





Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Syarat mutu	1
4 Pengambilan contoh	1
5 Cara uji	1
6 Syarat lulus uji	2
7 Higiene.....	2
8 Pengemasan.....	2
9 Syarat penandaan	2
Lampiran A (normatif) Cara pengambilan contoh tempe kedelai	3
Lampiran B (normatif) Cara uji tempe kedelai	5
Bibliografi.....	33
Gambar A.1 - Contoh perhitungan.....	4
Tabel 1 - Syarat mutu tempe kedelai.....	1
Tabel A.1 - Jumlah contoh yang harus diambil.....	3
Tabel B.1 - APM per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1; 0,01; dan 0,001 g/ml contoh	23
Tabel B.2 - Reaksi biokimia dan serologi untuk <i>Salmonella sp.</i>	31
Tabel B.3 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non <i>Salmonella sp.</i>	32

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) ini merupakan revisi SNI 01 – 3144 – 1998, *Tempe kedele*.

Tujuan penyusunan standar ini adalah:

- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Diversifikasi produk/pengembangan produk;
- Mendukung perkembangan industri tempe kedelai

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan hal-hal yang tertera dalam:

1. Undang-Undang Republik Indonesia No. 5 Tahun 1984 tentang Perindustrian
2. Undang-Undang Republik Indonesia No. 23 Tahun 1992 tentang Kesehatan
3. Undang-undang Republik Indonesia No.7 Tahun 1996 tentang Pangan.
4. Undang-undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
5. Peraturan Pemerintah No.69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan
6. Peraturan Pemerintah No. 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan
7. Keputusan Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan No. 03725/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimum Cemaran Logam Berat dalam Makanan dan Minuman atau revisinya.
8. Keputusan Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan No. 03726/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimum Cemaran Mikroba dalam Makanan dan Minuman atau revisinya.

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis 67 - 04 Makanan dan minuman. Standar ini telah dibahas melalui rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 27 November 2008 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, Lembaga IPTEK, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 24 Juni 2009 sampai dengan tanggal 22 Agustus 2009 dengan hasil RASNI.

Tempe kedelai

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji tempe kedelai.

2 Istilah dan definisi

2.1

tempe kedelai

produk yang diperoleh dari fermentasi biji kedelai dengan menggunakan kapang *Rhizopus sp.*, berbentuk padatan kompak, berwarna putih sedikit keabu-abuan dan berbau khas tempe

3 Syarat mutu

Syarat mutu tempe kedelai sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 - Syarat mutu tempe kedelai

No.	Kriteria Uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bau	-	normal, khas
1.2	Warna	-	normal
1.3	Rasa	-	normal
2	Kadar air (b/b)	%	maks. 65
3	Kadar abu (b/b)	%	maks. 1,5
4	Kadar lemak (b/b)	%	min. 10
5	Kadar protein (N x 6,25) (b/b)	%	min. 16
6	Kadar serat kasar (b/b)	%	maks. 2,5
7	Cemaran logam		
7.1	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,2
7.2	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 0,25
7.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40
7.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,03
8	Cemaran arsen (As)	mg/kg	maks. 0,25
9	Cemaran mikroba		
9.1	Bakteri <i>coliform</i>	APM/g	maks. 10
9.2	<i>Salmonella sp.</i>	-	negatif/25 g

4 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan Lampiran A.

5 Cara uji

Cara uji untuk tempe kedelai seperti di bawah ini:

- a) Persiapan contoh sesuai Lampiran B.1
- b) Cara uji keadaan sesuai Lampiran B.2
 - Cara uji bau sesuai Lampiran B.2.1
 - Cara uji warna sesuai Lampiran B.2.2

- Cara uji rasa sesuai Lampiran B.2.3
- c) Cara uji kadar air sesuai Lampiran B.3
- d) Cara uji kadar abu sesuai Lampiran B.4
- e) Cara uji kadar lemak sesuai Lampiran B.5
- f) Cara uji kadar protein sesuai Lampiran B.6
- g) Cara uji kadar serat kasar sesuai Lampiran B.7
- h) Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran B.8
 - Cara uji kadmium (Cd) dan timbal (Pb) sesuai Lampiran B.8.1
 - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran B.8.2
 - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran B.8.3
- i) Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran B.9
- j) Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran B.10
 - Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran B.10.1
 - Cara uji bakteri *coliform* sesuai Lampiran B.10.2
 - Cara uji *Salmonella sp.*, sesuai Lampiran B.10.3

6 Syarat lulus uji

Tempe kedelai dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Pasal 3.

7 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

8 Pengemasan

Tempe kedelai dikemas dalam kemasan yang tertutup baik, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman dan tahan selama penyimpanan dan pengangkutan.

9 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.

Lampiran A (normatif)

Cara pengambilan contoh tempe kedelai

A.1 Prinsip

Pengambilan contoh tempe kedelai yang dikemas berdasarkan jumlah lot.

A.2 Cara kerja

A.2.1 Cara pengambilan contoh

Pengambilan contoh menggunakan alat yang bersih dan kering, dilaksanakan di tempat yang terlindung dari hal-hal yang dapat mempengaruhi contoh.

Contoh diambil berdasarkan jumlah lot/ tanding dan sesuai dengan jenis uji yang akan dilakukan. Contoh diambil di beberapa tempat dari seluruh lapisan secara acak dengan masing-masing bobotnya kira-kira sama.

Contoh diambil beberapa kemasan pada periode waktu yang sama dengan cara sebagai berikut:

- tentukan total produksi (per satu *batch*) dalam 1 *shift*
- tentukan jumlah lot berdasarkan jumlah total produksi. Pengambilan contoh dengan jumlah kemasan dalam lot kurang dari 1000 maka jumlah contoh yang diambil sesuai Tabel A.1. Apabila jumlah 1 lot lebih dari 1000 kemasan, maka dibuat lot dengan jumlah yang sama.
- hitung sejumlah akar pangkat dua dari jumlah kemasan per Lot dengan maksimum 30 kemasan
- ambil contoh secara acak
- kumpulkan dan hitung contoh-contoh yang sudah diambil. Apabila jumlah contoh terlalu banyak maka ambil secara acak sejumlah akar pangkat dua dari jumlah contoh yang dikumpulkan. Pengacakan contoh diulangi lagi sampai diperoleh maksimum 30 kemasan.

Tabel A.1 - Jumlah contoh yang harus diambil

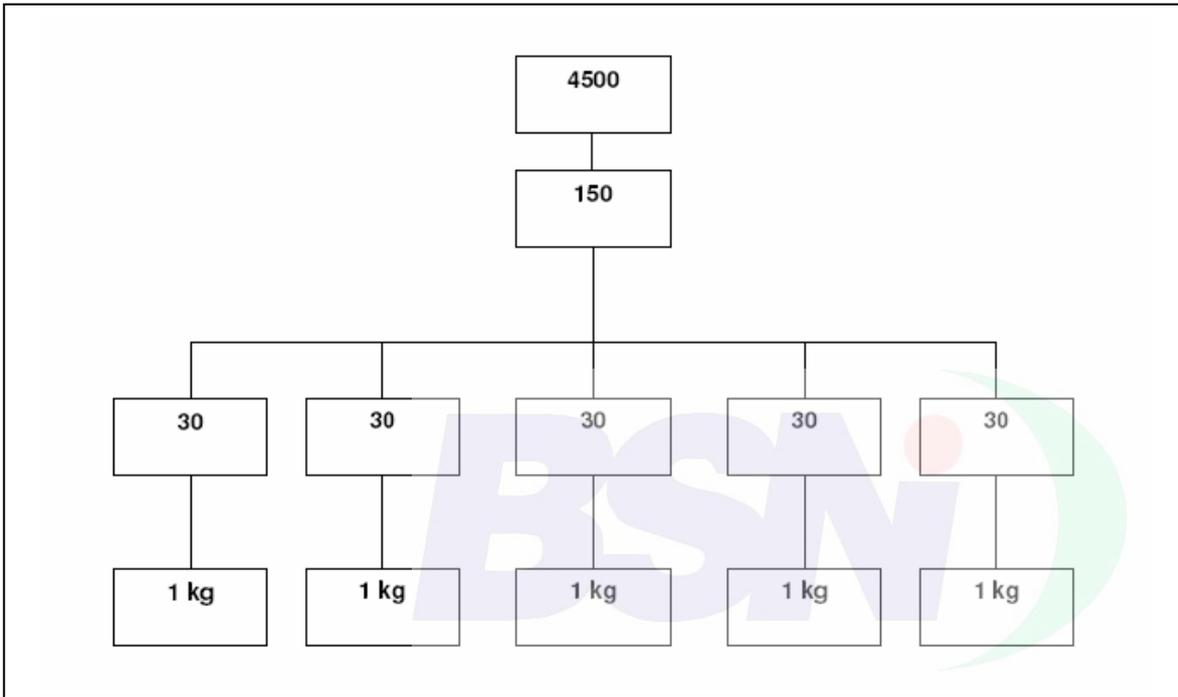
No.	Jumlah contoh per lot	Jumlah contoh yang diambil
1	s/d 10	Semua contoh
2	11 - 25	5
3	26 - 50	7
4	51 - 100	10
5	> 100	Akar pangkat dua dari jumlah contoh

A.2.2 Pengemasan contoh

Contoh dikemas sedemikian rupa sehingga terlindung selama pengangkutan serta diberi label yang mencantumkan tanggal pengambilan contoh dan keterangan lain sesuai dengan ketentuan yang berlaku. Berat masing-masing contoh minimal 1 kg.

