

PharmaCine

Journal of Pharmacy, Medical and Health Science

https://journal.unsika.ac.id/ Volume 05 Nomor 02 September 2024 ISSN: 2746-4199

Original Artikel

Identifikasi Kandungan Bakteri Vibrio cholerae Pada Produk Olahan Pepes Ikan Tuna (Thunnus sp.)

Kiki Haetami^{1*}, Inas Maya Tamimah Hanun¹ Email Koresponden: kiki.haetami@gmail.com ¹Universitas Padjadjaran

Abstrak

Ikan tuna (*Thunnus* sp.) menjadi salah satu hasil perikanan yang potensial karena memiliki kandungan protein tinggi. Ikan tuna dapat diolah menjad berbagai macam olahan salah satunya pepes ikan yang merupakan hidangan tradisional Indonesia. Produk olahan hasil perikanan seperti pepes juga dapat mengalami penurunan mutu yang salah satunya dapat disebabkan oleh adanya bakteri, seperti bakteri *Vibrio cholerae. Vibrio cholerae* merupakan patogen oportunis di lingkungan muara dan laut. Bakteri tersebut dapat ditransfer ke dalam matriks makanan sehingga menyebabkan penyakit jika dikonsumsi oleh manusia. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi kandungan bakteri *Vibrio cholerae* pada produk olahan pepes ikan tuna. Hasil uji biokimia berdasarkan SNI 01-2332.4-2006 menunjukkan bahwa pada pepes ikan tuna yang berasaldari salah satu UMKM di Daerah Istimewa Yogyakarta tidak mengandung atau negatif *Vibrio cholerae* sehingga layak untuk dipasarkan dan dikonsumsi oleh manusia.

Kata Kunci: Hasil Perikanan, Ikan Tuna, Mikrobiologi, Produk Olahan, Vibrio cholerae.

Identification of the Bacterial Content of Vibrio cholerae On Tuna Fish Pepes (Thunnus sp.)

Abstract

Tuna (*Thunnus* sp.) is one of the potential fishery products because it has a high protein content. Tuna fish can be processed into various kinds of processing, one of which is pepes ikan which is a traditional Indonesia dish. Processed fishery products such as pepes can also experience a decrease in quality, one of which can be caused by the presence of bacteria, such as *Vibrio cholerae* bacteria. *Vibrio cholerae* is an opportunistic pathogen in estuarine and marine environments. These bacteria can be transferred into the food matrix causing illness if consumed by humans. The purpose of this study is to identify the content of *Vibrio cholerae* bacteria in tuna fish pepes processed products. The results of biochemical tests based on SNI 01-2332.4-2006 show that tuna fish pepes originating from one MSME in the Special Region of Yogyakarta does not contain or are negative for Vibrio cholerae so that it is suitable for marketing and human consumption.

Keywords: Microbiology, Fishery Products, Processed Products, Tuna Fish, Vibrio cholerae.

Pendahuluan

Ikan tuna (*Thunnus* sp.) merupakan salah satu hasil perikanan tangkap yang potensial karena memiliki kandungan gizi yang tinggi, seperti memiliki kandungan protein yang tinggi dan lemak yang rendah,

lengkap dengan asam amino essensial, omega-3 jenis EPA dan DHA, serta vitamin B6 dan mineral (Adhawati, 2019). Kandungan gizi tinggi yang dimiliki ikan tuna tersebut salah satunya dapat berguna untuk mencegah diabetes melitus tipe 2 dan

obesitas. Hal tersebut dikarenakan ikan tuna memiliki kandungan **EPA** (Eicosapentaenoic acid) yang cukup tinggi yang dapat berfungsi untuk menstimulasi hormon leptin, yaitu sebuah hormon membantu meregulasi yang asupan makanan, sehingga tubuh akan terhindar dari konsumsi makanan secara berlebihan yang menyebabkan obesitas (Sulistiyati et al. 2022).

