelat, abu-abu hitam; kadang-kadang metalik. Biasanya media disekitar koloni pada awalnya berwarna cokelat, kemudian berubah menjadi hitam (halo effect) dengan makin lamanya waktu inkubasi. Apabila

koloni yang khas (typical) tumbuh pada BSA setelah 24 jam ± 2 jam inkubasi, diambill 2 koloni atau lebih. Diinkubasi kembali media BSA selama 24 jam ± 2 jam. Setlah 48 jam ± 2 jam, diambill atau lebih koloni yang khas (typical) yang tumbuh pada media BSA . Pengambilan ini dilakukan hanya bila koloni yang tumbuh pada media BSA yang diinkubasi selama 24 jam ± 2 jam memberikan reaksi yang tidak sesuai pada TSI dan LIA, yang menjadikan kultur ini dinyatakan sebagai bukan *Salmonela* sp.

Pengamatan morfologi koloni *Salmonella* sp yang tidak khas (Typical)

ciri-ciri *Salmonella* sp yang tidak khas adalah sebagai berikut:

- HE dan LXD Agar. Beberapa kultur *Salmonella* sp membentuk koloni berwrna kuning dengan atau tanpa inti hitam. Jika tidak ada koloni khas yang tumbuh pada media HE dan XLD setelah inkubasi 24 jam ± 2 jam atau lebih koloni yang tidak khas
- BSA. Koloni yang tidak khas membentuk koloni yang berwarna hijau dengan sedikit atau tanpa warna kehitaman disekitar media. Jika tidak ada koloni yang khas atau koloni terduga pada media selama 24 jam ± 2 jam, jangan mengambil koloni, tapi inkubasi kembali media selama 24 jam ± 2 jam. Jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BSA setelah inkubasi 48 jam ± 2 jam, Diambil 2 atau lebih koloni yang khas.

a) Pengamatan secara hati-hati bagian tengah koloni dengan menggunakan jarun inkulasi steril dan digoreskan ke permukaan media TSI Agar dengan cara menggores agar mring dan menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, digunakan jarum yag sama untuk menggores media LIA dengan cara menusuk agar tegak lebih dulu setelah itu digoreskan pada agar miring. Karena reaksi *Lysine Decarboxylase* sangat anaerobic, LIA miring harus mempunyai tusukan yang lebih dalam (4 cm) sampai media selektif yang telah diambill koloni pada sushu $5^0C - 8^0C$.

b) TSI dan LIA diinkubasi selama 24 jam ± 2 jam pada suhu $35^0C - 1^0C$ dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya H_2S yang berlebihan. Pada TSI, kultur *Salmonella* sp yang khas memberikan reaksi

alkalin (merah) pada goresan agar miring dan asam (kuning) pada tusukan agar tegak, dengan atau tanpa H_2S (warna kehitaman pada agar). Pada LIA, kultur *Salmonella* sp yang khas memberikan reaksi alkaline (ungu) pada keseleruhan tabung. Rekasi yang bener-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai kultur negatif. Jangan hanya melihat disklorisasi pada tusukan untuk menyatakan kultur negatif. Umumnya kultur *Salmonella* sp terbentuk H_2S pada LIA. Beberapa kultur non *Salmonella* sp membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA. Reaksi TSI dan LIA dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

Tabel 5. Reaksi TSI dan LIA

Media	**Agar miring (goresan)**	**Agar tegak (tusukan)**	**H_2S**
TSI	Alkalin/K(merah)	Asam/A (kuning)	+/-
LIA	Alkalin/K (ungu)	Alkalin/K (ungu)	+/-[a]
[a]umumnya kultur *Salmonella* sp membentuk H_2S pada LIA			

c) Semua kultur yang memberikan reaksi alakalin pada tusukan agar tegak LIA, tanpa memperhatikan reaksi TSI, harus dipertimbangkan sebagai potensial *Salmonella* sp dan harus dilakukan pengujian biokimia. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan agar tegak LIA dan alkalin pada agar miring serta asam pada tusukan agar tegak TSI harus juga dipertimbangkan sebagai potensial *Salmonella* sp dan harus dilakukan uji biokimia. Kultur yang memberikn reaksi asam pada usukan agar tegak LIA dan asam baik pada goresan agar miring dan tusukan agar tegak pada TSI, dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp. Dilakukan pengujian biokimia terhadap kultur presumtif-positif TSI yang sesuai.

Uji Biokimia

d) Tiga kultur presumtif-positif TSI dari 1 set media selektif (HE, XLD dan BSA) yang digores dan RV *broth* untuk produk perikanan dengan tingkat kontaminasi tinggi jika ada tiga kultur presumtif-positif TSI dari media selektif yang digoreskan dari TTB jika ada

e) Jika tiga kultur presumtif-positif tidak terisolasi dari 1 set media selektif, uji presumtif-positif TSI yang lain. Diuji sedikitnya 6 kultur TSI untuk setiap contoh yang dianalisa.