A.2.3 Contoh Perhitungan

Dalam gudang terdapat 4500 kemasan tempe kedelai, jumlah lot dibagi dengan bilangan sehingga tidak melebihi 1000 kemasan, misalkan untuk 4500 kemasan dibagi dengan 5 diperoleh 900 kemasan. Jumlah tersebut di akar pangkat 2 akan diperoleh $\sqrt{900} = 30$ kemasan, maka jumlah kemasan yang diambil contohnya $5 \times 30 = 150$ kemasan (Gambar A.1).



Gambar A.1 - Contoh perhitungan

Keterangan:

Dari setiap 30 kemasan diambil contohnya secara acak sehingga diperoleh minimal 1 kg, kemudian dikemas dan dibawa ke Laboratorium Pengujian Mutu (LPM) (5 contoh).

Lampiran B (normatif)

Cara uji tempe kedelai

B.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan analisis kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan analisis kimia.

B.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan tempe kedelai secara aseptik dan ambil contoh tempe kedelai sebanyak 400 g kemudian hancurkan dan tempatkan dalam botol contoh yang steril.

B.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik

Buka kemasan tempe kedelai dan ambil contoh tempe kedelai.

B.1.3 Persiapan contoh untuk analisis kimia

Buka kemasan tempe kedelai dan ambil contoh tempe kedelai sebanyak 400 g kemudian hancurkan dan tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

B.2 Keadaan

B.2.1 Bau

B.2.1.1 Prinsip

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penciuman.

B.2.1.2 Cara kerja

- Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

B.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- Jika tidak tercium bau asing, hasil dinyatakan "normal"; dan
- jika tercium bau asing, hasil dinyatakan "tidak normal".

B.2.2 Warna

B.2.2.1 Prinsip

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penglihatan.

B.2.2.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) lihat contoh uji untuk mengetahui warnanya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

B.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika warnanya putih atau keabu-abuan, hasil dinyatakan “normal”; dan
- b) jika warnanya lain dari putih atau keabu-abuan, hasil dinyatakan “tidak normal”.

B.2.3 Rasa

B.2.3.1 Prinsip

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera pengecap (lidah).

B.2.3.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan rasakan dengan indera pengecap; dan
- b) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

B.2.3.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak terasa rasa asing, hasil dinyatakan “normal”; dan
- b) jika terasa rasa asing, hasil dinyatakan “tidak normal”.

B.3 Kadar air

B.3.1 Prinsip

Kadar air dihitung berdasarkan bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada suhu (100 ± 5) °C.

B.3.2 Peralatan

- a) Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- b) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) desikator yang berisi desikan; dan
- d) pinggan nikel, platina atau aluminium bertutup.

B.3.3 Cara kerja

- a) Panaskan pinggan beserta tutupnya dalam oven pada suhu (100 ± 5) °C selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 20 menit sampai dengan 30 menit, kemudian timbang dengan neraca analitik (pinggan dan tutupnya) (W_0);
- b) masukkan 5 g contoh ke dalam pinggan, tutup, dan timbang (W_1);
- c) panaskan pinggan yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup pinggan disamping pinggan di dalam oven pada suhu (100 ± 5) °C selama 3 (tiga) jam setelah suhu oven (100 ± 5) °C;

- d) tutup pinggan ketika masih di dalam oven, pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 20 menit sampai dengan 30 menit kemudian timbang;
- e) lakukan pemanasan kembali selama 1 jam dan ulangi kembali sampai perubahan berat antara pemanasan selama 1 jam mempunyai interval ≤ 2 mg (W_2);
- f) lakukan pekerjaan duplo; dan
- g) hitung kadar air dalam contoh.

B.3.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot pinggan kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot pinggan, tutupnya dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);

W_2 adalah bobot pinggan, tutupnya dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g).

B.3.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 3 % dari nilai rata-rata hasil kadar air. Jika kisaran lebih besar dari 3 % analisis harus diulang kembali.

B.4 Kadar abu

B.4.1 Prinsip

Kadar abu dihitung berdasarkan bobot abu yang terbentuk selama pembakaran dalam tanur pada suhu 525 °C sampai terbentuk abu berwarna putih.

B.4.2 Peralatan

- a) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- b) oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- c) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) penangas listrik;
- e) penangas air;
- f) desikator; dan
- g) cawan platina, kuarsa atau porselen yang berukuran 50 ml sampai dengan 100 ml.

B.4.3 Cara kerja

- a) Panaskan cawan dalam tanur pada suhu (525 ± 5) °C selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 30 menit kemudian timbang dengan neraca analitik (W_0);
- b) masukkan 5 g sampai dengan 10 g contoh ke dalam cawan dan timbang (W_1);
- c) panaskan cawan yang berisi contoh dalam oven pada suhu (105 ± 2) °C sampai H_2O hilang;
- d) tempatkan cawan yang berisi contoh tersebut dalam tanur pada suhu 525 °C sampai terbentuk abu berwarna putih;
- e) tambahkan air ke dalam abu, keringkan dalam penangas air kemudian dilanjutkan pada pemanas listrik kemudian diabukan kembali pada suhu 525 °C sampai mencapai berat yang tetap;
- f) pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 30 menit kemudian timbang (W_2);
- g) lakukan pekerjaan duplo; dan

h) hitung kadar abu dalam contoh.

B.4.4 Perhitungan

$$\text{Kadar abu (\%)} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100 \%$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot cawan kosong, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot cawan dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);

W_2 adalah bobot cawan dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g).

B.4.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar abu. Jika kisaran lebih besar dari 5 % maka analisis harus diulang kembali.

B.5 Kadar lemak

B.5.1 Prinsip

Hidrolisis lemak dalam contoh uji menggunakan HCl kemudian diekstraksi dengan petroleum eter. Ekstrak petroleum eter yang diperoleh kemudian diuapkan sampai kering dan kadar lemak dihitung secara gravimetri.

B.5.2 Peralatan

- Alat Soxhlet lengkap;
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- labu didih 250 ml;
- oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- penangas air;
- timbangan ekstraksi atau selongsong kertas saring ukuran (33 x 80) mm;
- desikator yang berisi desikan;
- kertas saring bebas lemak;
- kaca arloji; dan
- gelas piala 300 ml atau 500 ml.

B.5.3 Pereaksi

- Asam klorida (HCl) 8 M (2 bagian HCl ditambah 1 bagian air);
- petroleum eter; dan
- larutan perak nitrat (AgNO_3) 0,1 M;
larutkan ($17,0 \pm 0,1$) g AgNO_3 p.a. di dalam 1000 ml air suling.