Dalam rangka memenuhi ketersediaan pangan berbahan dasar ikan, ikan diolah menjadi berbagai produk dapat olahan salah satunya adalah pepes ikan. Pepes ikan merupakan salah satu teknik pengolahan ikan tradisional khas Indonesia yang diberi beberapa bumbu atau rempah serta biasanya dibungkus dengan daun pisang yang kemudian dimasak dengan cara dikukus atau dibakar. Teknik pengolahan dengan cara tersebut memungkinkan ikan untuk menyerap rasa dari bumbu yang digunakan serta mempertahankan kelembapan dan kelembutan dari daging ikan (Kurniawan & Wardhana, 2017).

Produk olahan hasil perikanan seperti pepes juga dapat mengalami penurunan mutu karena kadar air masih tinggi dan rentan terkontaminasi bakteri *Vibrio cholera* yang merupakan patogen oportunis di lingkungan muara dan laut. Bakteri tersebut dapat ditransfer ke dalam matriks makanan sehingga menyebabkan penyakit iika dikonsumsi oleh manusia. Vibrio cholerae adalah salah satu dari beberapa patogen utama yang ditularkan melalui makanan pada makanan laut yang kurang matang. Bakteri ini dapat menyebabkan gastroenteritis akut yang ditandai dengan adanya sakit kepala, diare, mual, muntah serta demam (Chowdhury, 2017). Vibrio cholerae sebagai bakteri juga penyebab kolera sangat mudah sehingga pernah menyebabkan berpindah sejak abad akhir ke 19-an di pandemi berbagai belahan bumi (Azra, 2023). Pepes ikan lebih rentan mengalami penurunan mutu akibat Vibrio cholerae dibandingkan dengan olahan lain yang disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya karena memiliki kandungan air yang tinggi. Pepeps ikan cenderung akan mempertahankan dibungkus kelembapannya karena menggunakan daun pisang yang merupakan penyebab air. Tingginya media kaya kandungan air tersebut dapat menjadi Vibrio penyebab pertumbuhan bakteri cholerae yang dapat berkembang secara alami

pada lingkungan lembap dan basah (Setiawan & Sutrisno, 2017).

Identifikasi bakteri *Vibrio cholerae* dapat dilakukan berdasarkan Standar Nasional (SNI 01-2332.4-2006) agar dapat memberikan jaminan mutu dan keamanan pangan terhadap komoditas yang akan dipasarkan.

Metode

Pengambilan Sampel

Sampel pepes ikan tuna diambil dari salah satu UMKM di Daerah Istimewa Yogyakarta. Sampel dibeli di tempat produksi UMKM secara langsung dan dibawa ke Laboratorium Pembinaan dan Pengujian Mutu Hasil Perikanan (LPPMHP) dengan menggunakan kantong plastik berbahan polietilen kemudian diuji berdasarkan SNI 01-2332.4-2006, 24 jam setelah sampai di laboratorium.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu timbangan, stomacher, mikropipet dan mikrotips (100-1000 µl), rak tabung reaksi, inkubator, vortex, bunsen, water bath, laminar, jarum ose (loop dan lurus), serta pipet. Adapun bahan yang digunakan yaitu sampel pepes ikan tuna, *Alkaline Peptone Water* (APW), *Thiosulfate Citrate*

Bile Salt Sucrose (TCBS), Trypticase (tryptic) Soy Agar (TSA), NaCl, Triple Sugar Iron (TSI), Kligger Iron Agar (KIA), Trypticase (tryptic) Soy Broth (TSB), MR-VP Broth, Alphanaphtol, KOH 40%, Kristal kreatin, dan Tryptone Broth (TB).

Prosedur Pengujian

Prosedur yang perlu dilakukan dalam pengujian bakteri *Vibrio cholerae* berdasarkan SNI 01-2332.4-2006.

1. Persiapan Sampel

Diambil sampel sebanyak 25 gram dan dihomogenkan dengan 225 ml *Alkaline Peptone Water* (APW) menggunakan *stomacher* selama 2 - 3 menit. Homogenat ini merupakan larutan dengan pengenceran 1 : 10.