Identifikasi *Salmonella* sp

f) Kultur campuran

Apabila kultur pada TSI agar terlihat tercampur, maka digoreskan kembali kedalam media HE dan XLD agar, diinkibasi 24 jam ± 2 jam pada suhu 35^0C – 1^0C. Diamati koloni yang dianggap *Salmonella* sp

1) HE agar; koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella* sp membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni sterlihat berwarna hitam;
2) XLD agar; koloni merah jambu (pink) dengan aau tanpa inti hitam. Pada umumnya *Salmonella* sp membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat aau hampir semua koloni terlihat berwarna hitam. Sedikitnya 2 koloni terduga *Salmonella* sp dipindahkan pada media TSI dan LIA.

Pengujian kultur

1) Dipindahkan 1 ose dar TSI kedalam media *Dulcitol Broth.* dikendurkan tutupnya dan diinkubasi selama 48 jam ± 2 jam pada suhu 35^0C – 1^0C, tetapi diamati setelah 24 jam. Pada umumnya *Salmonella* sp memberikan hasil positif, dtandai dengan pembentukan gas dalam tabung *durham* dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *durham* dan warna merah (phenol red sebagai indikaor) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media;

2) *Trytone Broth*, dipindahkan 1 ose dari TSI dalam media *Trytone Broth.* Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35^0C – 1^0C dan selanjutnya diikuti prosedur dibawah ini:

a) *Malonate Broth*

1 ose dari TB 24 dipindahkan kedalam media *Malonate Broth.* Selama ± 24 jam diinkubasi pada suhu 35^0C ± 1^0C reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjad biru. Pada umumnya *Salmonella* sp memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna) pada *Broth* ini.

b) Uji *Indol*

5 ml TB 24 jam dipindahkan kedalam tabung kosong dan ditambahkan 0,2 *Reagent Covacs.* Diamati segera setelah penambahan *Reagent*. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella* sp membentuk reaksi negatif (idak terbentuk cincin merah pada permukaan media)

Uji Biokimia Tambahan

1) *Phenol red sucrose* atau *purple sucrose Brot*

1 ose dari TSI Agar miring yang diinkubasi selama 24 jam – 48 jam dipindahkan kedalam *Phenol red sucrose* atau *purple sucrose Broth.* Diinkubasi selama 48 jam ± 2 jam pada suhu 35^0C ± 1^0C, tetapi diamati setelah 24 jam. **Positif** apabila terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung *Durham.* Apabila hanya terjadi pembentukan asam maka dapat dinyatakan positif. Umumnya *Salmonella* sp memberikan hasil negatif, ditunjukan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *durham* dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media. Dinyatakan sebagai **bukan** *Salmonella* sp jika kultur memberikan reaksi asam pada tuskan agar tegak TSI dan reaksi *alkalin* pada LIA

2) *Methyl Red – Viges Proskauer* (MR – VP) *Broth*

1 ose dari TSI agar miring dipindahkam kedalam media *MR-VP Broth* dan diinkubasi selama 48 jam ± 2 jam pada suhu 35^0C ± 1^0C.

- Uji *voges- prokauer* (VP) dilakukan pada suhu ruang sebagai berikut:

1 ml *MR – VP Broth* yang telah diinkubasi selama 48 jam ± 2 jam pada suhu 35^0C ± 1^0C kedalam tabung reaksi steril dan dinkubasi *MR-VP Broth* 48 jam ± 2jam pada suhu 35^0C ± 1^0C untuk pengujian *Methyl Red.* Dididitambahkan 0,6 ml *Alphanaphtol* dan dikocok. Ditambahkan 0,2 ml larutan 40% KOH dan dikocok kemudian untuk mempercepat reaksi, ditambhkan sedikit kristal keratin dan diamati hasilnya setah 4 jam. Perubahan warna menjadi merah mudah *eosin* sampai merah delima (*Ruby)* pada media menunjukan reaksi positif. Umumnya *Salmonella* sp memberikan reaksi VP negatif.

- Uji *Methyl Red* (MR)

  5 tetes – 6 tetes indikator *Methyl Red* ditambahkan kedalam media MR- VP yang telah diinkubasi selama 96 jam. Diamati hasinya dengan segera. Umumnya *Salmonella* sp memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terbentuknya warna kuninng menunjukan reaksi negatif. Dinyatakan sebagai **bukan** *Salmonella* sp kultur yang memberikan reaksi VP positif serta MR negatif.

- *Simmons citrate Agar*

  1 ose dari TSI Agar miring dipindahkan kedalam media *simmons citrate Agar* miring denga cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Dinkubasi selama 96 jam ± 2 jam pada suhu 35^0C ± 1^0C. **Positif** apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dari hijau menjadi biru. Umumnya *Salmonella* sp memberikan hasil ***citrate*** positif. **Negatif** apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.