B.5.4 Cara kerja

B.5.4.1 Hidrolisis

- Timbang 4 g sampai dengan 5 g contoh tempe kedelai yang telah dipersiapkan (W) dengan teliti ke dalam gelas piala 300 ml atau 500 ml;
- tambahkan 45 ml air suling mendidih dengan perlahan sambil diaduk hingga homogen.;
- tambahkan 55 ml HCl 8 M (2 bagian HCl ditambah 1 bagian air dan beberapa butir batu didih);

- d) tutup gelas piala tersebut dengan kaca arloji lalu dididihkan perlahan-lahan selama 15 menit;
- e) cuci kaca arloji dengan 100 ml air suling dan masukkan air pembilas tersebut ke dalam gelas piala;
- f) saring endapan menggunakan kertas saring bebas lemak;
- g) bilas gelas piala 3 kali dengan air suling, lakukan pencucian hingga bebas klor yang dapat ditentukan dengan penambahan 1 tetes sampai dengan 3 tetes AgNO_3 0,1 M pada filtrat, jika tidak terdapat endapan putih (AgCl) maka telah bebas klor; dan
- h) pindahkan kertas saring serta isinya ke dalam timbal ekstraksi atau selongsong kertas saring bebas lemak dan keringkan 6 jam sampai dengan 18 jam pada suhu 100°C sampai dengan 101°C .

B.5.4.2 Ekstraksi

- a) Keringkan labu didih yang berisi beberapa butir batu didih selama 1 jam;
- b) dinginkan dalam desikator dan timbang (W_0), sambungkan dengan alat ekstraksi soxhlet;
- c) masukkan timbal ekstraksi atau selongsong kertas saring ke dalam Soxhlet (sebaiknya timbal ditopang *glass bead* untuk meyakinkan daya kerja yang efisien), kemudian tuangkan petroleum eter sebanyak 2/3 kapasitas labu di atas penangas;
- d) ekstrak selama 4 jam dengan kecepatan ekstraksi lebih dari 30 kali;
- e) keringkan labu didih beserta lemak di dalam oven pada suhu 100°C sampai dengan 101°C selama 1,5 jam sampai dengan 2 jam;
- f) dinginkan dalam desikator dan timbang (W_1); dan
- g) ulangi pengeringan sampai perbedaan penimbangan bobot lemak yang dilakukan berturut-turut kurang dari 0,05 %.

B.5.5 Perhitungan

$$\text{Kadar lemak (\%)} = \frac{W_1 - W_0}{W} \times 100\%$$

Keterangan:

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);

W_0 adalah bobot labu lemak kosong, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot labu lemak kosong dan lemak, dinyatakan dalam gram (g).

B.5.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 3 % dari nilai rata-rata hasil kadar lemak. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka analisis harus diulang kembali.

B.6 Kadar protein (N x 6,25)

B.6.1 Prinsip

Contoh uji didestruksi dengan H_2SO_4 menggunakan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ sebagai katalis dan K_2SO_4 untuk meningkatkan titik didihnya bertujuan melepaskan nitrogen dari protein sebagai garam amonium. Garam amonium tersebut diuraikan menjadi NH_3 pada saat destilasi menggunakan NaOH . NH_3 yang dibebaskan dan diikat dengan asam borat menghasilkan ammonium borat yang secara kuantitatif dititrasi dengan larutan baku asam sehingga diperoleh total nitrogen. Kadar protein susu diperoleh dari hasil kali total nitrogen dengan 6,25.

B.6.2 Peralatan

- a) Labu *Kjeldahl* 100 ml;
- b) alat destilasi *Kjeldahl* ;
- c) pemanas listrik/alat destruksi dilengkapi dengan penghisap asap;
- d) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- e) buret 10 ml terkalibrasi; dan
- f) batu didih.

B.6.3 Pereaksi

- a) Asam sulfat, H_2SO_4 pekat bebas nitrogen;
- b) larutan katalis tembaga, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ bebas nitrogen 0,05 g/ml H_2O ;
larutkan 5 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ dengan air suling menjadi 100 ml, lalu pindahkan ke dalam botol bertutup gelas
- c) katalis selen;
campurkan 4 g serbuk SeO_2 , 150 g K_2SO_4 atau Na_2SO_4 dan 30 g $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$
- d) kalium sulfat, K_2SO_4 bebas nitrogen;
- e) batu didih;
- f) larutan indikator *methyl red* (MR)/*bromocresol green* (BCG);
larutkan 0,2 g MR dengan etanol 95% menjadi 100 ml. Larutkan 1,0 g BCG dengan etanol 95 % menjadi 500 ml. Campurkan 1 bagian larutan MR dan 5 bagian larutan BCG dalam gelas piala lalu pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- g) larutan asam borat, H_3BO_3 4 %;
larutkan 40 g H_3BO_3 dengan air suling menjadi 1000 ml dan tambahkan 3 ml larutan indikator MR/BCG, aduk, (larutan akan berwarna kuning terang) dan pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- h) larutan natrium hidroksida, NaOH 30 %;
larutkan 600 g hablur NaOH dengan air suling menjadi 2000 ml, simpan ke dalam botol bertutup karet.
- i) larutan indikator fenolftalein (PP) 1 %; dan
larutkan 1 g serbuk indikator PP dengan alkohol 95% dan encerkan menjadi 100 ml.
- j) larutan asam klorida, HCl 0,1000 M.
pipet dengan hati-hati 8,60 ml HCl pekat (36.5 % sampai dengan 38 %) ke dalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan ditetapkan normalitasnya.

B.6.4 Cara kerja

- a) Timbang 1 g contoh (W) ke dalam labu *Kjeldahl*, tambahkan 15,00 g K_2SO_4 , 1 ml larutan katalis $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ atau 1 g campuran katalis selen, 8 butir sampai dengan 10 butir batu didih dan 25 ml H_2SO_4 pekat;
- b) panaskan campuran dalam pemanas listrik sampai mendidih dan larutan menjadi jernih kehijau-hijauan. Lakukan dalam lemari asam atau lengkapi alat destruksi dengan unit pengisapan asap;
- c) biarkan dingin, kemudian encerkan dengan air suling secukupnya;
- d) tambahkan 75 ml larutan NaOH 30 % (periksa dengan indikator PP sehingga campuran menjadi basa);
- e) suling selama 5 menit sampai dengan 10 menit atau saat larutan destilat telah mencapai kira-kira 150 ml, dengan penampung destilat adalah 50 ml larutan H_3BO_3 4 %;
- f) bilas ujung pendingin dengan air suling;
- g) titar larutan campuran destilat dengan larutan HCl 0,1000 M (N); dan
- h) kerjakan penetapan blanko.

B.6.5 Perhitungan

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{(V_2 - V_1) \times N \times 14,007 \times 6,25 \times 100 \%}{W}$$

Keterangan:

- V_1 adalah volume HCl 0,1000 N untuk titrasi contoh, dinyatakan dalam mililiter (ml);
 V_2 adalah volume HCl 0,1000 N untuk titrasi blanko, dinyatakan dalam mililiter (ml);
 N adalah normalitas larutan HCl;
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam miligram (mg);
 14,007 adalah bobot atom Nitrogen;
 6,25 adalah faktor protein untuk kedelai.

B.6.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar protein. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka analisis harus diulang kembali.

B.7 Kadar serat kasar

B.7.1 Prinsip

Serat kasar adalah bagian yang tidak dapat dihidrolisis oleh asam sulfat (H_2SO_4 1,25 %) dan natrium hidroksida (NaOH 3,25 %). Bahan tersebut dihitung secara gravimetri.

B.7.2 Peralatan

- Oven
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- pompa vakum;
- gelas piala;
- kertas saring tak berabu yang mempunyai spesifikasi *particle retention liquid* sebesar (20 – 25) μm ;
- pendingin;
- corong Buchner;
- sudip atau sendok;
- pinggan alumunium atau porselein; dan
- mortar.

B.7.3 Pereaksi

- Petroleum eter;
- larutan asam sulfat (H_2SO_4) 1,25 %;
larutkan 13,02 ml H_2SO_4 p.a (96 %) ke dalam air suling, lalu tera hingga 1000 ml.
- larutan NaOH 3,25 %;
larutkan 3,25 g NaOH ke dalam 100 ml air suling; dan
- etanol 96 %.

B.7.4 Cara Kerja

B.7.4.1 Menghilangkan lemak

- Timbang 2 g sampai dengan 4 g contoh tempe kedelai (W) kemudian keringkan dalam oven selama kurang lebih 3 jam pada suhu 100 °C kemudian masukkan ke dalam tabung sentrifuse 250 ml;
- tambahkan 100 ml eter kemudian tabung ditutup dan dikocok sehingga lemak larut dalam eter kemudian disaring;
- cuci saringan dengan eter;
- larutan kemudian di sentrifugasi selama 10 menit pada 2000 rpm dan supernatan dibuang;
- tambahkan 100 ml eter untuk ekstraksi kembali dan lakukan pasal d;
- tambahkan 100 ml eter, tabung ditutup, dan kocok;
- segera tuangkan ke dalam labu *rotary evaporator* dan lakukan evaporasi eter selama ± 20 menit hingga kering;
- pindahkan seluruh residu ke dalam mortar menggunakan sudip atau sendok yang bersih dan kering kemudian tumbuk hingga halus;
- setelah halus, pindahkan kembali ke pinggan alumunium atau porselin dan keringkan selama 10 menit sampai 15 menit dalam penangas air untuk menghilangkan sisa eter; dan
- keringkan dalam oven pada suhu 100 °C selama 1 jam sehingga diperoleh tempe kedelai kering bebas lemak.