2. Pengkayaan

Disiapkan 1 set pengenceran dengan cara melarutkan 1 ml dari homogenat sebelumnya kedalam 9 ml *Alkaline Peptone Water* (APW) kemudian diinkubasi pada suhu 36°C ± 1°C selama 6 - 8 jam.

3. Isolasi

Diambil 1 ose dari setiap tabung yang positif (berwarna keruh) pada setiap

pengenceran sedalam 1 cm dari permukaan cairan dan goreskan ke dalam TCBS agar. Diinkubasikan TCBS agar pada suhu 36°C ± 1°C selama 18 - 24 jam.

4. Pemurnian

Secara hati-hati diambil 3 koloni terduga atau lebih dari setiap TCBS agar, goreskan ke dalam T1N1 agar atau TSA + 1,5% NaCl (total mengandung NaCl 2%) kemudian diinkubasi selama 18–24 jam pada suhu 36°C ± 1°C.

5. Uji Biokimia Pendahuluan

Diinokulasikan koloni dari T1N1 agar atau TSA + NaCl 1,5 % dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak media TSI agar dan KIA. Inkubasikan pada suhu 36° C \pm 1° C selama 18-24 jam.

6. Uji Biokimia Lanjutan

Digoreskan kembali kultur dari T1N1 agar atau TSA + NaCl 1,5 % ke TSA dan TSB. Inkubasikan pada suhu 36°C ± 1°C selama 18 jam - 24 jam.

a. Uji Toleransi terhadap Garam
 Diinokulasikan kultur dari TSB
 kedalam 3 tabung yang masing masing mengandung Tryptone Broth
 1% yang ditambahkan NaCl 0, 1 dan

- 3% (T1N0, T1N1, T1N3). Inkubasikan pada suhu $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, selama 18-24 jam.
- b. Uji Pertumbuhan pada Suhu 42°C Inokulasikan 1 ose dari TSB yang telah diinkubasikan selama 24 jam kedalam TSB yang telah dihangatkan dalam Waterbath 42°C. Inkubasikan pada suhu 42°C dalam Waterbath selama 24 jam. Reaksi positif ditandai dengan terjadinya kekeruhan yang menunjukkan adanya pertumbuhan.

c. Uji voges-proskauer

Diinokulasikan 1 ose dari TSA + 1,5% NaCl kedalam MR-VP broth Inkubasikan pada suhu 36°C ± 1°C selama 2 hari. Pindahkan 1 ml dari MR-VP setiap broth yang menunjukkan pertumbuhan ke dalam tabung reaksi ukuran 13 x 100 mm steril. Ditambahkan 0,6 ml larutan alphanaphtol dan 0,2 ml KOH 40% lalu kocok. Tambahkan sedikit kristal kreatin untuk mempercepat reaksi. Dikocok kembali dan didiamkan selama 2 jam.

7. Data diinterpretasikan dan diambil kesimpulan.

Hasil

Berdasarkan hasil pada proses pengkayaan pada media *Alkaline Peptone Water* (APW), didapatkan reaksi positif *Vibrio cholerae*, yang ditandai dengan larutan berwarna keruh serta terdapat gelembung yang melayang yang dapat dilihat pada gambar dibawah.



Gambar 1. Hasil positif *Vibrio* pada proses pengkayaan (dalam media APW)

Setelah terlihat hasil yang positif pada proses pengkayaan dengan media APW, dilanjutkan dengan menananm koloni positif tersebut pada media Thiosulfate Citrate Bile Salt (TCBS) Sucrose dengan cara menggoresnya menggunakan jarum ose dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C. Kemudian hasil pada media TCBS adalah positif yang ditandai dengan koloni berbentuk bulat agak datar, berukuran agak besar, tengah koloni kuning terang, tepi

koloni kuning gelap yang dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 2. Hasil positif *Vibrio* pada proses isolasi (dalam media TCBS)