B.7.4.2 Ekstraksi serat kasar

- masukkan semua tempe kedelai kering bebas lemak ke dalam erlenmeyer 500 ml, tambahkan 50 ml larutan H₂SO₄ 1,25 % kemudian didihkan selama 30 menit dengan menggunakan pendingin tegak,
- tambahkan 50 ml NaOH 3,25 % kemudian didihkan selama 30 menit dengan menggunakan pendingin tegak,
- dalam keadaan panas, saring dengan corong Buchner yang berisi kertas saring yang telah dikeringkan dan diketahui bobotnya.
- cuci endapan yang terdapat pada kertas saring berturut-turut dengan H₂SO₄ 1,25 % panas, air panas dan etanol 96 %,
- angkat kertas saring beserta isinya, masukkan ke oven dan keringkan pada suhu 105 °C dinginkan dan timbang sampai bobot tetap (W₂),
- bila ternyata kadar serat kasar lebih besar dari 1 %, abukan kertas saring beserta isinya, timbang sampai bobot tetap (W₁),
- lakukan pekerjaan duplo.

B.7.5 Perhitungan

$$\text{Serat kasar (\%)} = \left(\frac{W_2 - W_1}{W} \right) \times 100 \%$$

Keterangan:

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);

W₁ adalah bobot abu, dinyatakan dalam gram (g);

W₂ adalah bobot endapan, dinyatakan dalam gram (g).

B.7.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil serat kasar. Jika kisaran lebih besar dari 10 %, maka analisa harus diulang kembali.

B.8 Cemaran logam

B.8.1 Penetapan cemaran logam kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

B.8.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283 nm untuk Pb.

B.8.1.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- penangas listrik;
- penangas air;
- cawan porselin/platina/kwarsa dengan kapasitas 50 ml sampai dengan 100 ml;
- pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi;
- labu ukur 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml, terkalibrasi;
- gelas ukur kapasitas 10 ml;
- gelas piala 250 ml;
- wadah *polypropylene*; dan
- kertas saring yang mempunyai spesifikasi *particle retention liquid* sebesar 20 µm - 25 µm.

B.8.1.3 Perekasi

- Larutan asam nitrat, HNO₃ pekat (65 %, Bj 1,4);
- larutan asam klorida, HCl pekat (37 %, Bj 1,19) ;
- larutan asam nitrat, HNO₃ 0,1 N;
encerkan 7 ml HNO₃ 65 % dengan air suling dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- larutan asam klorida, HCl 6N;
encerkan 500 ml HCl 37 % dengan air suling dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- larutan baku 1000 µg/ml Cd;
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 ml HNO₃ pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd 1000 µg/ml siap pakai.
- larutan baku 200 µg/ml Cd;
pipet 10 ml larutan baku 1000 µg/ml Cd ke dalam labu ukur 50 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 µg/ml Cd.
- larutan baku 20 µg/ml Cd;

pipet 10 ml larutan baku 200 µg/ml Cd ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 µg/ml Cd.

- h) larutan baku kerja Cd;
pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml, 0,5 ml, 1 ml; 2 ml; 4 ml; 7 ml dan 9 ml larutan baku 20 µg/ml kemudian tambahkan 5 ml larutan HNO₃ 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,2 µg/ml; 0,4 µg/ml; 0,8 µg/ml; 1,4 µg/ml dan 1,8 µg/ml Cd.
- i) larutan baku 1000 µg/ml Pb;
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 ml HNO₃ pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1000 µg/ml siap pakai.
- j) larutan baku 50 µg/ml Pb;
pipet 5,0 ml larutan baku 1000 µg/ml Pb ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 µg/ml.
- k) larutan baku kerja Pb;
pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml, 0,2 ml; 0,5 ml; 1 ml; 2 ml; 3 ml dan 4 ml larutan baku 50 µg/ml kemudian tambahkan 5 ml larutan HNO₃ 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,5 µg/ml; 1,0 µg/ml; 1,5 µg/ml dan 2,0 µg/ml Pb.

B.8.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh (m) dengan teliti dalam cawan porselin/platina/kuarsa;
- b) tempatkan cawan berisi contoh uji di atas penangas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi;
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur (450 ± 5) °C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO₃ pekat kira-kira 1 ml sampai dengan 3 ml;
- e) keringkan cawan di atas penangas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 450 °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO₃ pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 ml HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan HNO₃ 0,1 N dan masukkan ke dalam labu ukur 50 ml kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring, ke dalam wadah *polypropylene*;
- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- h) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283 nm untuk Pb;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- k) hitung kandungan logam dalam contoh.

B.8.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/ml}$);

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml);

m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

B.8.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang.

B.8.2 Penetapan cemaran logam timah (Sn)

B.8.3.1 Prinsip

Contoh didekstruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian tambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O-C}_2\text{H}_2$.

B.8.3.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C ;
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- erlenmeyer 250 ml;
- penangas listrik;
- penangas air;
- gelas piala 250 ml;
- gelas ukur kapasitas 50 ml;
- labu ukur 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml, terkalibrasi; dan
- pipet ukur berskala 0,1 ml kapasitas 5 ml dan 10 ml terkalibrasi.

B.8.3.3 Perekasi

- Larutan kalium klorida, 10 mg/ml K; larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 ml.
- asam nitrat pekat, HNO_3 pekat;
- asam klorida pekat, HCl pekat;
- larutan baku 1000 mg/l Sn; dan larutkan 1000 g Sn dengan 200 ml asam HCl pekat dalam labu ukur 1000 ml, tambahkan 200 ml air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- larutan baku kerja Sn. pipet 10 ml HCl pekat dan 1,0 ml larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 ml. Tambahkan masing-masing 0 ml; 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml dan 2,5 ml larutan baku 1000 mg/L Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/ml}$; 5 $\mu\text{g/ml}$; 10 $\mu\text{g/ml}$; 15 $\mu\text{g/ml}$; 20 $\mu\text{g/ml}$ dan 25 $\mu\text{g/ml}$ Sn.

B.8.3.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh (m) dengan teliti ke dalam erlenmeyer 250 ml, tambahkan 30 ml HNO₃ pekat dan biarkan 15 menit;
- b) panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- c) lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 ml sampai dengan 6 ml atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- d) angkat erlenmeyer dari penangas listrik, tambahkan 25 ml HCl pekat, dan panaskan sampai selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl₂ berhenti;
- e) tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 ml sampai dengan 15 ml;
- f) tambahkan 40 ml air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 ml, bilas erlenmeyer tersebut dengan 10 ml air suling (V);
- g) tambahkan 1,0 ml KCl, dinginkan pada tempe kedelai atur ruang, tera dengan air suling dan saring;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi N₂O-C₂H₂;
- j) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- k) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- l) lakukan pengerjaan duplo; dan
- m) hitung kandungan Sn dalam contoh;

B.8.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi timah (Sn) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/ml)

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml);

m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

B.8.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan timah (Sn). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

B.8.3 Penetapan cemaran merkuri (Hg)

B.8.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan NaBH₄ atau SnCl₂ dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm.

B.8.3.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida (HVG);
- b) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;

- c) labu destruksi 250 ml berdasar bulat;
- d) pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin Raschig setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- e) labu ukur 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- f) penangas listrik;
- g) gelas ukur 25 ml; dan
- h) pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi;

B.8.3.3 Perekasi

- a) Asam sulfat, H_2SO_4 9 M;
- b) asam nitrat, HNO_3 7 M;
- c) batu didih;
- d) campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1);
- e) hidrogen peroksida, H_2O_2 ;
- f) larutan Natrium molibdat 2 %.
- g) larutan pereduksi;
campurkan 50 ml H_2SO_4 dengan 300 ml air suling dalam gelas piala 500 ml dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan kedalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- h) larutan NaBH_4 ;
larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 ml.
- i) larutan pengencer;
masukkan 300 ml sampai dengan 500 ml air suling kedalam labu ukur 1000 ml dan tambahkan 58 ml HNO_3 kemudian 67 ml H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- j) larutan baku 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hg;
larutkan 0,1354 g HgCl_2 dengan kira-kira 25 ml air suling dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- k) larutan baku 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hg; dan
pipet 1 ml larutan baku 1000 mg/l Hg ke dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 mg/l.
- l) larutan baku kerja Hg;
pipet masing-masing 0,25 ml; 0,5 ml; 1 ml; dan 2 ml larutan baku 1 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,0025 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,005 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hg.

B.8.3.4 Cara kerja

B.8.3.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g contoh (m) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 ml H_2SO_4 9 M, 20 ml HNO_3 7 M, 1 ml larutan natrium molibdat 2 %, dan 5 batu didih sampai dengan 6 butir batu didih;
- b) hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas penangas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- c) tambahkan 20 ml campuran HNO_3 – HClO_4 (1:1) melalui pendingin;
- d) hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;

- e) tambahkan 10 ml air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- f) didihkan lagi selama 10 menit;
- g) matikan pemanas dan cuci pendingin dengan 15 ml air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang;
- h) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- i) pipet 25 ml larutan di atas ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- j) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- k) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- l) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- m) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/ml}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- n) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- o) lakukan pengerjaan duplo; dan
- p) hitung kandungan Hg dalam contoh;

B.8.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 ml HNO_3 , 1 ml H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam oven *microwave* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- e) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- f) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- g) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/ml}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- h) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- i) lakukan pengerjaan duplo; dan
- j) hitung kandungan Hg dalam contoh;

B.8.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi merkuri dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/ml}$)

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml);

m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);

fp adalah faktor pengenceran.

B.8.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan merkuri (Hg). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

B.9 Cemaran arsen (As)

B.9.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan NaBH_4 atau SnCl_2 sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang 193,7 nm.

B.9.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida ("HVG");
- tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- pemanas listrik;
- labu Kjeldahl 250 ml;
- labu borosilikat berdasar bulat 50 ml.
- labu ukur 50 ml, 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- gelas ukur 25 ml;
- pipet volumetrik 25 ml;
- cawan porselen kapasitas 50 ml;
- pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi; dan
- burner atau bunsen.

B.9.3 Perekasi

- Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- asam perklorat, HClO_4 pekat;
- natrium boronhidrida, NaBH_4 ;
larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 ml.
- asam klorida, HCl 8 M;
larutkan 66 ml HCl 37 % kedalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 %;
timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam piala gelas 200 ml dan tambahkan 100 ml HCl 37 %. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- kalium iodida, KI 20 %;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- Larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/ml;
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 ml H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 ml HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 ml dengan air suling;
- larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ As;
larutkan 1,3203 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20 % dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.

- i) larutan baku 100 $\mu\text{g/ml}$ As;
pipet 10 ml larutan baku arsen 1000 $\mu\text{g/ml}$ ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ As.
- j) larutan baku 1 $\mu\text{g/ml}$ As; dan
pipet 1 ml larutan standar arsen 100 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/ml}$ As.
- k) larutan baku kerja As;
pipet masing-masing 1,0 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml dan 5,0 ml larutan baku 1 $\mu\text{g/ml}$ As ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 $\mu\text{g/ml}$; 0,02 $\mu\text{g/ml}$; 0,03 $\mu\text{g/ml}$; 0,04 $\mu\text{g/ml}$ dan 0,05 $\mu\text{g/ml}$ As.

B.9.4 Cara kerja

B.9.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai 10 g contoh (m) kedalam labu Kjeldahl 250 ml, tambahkan 5 ml sampai 10 ml HNO_3 pekat dan 4 ml sampai 8 ml H_2SO_4 pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO_3 pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) tambahkan 2 ml HClO_4 70 % sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan asam perklorat, tambahkan lagi sedikit HNO_3 pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 ml H_2O dan 5 ml ammonim oksalat jenuh;
- e) panaskan sehingga timbul uap SO_3 di leher labu;
- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- g) pipet 25 ml larutan diatas dan tambahkan 2 ml HCl 8 M, 0.1 ml KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi (NaBH_4) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- j) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/ml}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- m) lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh;

B.9.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 ml HNO_3 , 1 ml H_2O_2 kemudian tutup rapat.
- b) masukkan ke dalam oven *microwave* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) pipet 10 ml larutan destruksi (C) ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 ml, tambahkan 1 ml larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, Uapkan di atas penangas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu 450 °C (± 1 jam);

- e) dinginkan, larutkan dengan 2,0 ml HCl 8 M, 0.1 ml KI 20 % dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan NaBH₄ dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01 µg/ml; 0,02 µg/ml; 0,03 µg/ml; 0,04 µg/ml; 0,05 µg/ml serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan *burner* serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As (µg/ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh;

B.9.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/ml)

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml);

m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);

fp adalah faktor pengenceran.

B.9.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan arsen (As). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

B.10 Cemaran mikroba

B.10.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji bakteri *coliform*

B.10.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk menggiatkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

B.10.1.2 Peralatan

- a) Alat homogenisasi yang sesuai (blender) dengan kecepatan putaran 10000 rpm sampai dengan 12000 rpm;
- b) penangas listrik;
- c) neraca kapasitas 2000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- d) labu ukur 50 ml, 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- e) gelas piala steril;
- f) labu erlenmeyer steril;
- g) botol pengencer steril;
- h) pipet volumetrik steril;
- i) tabung reaksi; dan
- j) pisau, sendok, gunting, dan spatula steril.

B.10.1.3 Larutan Pengencer

Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB);

- KH_2PO_4 34 g
- air suling 500 ml

Atur pH dengan NaOH sehingga pH 7,2, tepatkan volume sampai 1000 ml dengan air suling. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. Simpan pada refrigerator untuk membuat larutan pengencer 1,25 ml larutan stok diencerkan dengan air suling sampai volume 1000 ml, kemudian dimasukkan ke dalam tabung sebanyak 450 ml, atau (99 ± 1) ml dan disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

B.10.1.4 Homogenisasi contoh

- a) Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam erlenmeyer yang telah berisi 450 ml larutan pengencer sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- b) kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

B.10.2 Bakteri *coliform*

B.10.2.1 Cara uji bakteri *coliform* metode APM (Angka Paling Mungkin)

B.10.2.1.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *coliform* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung Durham, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel B.1.

B.10.2.1.2 Peralatan

- a) Lemari pengering (Inkubator), (35 ± 1) °C;
- b) penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, $(45,5 \pm 0,2)$ °C;
- c) rak untuk tabung reaksi;
- d) pipet Mohr 1 ml dan 10 ml berskala;
- e) botol pengenceran (± 20 ml) gelas borosilikat yang resistan, dengan sumbat karet atau tutup uliran;
- f) tabung reaksi dan tabung Durham; dan
- g) jarum inokulasi, dengan diameter dalam kira-kira 3 mm.

B.10.2.1.3 Perbenihan pengencer dan pereaksi

- a) *Lauryl sulfate tryptose* (LST) broth / *Lauryl tryptose* (LT) broth;
- b) *brilliant green lactose bile* (BGLB) broth 2 %.

B.10.2.1.4 Cara kerja

B.10.2.1.4.1 APM – Uji pendugaan untuk bakteri *coliform*

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada B.10.1;
- b) inokulasikan masing-masing 1 ml larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *Lauryl sulfate broth*. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- c) masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu 35 °C selama (48 ± 2) jam;
- d) amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke- (24 ± 2) . Jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";

- e) tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan “negatif”, lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- f) catat adanya pembentukan gas setelah inkubasi (48 ± 2) jam karena ini adalah uji pendugaan yang positif *coliform* untuk bakteri *coliform* untuk tabung-tabung yang negatif; dan
- g) lakukan uji penegasan terhadap semua tabung yang positif untuk uji pendugaan.