Karena sampel pepes ikan tuna terduga positif koloni Vibrio cholerae maka dilakukan uji lanjut dengan menanam koloni tersebut pada media Trypticase (tryptic) Soy Agar (TSA) miring + NaCl 2% untuk proses pemurnian, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C. Setelah 24 jam digoreskan pada media Triple Sugar Iron (TSI) dan Kligger Iron Agar (KIA) sebagai uji biokimia pendahuluan serta dimasukkan pula secara bersamaan pada media Trypticase (tryptic) Soy Broth (TSB) dan MR-VP Broth sebagai uji biokimia lanjutan dan diinkubasi selama 18–24 jam pada suhu 36°C. Pada saat bersamaan, dimasukkan media TSB kosong kedalam water bath dengan suhu 42°C, kemudian diinokulasikan sampel dari media TSB yang telah diinkubasi pada inkubator

ke dalam TSB kosong yang telah dihangatkan pada water bath dengan suhu 42°C lalu diinkubasikan kembali dengan suhu yang sama yaitu 42°C pada water bath.

Hasil dari proses pemurnian pada media uji *Trypticase (tryptic) Soy Agar* (TSA) positif, yang ditunjukkan dengan adanya reaksi sensitif (terbentuknya zona di sekitar tabung reaksi).



Gambar 3. Hasil pemurnian *Vibrio cholerae* pada Media TSA

Hasil dari uji biokimia pendahuluan dan uji biokimia lanjutan pada sampel bersifat negatif *Vibrio cholerae*, ditunjukkan dengan terdapatnya warna hitam pada media TSI dan KIA serta tidak berwarna keruh pada MR-VP *broth* dan *Trypticase (tryptic) Soy Broth* (TSB) yang dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 4. Hasil Uji Biokimia Lanjutan *Vibrio* cholerae pada Media MR-VP broth

Pembahasan

Langkah pertama dari uji Vibrio cholerae berdasarkan SNI 01-2332.4-2006 yaitu pengkayaan dengan proses menggunakan media Alkaline Peptone Water (APW) karena media ini merupakan media yang mengandung pH tinggi yaitu sekitar 8,6 sehingga dapat mendukung pertumbuhan Vibrio spp. dengan cepat sementara menghambat pertumbuhan bakteri Sebagaimana menurut Rahmawati (2021) yang mengatakan bahwa APW memiliki kandungan utama berupa peptone sebagai sumber nitrogen dan karbon, natrium klorida (NaCl) untuk menciptakan kondisi garam yang sesuai, dan air basa yang diatur pada pH 8,6. Kombinasi tersebut sangat ideal untuk pertumbuhan bakteri Vibrio dan mencegah pertumbuhan bakteri non-Vibrio. **Proses** pengayaan menggunakan APW sering kali merupakan langkah awal dalam isolasi Vibrio dari sampel klinis atau lingkungan. Proses

pengkayaan dengan menggunakan APW sangat penting dalam pengujian bakteri *Vibrio* karena *Vibrio* biasanya terdapat dalam jumlah yang sangat kecil dalam sampel, sehingga memerlukan pengayaan untuk dapat dideteksi.

Setelah dilakukan proses pengkayaan selanjutnya sampel diisolasi pada media agar Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) yaitu media selektif dan diferensial yang digunakan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi Vibrio spp., terutama Vibrio cholerae dan Vibrio parahaemolyticus dari sampel lingkungan, makanan, serta klinis. Media TCBS dibuat untuk memfasilitasi pertumbuhan Vibrio spp. sambil menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain. Sampel terduga positif Vibrio cholerae akan berwarna kuning pada media TCBS ini, sedangkan untuk Vibrio parahaemolyticus atau Vibrio vulnificus koloni akan berwarna hijau atau biru (Ottaviani et al. 2018).