B.10.2.1.4.2 APM - Uji penegasan untuk bakteri *coliform*

- a) Kocok tabung LST yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- b) pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung BGLB 2 % yang berlainan;
- c) masukkan tabung-tabung BGLB 2 % ke dalam inkubator pada suhu (35 ± 1) °C selama (48 ± 2) jam;
- d) catat semua tabung BGLB yang positif menghasilkan gas dan dengan menggunakan tabel Angka Paling Mungkin (APM) Tabel B.2, tentukan APM berdasarkan jumlah tabung BGLB yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama (48 ± 2) jam pada (35 ± 1) °C; dan
- e) laporkan sebagai APM bakteri *coliform* per gram.

Tabel B.1 - APM per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1; 0,01; dan 0,001 g/ml contoh

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	< 3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460

Tabel B.1 (lanjutan)

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	> 1100

B.10.3 *Salmonella sp.*

B.10.3.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella sp.* pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan konfirmasi melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella sp.*

B.10.3.2 Peralatan

- a) inkubator, $(35 \pm 2) ^\circ\text{C}$;
- b) inkubator *refrigerated* atau *laboratory refrigerator* $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$;
- c) otoklaf;
- d) oven;
- e) penangas air, $(49 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- f) penangas air, bersirkulasi, *thermostatically-controlled*, $(43 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$;
- g) penangas air, bersirkulasi, *thermostatically-controlled*, $(42 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$;
- h) neraca, kapasitas 2000 gram, dengan ketelitian 0,1 gram;
- i) neraca, kapasitas 120 gram, dengan ketelitian 5 mg;
- j) blender dengan kecepatan putaran 10.000 -12.000 rpm dan blender jar (botol) steril;
- k) botol bertutup ulir bermulut lebar 16 oz (500 ml) steril, Erlenmeyer 500 ml steril, *beaker*, 250 ml steril, *sterile glass* atau *paper funnels* dengan ukuran sesuai, dan, pilihan lain, kontainer dengan kapasitas sesuai untuk mengakomodasi contoh komposit;
- l) *bent glass* atau batang penyebar plastik steril;
- m) sendok steril, atau peralatan lain untuk memindahkan contoh makanan;
- n) cawan petri steril, 15 x 100 mm, kaca atau plastic;
- o) pipet steril, 1 ml dengan ketelitian 0,01 ml; dan pipet steril 5 ml dan 10 ml dengan ketelitian 0,1 ml;
- p) jarum ose (inokulasi) (diameter ± 3 mm), *nichrome*, *platinum-iridium chromel wire* atau plastik steril;
- q) tabung reaksi atau tabung kultur steril, 10 x 150 mm dan 20 x 150 mm; tabung serologikal, 10 x 75 mm atau 13 x 100 mm;
- r) rak tabung reaksi atau rak tabung kultur;
- s) vorteks mixer;
- t) gunting, gunting besar, pisau bedah, dan *forceps* steril;
- u) lampu (untuk mengamati reaksi serologi);
- v) *fisher* atau *bunsen burner*;
- w) kertas pH (kisaran pH 6 - 8) dengan ketelitian maksimum 0,4 unit pH per perubahan warna;
- x) pH meter;
- y) kantong plastik steril, 28 cm - 37 cm dapat diikat;
- z) *beaker* plastik, 4 liter, dapat diotoklaf, untuk menyangga kantong plastik selama pengocokan dan inkubasi;

- aa) sponges, *non-bactericidal* (Nasco cat # B01299WA) atau yang sebanding; dan
 ab) swab, *non bactericidal*, jenis kapas.

B.10.3.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) *Lactose broth*;
 b) *nonfat dry milk (reconstituted)*;
 c) *selenite cystine (SC) broth*;
 d) *tetrathionate (TT) broth*;
 e) *Rappaport-Vassiliadis (RV) medium* (*RV medium* harus dibuat dari bahan-bahan yang terdapat dalam komposisi *RV medium* tersebut. Formulasi yang tersedia secara komersial tidak dapat diterima);
 f) *xylose lysine desoxycholate (XLD) agar*;
 g) *hektoen enteric (HE) agar*;
 h) *bismuth sulfite (BS) agar*;
 i) *triple sugar iron (TSI) agar*;
 j) *tryptone (tryptophane) broth*;
 k) *trypticase (tryptic) soy broth*;
 l) *trypticase soy broth dengan ferrous sulfate*;
 m) *trypticase soy-tryptose broth*;
 n) *methyl red-Voges Proskeaur (MR-VP) broth*
 o) *simmons citrate agar*;
 p) *urea broth*;
 q) *urea broth (rapid)*;
 r) *malonate broth*;
 s) *lysine iron agar (LIA)* (Edward dan Fife)
 t) *lysine decarboxylase broth*;
 u) media uji motilitas (semi padat);
 v) *potassium cyanide (KCN) broth*;
 w) *phenol red carbohydrate broth*;
 x) *purple carbohydrate broth*;
 y) *MacConkey agar*;
 z) *nutrient broth*;
 aa) *brain heart infusion (BHI) broth*;
 bb) larutan papain, 5 %;
 cc) larutan selulosa, 1 %;
 dd) *tryptose blood agar base*;
 ee) *universal preenrichment broth*;
 ff) *universal preenrichment broth (tanpa ferric ammonium citrate)*;
 gg) *buffered peptone water*;
 hh) *Dey-Engley broth*;
 ii) bubuk *potassium sulfite*, anhidrous;
 jj) larutan *chlorine*, 200 ppm, mengandung 0,1% *sodium dodecyl sulfate*;
 kk) etanol, 70 %;
 ll) pereaksi Kovacs';
 jj) pereaksi uji Voges-Proskauer (VP);
 nn) kristal *creatine phosphate*;
 oo) larutan *potassium hydroxide*, 40 %;
 pp) larutan *sodium hydroxide* 1 N;
 qq) asam hidroklorat 1 N;
 rr) larutan *brilliant green dye*, 1 %;
 ss) larutan *bromcresol purple dye*, 0,2 %;
 tt) indikator *methyl red*;
 uu) air suling steril;
 vv) *tergitol anionic*;

- ww) *triton X-100*;
- xx) larutan *physiological saline*, 0,85 % (steril);
- yy) larutan *formalinized physiological saline*;
- zz) *Salmonella polyvalent somatic (O) antiserum*;
- xx) *Salmonella polyvalent flagellar (H) antiserum*;
- yy) *Salmonella somatic group (O) antisera*: A, B, C₁, C₂, C₃, D₁, D₂, E₁, E₂, E₃, E₄, F, G, H, I, Vi, atau kelompok lain yang sesuai; dan
- ccc) *Salmonella Spicer-Edwards flagellar (H) antisera*.

B.10.3.4 Cara Kerja

B.10.3.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) Timbang 25 g contoh ke dalam blender yang steril dan tambahkan 225 ml *reconstitute non fat dry milk* steril. Kocok selama 2 menit;
- b) pindahkan secara aseptik ke dalam botol pengencer 500 ml dan biarkan pada suhu ruang selama (60 ± 5) menit dengan wadah tertutup. Kocok perlahan dan atur pH sampai (6,8 ± 0,2);
- c) tambahkan 0,45 ml larutan *Briliant green dye* 1 %, kocok hingga tercampur merata; dan
- d) kendurkan tutup wadah secukupnya ¼ putaran. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada 35 °C.

B.10.3.4.2 Pengkayaan

- a) Kencangkan tutup wadah dan kocok secara perlahan contoh yang telah selesai diinkubasi;
- b) pipet 0,1 ml biakan pra-pengkayaan kedalam 10 ml media Rappaport-Vassiliadis (RV) dan 1 ml biakan pra-pengkayaan lainnya ke dalam 10 ml *tetrathionate broth* (TTB) dan vortex masing-masing campuran tersebut; dan
- c) inkubasikan media RV pada suhu (42 ± 0,2) °C selama (24 ± 2) jam dan TTB pada (35 ± 2,0) °C selama (24 ± 2) jam dalam penangas air bersirkulasi.

B.10.3.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif

- a) Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum ose, goreskan sepanjang 3 mm biakan pengkayaan TTB ke dalam cawan petri yang berisi media XLD, HE dan BS agar. Siapkan BS agar sehari sebelum digunakan dan simpan ditempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores.
- b) ulangi cara di atas dari media pengkayaan RV;
- c) inkubasikan cawan-cawan BS, HE dan XLD selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C;
- d) amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella sp.*;
Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:
Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella sp.* dari masing-masing media agar selektif setelah (24 ± 2) jam inkubasi. Koloni-koloni *Salmonella sp.* adalah sebagai berikut:
XLD : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella sp.* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam. Beberapa kultur *Salmonella sp.* memproduksi koloni kuning dengan atau tanpa inti hitam pada media XLD dan HE.
HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella sp.* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.
BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam. Jika masa inkubasi bertambah maka warna media disekitar koloni mula-mula

coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.

- e) jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BS setelah inkubasi (24 ± 2) jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama (24 ± 2) jam. Jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BS setelah inkubasi (48 ± 2) jam, ambil 2 atau lebih koloni yang tidak khas;
- f) dengan menggunakan jarum inokulasi steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan kedalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, gunakan jarum yang sama untuk menginokulasikan media LIA dengan cara menusuk agar tegak lebih dahulu, setelah itu goreskan pada agar miring. Karena *reaksi Lysine decarboxylase* sangat anaerobik, LIA miring harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Simpan media agar selektif yang telah diambil koloni pada suhu (5 - 8) °C;
- g) inkubasi TSI dan LIA pada suhu 35 °C selama (24 ± 2) jam dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya H₂S yang berlebihan. Pada TSI, kultur *Salmonella sp.* yang khas memberikan reaksi alkalin (merah) pada goresan dan asam (kuning) pada tusukan, dengan atau tanpa H₂S (warna kehitaman pada agar). Pada LIA kultur *Salmonella sp.* yang khas memberikan reaksi alkalin (ungu) pada keseluruhan tabung. Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai kultur negatif. Jangan hanya melihat perubahan warna pada tusukan untuk menyatakan kultur negatif. Umumnya kultur *Salmonella sp.* membentuk H₂S pada agar miring LIA; Beberapa kultur non *Salmonella sp.* membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA;
- h) semua biakan yang memberikan reaksi alkalin pada bagian tusukan didalam media LIA tanpa memperhatikan reaksi TSI akan potensial sebagai *Salmonella sp. sp.* dan dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan pada media LIA dan alkalin pada goresannya dan reaksi asam pada tusukan di TSI harus dipertimbangkan juga sebagai potensial *Salmonella sp.* dan harus dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan di media LIA dan asam pada goresannya, dan reaksi asam pada tusukannya di media TSI dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella sp.*. Bila kultur TSI tidak menunjukkan reaksi khas *Salmonella sp.* (alkalin pada goresan dan asam pada tusukan), ulangi lagi pengujian dengan mengambil koloni yang mencurigakan dari medium selektif yang tidak memberikan kultur duga positif dan inokulasi dengan menggores media TSI dan LIA seperti cara mulai B. 10.3.4.3.f di atas; dan
- i) lakukan uji identifikasi biokimia dan serologi terhadap:
 - tiga kultur presumtif TSI dari 1 set media selektif (HE, XLD dan BS) yang diinokulasi dari TTB, dan tiga kultur presumtif yang diinokulasikan dari RV;
 - jika tiga kultur presumtif positif TSI tidak terisolasi dari 1 set media selektif, uji presumtif positif TSI dari media agar yang lain. Uji sedikitnya 6 kultur TSI untuk setiap 25 g contoh makanan.

B.10.3.5 Identifikasi *Salmonella sp.*

B.10.3.5.1 Kultur campuran

- a) Apabila kultur TSI agar terlihat tercampur, maka goreskan kembali kedalam media *MacConkey agar*, HE atau XLD. Inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C. Amati koloni yang diduga *Salmonella sp.* :
 - *Mac Conkey agar*. Koloni yang khas tampak transparan dan tidak berwarna, kadang-kadang dengan inti hitam. Koloni-koloni *Salmonella sp.* akan membentuk area yang terang akibat pengendapan bakteri lain yang kadang-kadang tumbuh;
 - *Hektoen Enteric (HE) agar*. Koloni-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 terlihat berwarna hitam;

- *Xylose Lysine desoxycholate* (XLD) agar. Koloni merah muda dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella sp.* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.
- b) pindahkan sedikitnya 2 koloni terduga *Salmonella sp.* pada media TSI dan LIA seperti pada pasal B.10.3.4.f dan lanjutkan seperti pada pasal B.10.3.4.g.

B.10.3.5.2 Kultur murni

- a) Uji urease (konvensional); dan
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella sp.* dengan jarum inokulasi ke dalam *Urea broth*. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C}$; dan
- b) uji urease (cepat).
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella sp.* dengan jarum inokulasi ke dalam *rapid urea Broth*. Inkubasikan 2 jam dalam penangas air pada suhu $(37 \pm 0,5)\text{ }^{\circ}\text{C}$. Reaksi *Salmonella sp.* yang khas untuk uji urease memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna).

B.10.3.5.3 Pengujian kultur urease negatif

- a) *Lysine Decarboxylase Broth* (LDB);
Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan. Ambil 1 ose dari TSI dan inokulasikan kedalam media LDB. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, tetapi amati setelah 24 jam. *Salmonella sp.* memberikan reaksi alkalin ditandai dengan warna ungu pada seluruh media. Reaksi negatif ditunjukkan dengan warna kuning pada seluruh media. Jika hasil reaksi tidak menunjukkan warna kuning atau ungu tambahkan beberapa tetes 0,2 % *bromocresol purple dye* dan amati perubahan warnanya.
- b) *Phenol red dulcitol* atau *purple broth base* dengan 0,5 % *dulcitol*; dan
inokulasi media *dulcitol broth* dari biakan TSI. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ yang amati setelah 24 jam. Pada umumnya *Salmonella sp.* memberikan hasil positif yang ditandai 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 indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.
- c) *Tryptone (tryptophane) broth* (TB);
Inokulasi media *tryptone broth* dari biakan TSI. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan selanjutnya ikuti prosedur di bawah ini:
 - *Potassium Cyanida* (KCN) *broth*
Pindahkan 1 sengkeli biakan dari TB 24 jam kedalam media KCN *broth*. Tutup tabung rapat-rapat dan lapiasi dengan kertas parafilm. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan (ditandai dengan adanya kekeruhan). Umumnya *Salmonella sp.* tidak tumbuh pada media ini dengan ditandai dengan tidak terjadinya kekeruhan.
 - *Malonate broth*
Pindahkan 1 sengkeli dari biakan TB kedalam media *Malonate broth*. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, tetapi amati setelah 24 jam. Kadang-kadang tabung *Malonate broth* yang tidak diinokulasi berubah menjadi biru. Oleh karena itu gunakan *Malonate broth* sebagai kontrol. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru. Umumnya *Salmonella sp.* memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna) pada *broth* ini.
 - Uji indol
Dari media TB yang tersisa, tambahkan 0,2 ml sampai dengan 0,3 ml pereaksi *kovacs'*. Amati segera setelah penambahan pereaksi. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella sp.*

memberikan reaksi negatif (tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media). Reaksi yang warnanya berada antara jingga dan merah muda dinyatakan sebagai positif.

Nyatakan kultur sebagai bukan *Salmonella sp.* bila reaksi indol positif dan *flagellar* (H) negatif, atau KCN positif dan LDB negatif.

B.10.3.5.4 Uji serologi *polyvalent flagellar* (H)

- a) Inokulasi dari masing-masing TSI agar yang memberikan reaksi urease negatif kedalam:
 - BHI *broth*, dan inkubasi selama 4 jam sampai dengan 6 jam pada suhu 35 °C sampai terlihat pertumbuhan (untuk diuji pada hari yang sama); atau
 - *Trypticase Soy Trypticase broth* (TSTB) dan inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C (untuk diuji hari berikutnya). Tambahkan 2,5 ml larutan *formanilized physiological saline* ke dalam 5 ml kultur di atas.
- b) siapkan 2 kultur dari TSI (contoh dan kontrol) yang telah *diberi formanilized physiological saline* dan uji dengan *Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera. Masukkan ± 0,5 ml larutan *saline Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera dalam tabung serologi 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm. Tambahkan 0,5 ml antigen yang akan diuji. Siapkan kontrol *saline* dengan mencampur 0,5 ml *formanilized physiological saline* dengan 0,5 ml *formanilized* antigen. Inkubasikan campuran tersebut dalam penangas air pada suhu 48 °C sampai dengan 50 °C. Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya dalam 1 jam.
 - Positif apabila terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol;
 - negatif apabila tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan dalam kontrol; dan
 - non spesifik terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan kontrol.