Tryptic Soy Agar (TSA) merupakan media pertumbuhan bakteri non-selektif yang digunakan secara luas dalam mikrobiologi untuk mengkultur berbagai jenis bakteri, baik bakteri patogen maupun non-patogen. Media tersebut mendukung pertumbuhan beragam mikroorganisme karena mengandung nutrisi

mendukung penting yang pertumbuhan hampir semua bakteri aerob dan anaerob fakultatif. TSA mendukung pertumbuhan berbagai mikroorganisme tanpa menekan jenis bakteri tertentu. Karena itu, TSA digunakan untuk isolasi, pemeliharaan, dan studi karakteristik koloni mikroorganisme dalam laboratorium. TSA sering digunakan dalam kombinasi dengan media selektif dan diferensial untuk mengisolasi dan mengidentifikasi Vibrio spp. tepatnya pada proses pemurnian (DeMan, 2017).

Media selanjutnya yang digunakan untuk uji Vibrio cholerae pada uji biokimia pendahuluan yaitu TSI dan KIA. Triple Sugar Iron (TSI) agar dan Kligler Iron Agar (KIA) adalah media diferensial yang digunakan dalam mikrobiologi untuk mengidentifikasi bakteri enterik, termasuk spesies Vibrio. ini Kedua media membantu dalam mendeteksi fermentasi gula, produksi gas, dan produksi hidrogen sulfida (H₂S), yang merupakan karakteristik penting dalam identifikasi bakteri. Sampel terduga positif Vibrio cholerae pada media ini akan menghasilkan asam (warna kuning) pada agar miring maupun agar tegaknya serta tidak menghasilkan warna hitam yang berarti

menunjukkan adanya gas dan H₂S (Forbes *et al.* 2016).

Media yang digunakan pada uji biokimia lanjutan yaitu Trypticase (tryptic) Soy Broth (TSB) dan MR-VP broth. Tryptic Soy Broth (TSB) adalah media pertumbuhan yang kaya nutrisi yang digunakan untuk berbagai mikroorganisme, termasuk Vibrio cholerae. TSB digunakan untuk mengkultur Vibrio cholerae sebelum dilakukan uji lebih lanjut. TSB mendukung pertumbuhan yang cepat dan ekstensif dari Vibrio cholerae karena kandungan nutrisinya yang kaya. MR-VP broth digunakan untuk menentukan jalur fermentasi glukosa oleh Vibrio cholerae yaitu Tes Methyl Red (MR) untuk menguji produksi asam yang stabil dari fermentasi positif glukosa. Hasil (warna menunjukkan fermentasi asam campuran dan Tes Voges-Proskauer (VP) untuk menguji produksi asetoin (hasil antara dari fermentasi butanediol). Hasil positif (warna merah) menunjukkan produksi asetoin dan 2,3butanediol. Uji VP tersebut bersifat variabel (Forbes et al. 2016).

Berdasarkan hasil yang didapat, produk olahan pepes ikan tuna ditemukan positif Vibrio cholerae pada media TCBS dan TSA namun isolat bersifat negatif pada saat

uji lanjut. Terdapat beberapa alasan yang memungkinkan menjadi penyebab dari adanya kasus tersebut, diantaranya karena TCBS adalah media selektif tetapi tidak 100% spesifik untuk Vibrio spp. Beberapa bakteri lain dapat tumbuh dan menghasilkan koloni dengan karakteristik serupa. Selain itu mungkin terjadi kontaminasi selama inokulasi atau kesalahan teknik laboratorium yang dapat menyebabkan hasil positif palsu pada TCBS (Baron, 2017). Kemudian selain Vibrio cholerae, ada beberapa bakteri yang dapat memiliki ciri yang sama saat tumbuh pada media TCBS atau TSA sehingga dapat menyebabkan hasil positif palsu pada media selektif namun memberikan hasil negatif pada uji biokimia lanjutan yaitu Vibrio parahaemolyticus, Aeromonas spp., Plesiomonas shigelloides, serta Enterobacteriaceae misalnya Klebsiella spp. dan Escherichia coli (Ottovani et al., 2018).

Produk olahan pepes ikan tuna yang diidentifikasi telah terbukti negatif *Vibrio* cholerae setelah melewati serangkaian uji berdasarkan SNI. Artinya, produk olahan pepes ikan tuna yang diproduksi oleh UMKM dan dipasarkan di daerah Yogyakarta aman untuk dikonsumsi. *Vibrio* spp., termasuk *Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus*,

dan Vibrio vulnificus, adalah patogen yang dapat menyebabkan penyakit serius jika dikonsumsi melalui makanan laut yang terkontaminasi. Sehingga proses pengolahan yang tepat sangat penting untuk memastikan produk olahan bebas dari Vibrio spp. Salah satu langkah pengolahan dapat dilakukan agar makanan yang berasal dari laut tidak mengandung bakteri Vibrio cholerae, yaitu dengan memanaskan produk hingga suhu internal minimal 63°C selama 15 detik atau lebih sehingga dapat membunuh Vibrio spp. dan patogen lainnya dalam ikan yang berasal dari laut (FDA, 2020).

Simpulan

Identifikasi bakteri *Vibrio cholerae* dilakukan pada produk olahan pepes ikan tuna yang berasal dari salah satu UMKM di Daerah Istimewa Yogyakarta, berdasarkan SNI 01-2332.4-2006. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa produk olahan pepes ikan tuna terbukti negatif *Vibrio cholerae* pada uji biokimia pendahuluan maupun lanjutan sehingga produk tersebut layak untuk dipasarkan dan dikonsumsi.

Ucapan Terimakasih

Terima kasih kepada pihak Laboratorium Pembinaan dan Pengujian Mutu Hasil Perikanan (LPPMHP) Dinas Kelautan dan Perikanan Yogyakarta yang telah mengizinkan pelaksanaan dan membantu dalam proses pengujian.

Daftar Pustaka

- Adhawati SS. (2019). Program pengembangan usaha produk intelektual kampus (PPMU-PPUPIK): Produk Tuna Nut Cookies. J Pengabdi Kepada Masy 3(1).
- 2. Azra, J. M. (2023). *Bahaya Keamanan Pangan*. Penerbit NEM.
- 3. Baron, E. J., & Finegold, S. M. (2017).

 **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. Mosby.
- Chowdhury, F.R., Nur, Z., Hassan N., von Seidlein, L., & Dunachie, S. (2017). Pandemics, pathogenicity & changing molecular epidemiology of cholera in the era of global warming.
 Ann Clin Microbiol Antimicrob, 16:10.
- 5. DeMan, J. C. (2017). Microbial Growth on Tryptic Soy Agar. *Journal of General Microbiology*, 64(2), 223-228.

Vol. 05 No.02, hlm 79-88

ISSN: 2746-4199

- Food and Drug Administration (FDA).
 (2020). "Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guide."
- 7. Forbes, B. A., Sahm, D. F., & Weissfeld, A. S. (2016). *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* (14th ed.). Elsevier Health Sciences.
- 8. Kurniawan, A., & Wardhana, D. (2017). Teknologi pengolahan pepes ikan dalam industri rumahan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 20(1), 85-94.
- Ottaviani, D., Leoni, F., Rocchegiani, E.,
 & Canonico, C. (2018). Improved detection of pathogenic Vibrio species in seafood with the use of selective Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) agar. Food Microbiology, 72, 124-130.
- Rahmawati, A., & Suhartono, S. (2021).
 Media APW dalam pengayaan bakteri
 Vibrio spp. pada analisis epidemiologi.
 Jurnal Epidemiologi dan Kesehatan
 Lingkungan, 12(1), 78-85.
- 11. Setiawan, A., & Sutrisno, T. (2017). Pengaruh proses pengolahan terhadap pertumbuhan *Vibrio cholerae* pada pepes ikan. *Jurnal Pengolahan Pangan*, 12(1), 22-30.

12. Sulistiyati, T. D., Tambunan, J. E., Hardoko, M., Suprayitno, E., Sasmito, B. B., Chamidah, A.,& Kusuma, Z. R. A. (2022). Karakteristik organoleptik abon ikan tuna (*Thunnus* sp.) dengan penambahan jantung pisang. *JFMR* (*Journal of Fisheries and Marine Research*), 6(1), 10-19.