B.10.3.5.5 Uji serologi *polyvalent somatic* (o)

- a) Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- b) emulsikan biakan dari TSI miring umur 24 jam sampai dengan 48 jam dengan 2 ml 0,85 % *saline* menggunakan jarum ose (dapat juga menggunakan biakan dari *tryptose blood agar base* tanpa darah);
- c) tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;
- d) tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes *polyvalent somatic* (o) *antiserum* ke dalam bagian yang lain;
- e) campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- f) klasifikasi uji *polyvalent somatic* (o) menunjukkan hasil sebagai berikut:
 - Positif : terjadi penggumpalan di dalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;
 - negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*;
 - non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

B.10.3.5.6 Uji biokimia tambahan

Nyatakan sebagai *Salmonella sp.*, kultur yang memberikan reaksi yang khas seperti pada Tabel B.2 nomor 1 - 11. Jika 1 kultur TSI dari setiap 25 g contoh menunjukkan *Salmonella sp.*, uji biokimia tambahan tidak diperlukan. Kultur yang memberikan reaksi positif pada uji

serologi *flagellar* (H) tapi tidak menunjukkan karakteristik *Salmonella sp.* pada uji biokimia, harus dimurnikan seperti pada Lampiran B.10.3.5.1 diatas dan uji kembali pada Lampiran B.10.3.5.2

Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap kultur yang tidak memberikan reaksi yang khas seperti Tabel B.2 :

- a) *Phenol red lactose* atau *purple lactose broth*;
 - Inokulasi broth ini dengan kultur TSI agar miring yang telah diinkubasi selama 24 jam sampai 48 jam. Inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam;
 - nyatakan 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, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media;
 - jika kultur memberikan reaksi *lactose* positif, maka nyatakan sebagai bukan *Salmonella sp.*, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi alkalin pada LIA atau reaksi positif pada *malonate broth*.
- b) *Phenol red sucrose* atau *purple sucrose broth*;
Ikuti prosedur seperti pada B.10.3.5.6.a. Nyatakan sebagai bukan *Salmonella sp.* pada kultur yang memberikan reaksi positif, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif (alkalin) pada LIA;
- c) *Methyl Red-Voges-Proskauer (MR-VP) broth*;
Inokulasi medium dengan sedikit biakan TSI agar miring dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
Lakukan uji *Voges-Proskauer (VP)* pada suhu ruang sebagai berikut :
 - Pindahkan 1 ml MR-VP *broth* yang telah diinkubasi selama (48 ± 2) jam kedalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali MR-VP *broth* selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
 - Tambahkan 0,6 ml *alpha naphthol* dan aduk;
 - Tambahkan 0,2 ml larutan KOH 40 % dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin dan amati hasilnya setelah 4 jam; dan
 - Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima pada media menunjukkan reaksi positif. Umumnya *Salmonella sp.* memberilkan reaksi VP negatif.
 Uji merah metil (MR)
 - Tambahkan 5 tetes indikator merah metil kedalam media MR-VP yang telah diinkubasi selama 96 jam;
 - amati hasilnya dengan segera; dan
 - umumnya *Salmonella sp.* memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya wana kuning menunjukkan reaksi negatif.
 Nyatakan sebagai bukan *Salmonella sp.* kultur yang memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif.
- d) *Simmons citrate agar*.
 - Inokulasi medium dengan menggunakan jarum yang mengandung biakan dari TSI agar miring, dengan cara menggores agar miring. Inkubasikan selama (96 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
 - nyatakan positif apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dari hijau menjadi biru. Umumnya *Salmonella sp.* memberikan hasil sitrat positif;
 - negatif apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.

B.10.3.5.7 Pernyataan hasil

Laporkan sebagai *Salmonella* sp. kultur-kultur yang mempunyai reaksi seperti pada Tabel B.2. Laporkan sebagai bukan *Salmonella* sp. kultur-kultur yang memberikan reaksi seperti pada Tabel B.3. Bila tidak ada 1 kultur TSI yang menunjukkan reaksi *Salmonella* sp. pada uji biokimia, lakukan uji biokimia mulai dari Lampiran B.10.3.5.3 terhadap kultur yang memberikan reaksi urease negatif dari contoh yang sama.

Tabel B.2 - Reaksi biokimia dan serologi untuk *Salmonella* sp.

No.	Substrat uji	Hasil reaksi		<i>Salmonella</i> sp. sp. reaksi species ^a
		Positif	Negatif	
1.	<i>Glucose</i> (TSI)	tusukan kuning	tusukan merah	+
2.	<i>lysine decarboxylase</i> (LIA)	tusukan ungu	tusukan kuning	+
3.	H ₂ S (TSI dan LIA)	hitam	tidak hitam	+
4.	urease	warna ungu sampai merah	tidak ada perubahan warna	-
5.	<i>lysine decarboxy broth</i>	warna ungu	warna kuning	+
6.	<i>phenol red dulcitol broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tanpa/ tidak berbentuk gas, tidak berubah warna	+ ^b
7.	KCN <i>broth</i>	pertumbuhan	tidak ada pertumbuhan	-
8.	<i>malonate broth</i>	warna biru	tidak berubah warna	- ^c
9.	uji <i>indole</i>	permukaan berwarna nila	permukaan berwarna kuning	-
10.	uji <i>Polyvalent flagellar</i>	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
11.	uji <i>Polyvalent somatic</i>	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
12.	<i>phenol red lactose broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	- ^c
13.	<i>phenol red sucrose broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	-
14.	uji <i>Voges-Proskauer</i>	merah muda sampai merah	tidak berubah warna	-
15.	uji <i>methyl red</i>	merah menyebar	kuning menyebar	+
16.	<i>simmons citrate</i>	pertumbuhan, warna biru	tidak ada pertumbuhan dan perubahan warna	V

Keterangan:
^a+ adalah 90 % atau lebih positif dalam satu atau dua hari;
 - adalah 90 % atau lebih negatif dalam satu atau dua hari;
 V adalah variabel;
^b adalah mayoritas dari kultur *Salmonella arizonae*: negatif;
^c adalah mayoritas dari kultur *Salmonella arizonae*: positif.

Tabel B.3 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non *Salmonella sp.*

No	Substrat uji	Hasil
1	<i>Urease</i>	positif (warna ungu-merah)
2	uji <i>indole</i> dan <i>polivalent flagellar</i> (H)	positif (permukaan warna nila) negatif (tidak ada penggumpalan)
3	<i>lysine decarboxylase</i> dan <i>KCN broth</i>	positif (ada pertumbuhan) negatif (warna kuning)
4	<i>phenol red lactose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) ^{a,b}
5	<i>phenol red sucrose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) ^b
6	<i>KCN broth</i> , uji <i>Voges-Proskauer</i> , dan <i>methyl red</i>	positif (ada pertumbuhan) positif (warna merah muda sampai merah) negatif (warna kuning menyebar)
Keterangan: ^a adalah test <i>malonate broth</i> lebih lanjut pada biakan yang positif untuk menentukan <i>Salmonella arizonae</i> ^b adalah jangan dibuang biakan positif jika biakan LIA menunjukkan reaksi bercirikan <i>Salmonella sp.</i> , uji lebih lanjut untuk mengamati apakah spesies tersebut <i>Salmonella sp.</i>		



Bibliografi

- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18th Edition, Chapter 9.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 950.49, Ash of Nuts and Nut Products*, 18th Edition, Chapter 40.1.08.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 932.06, Fat in Cacao Products*, 18th Edition, Chapter 31.4.02.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 935.53. Fiber (Crude) in Nuts and Nut Product*, 18th Edition, Chapter 40.1.07.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc*. 18th Edition, Chapter 9.1.09.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercuri in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.22.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 931.04, Moisture in Cacao Products*, Gravimetric Method, 18th Edition, Chapter 31.1.02.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 955.04C, Protein (Crude) in Nuts and Nut Product*, 18th Edition, Chapter 40.1.06.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 967.25, Salmonella in Foods, Preparation of culture media and reagents*. 18th Edition, Chapter 17.9.01.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. *Kategori Pangan*. 2006.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2002. *Enumeration of Escherichia coli and The Coliform Bacteria*. Chapter 4.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2003. *Food Sampling and Preparation of Sampling Homogenate*. Chapter 1.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2006. *Salmonella*. Chapter 5.
- SNI 19-0428-1998: *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.
- SNI 01-2891-1992: *Cara uji makanan dan minuman*.







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