

EVALUASI METODE PENGUJIAN ANGKA LEMPENG TOTAL MENGUNAKAN METODE PETRIFILM AEROBIC COUNT PLATE TERHADAP METODE UJI SNI 01.2332.2006 PADA PRODUK PERIKANAN DI LPPMHP SURABAYA

Fadjar Kurnia Hartati

Fakultas Pertanian Universitas Dr. Soetomo Surabaya

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi metode pengujian Angka Lempeng Total (ALT) yang lebih mudah dan cepat yaitu *Petrifilm Aerobic Count Plate* (PACP) terhadap ketahanannya dalam pengujian ALT pada produk perikanan, serta kesesuaiannya dengan Standar Nasional Indonesia (SNI) 01-2332.3-2006. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pengendalian dan Pengujian Mutu Hasil Perikanan (LPPMHP) Surabaya Jawa Timur. Penelitian ini membiakkan tiga jenis kultur bakteri dan 24 jenis produk perikanan dengan menggunakan dua metode uji, sebagai acuan metode SNI 01-2332.3-2006 dan pembandingnya adalah PACP. Hasil dari pengujian, kemudian dianalisa menggunakan perhitungan statistik ISO 4833 untuk mengevaluasi kesesuaian metode uji. Akhirnya diketahui bahwa pengujian ALT menggunakan PACP sesuai dengan SNI 01-2332.3-2006 sebagai metode standar pengujian, serta memiliki kesesuaian yang baik pada pengujian ALT dengan sampel produk perikanan.

Kata kunci: angka lempeng total, ISO 4833, *petrifilm aerobic count Plate*, SNI. 01-2332.3-2006

Abstract

The study aims to evaluate the testing methods Total Plate Count (ALT) which is easier and faster is Petrifilm Aerobic Plate Count (PAPC) against resistance in TPC testing in fishery products, as well as compliance with the Indonesian National Standard (SNI) 01-2332.3-2006. This study held in Laboratory Quality Control and Testing of Fishery Products (LPPMHP) Surabaya, East Java. This study three types of cultures breed bacteria and 24 types of fishery products by using two methods of testing, as the reference test SNI 01-2332.3-2006 and in comparison to the PACP. The results of the test, then analyzed using statistical calculations to evaluate the suitability of the ISO 4833 test method. Finally, note that ALT testing using PACP in accordance with ISO 01-2332.3-2006 as a standard method of testing, and has a good fit in the ALT test with a sample of fishery products

Keywords : total plate count, ISO 4833, petrifilm aerobic count plate, SNI. 01-2332.3-2006

PENDAHULUAN

Produk perikanan merupakan salah satu andalan Indonesia dalam perolehan devisa negara. Posisi nilai ekspor produk perikanan Indonesia di pasar dunia pada tahun 2006 menduduki peringkat 10 dengan pasar ekspor utama Indonesia adalah Amerika, Uni Eropa dan Jepang. Pertumbuhan ekspor produk perikanan Indonesia selama 5 (lima) tahun terakhir (2003–2007) menunjukkan kecenderungan naik, yaitu mencapai rata-rata sebesar 8,28 % (Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2008).

Kemunduran mutu ikan tidak dapat dipungkiri sebab ikan merupakan produk yang mudah rusak (*high perishable*) sehingga memerlukan penanganan yang khusus. Permasalahan mutu dan keamanan pangan produk hasil perikanan terjadi pada berbagai jenis produk, tahapan kegiatan maupun wilayah dengan berbagai jenis bahan berbahaya dan sumbernya dengan karakteristik yang berbeda. Dalam rangka meningkatkan keamanan pangan produk hasil perikanan perlu dilakukan kajian terhadap perumusan pengembangan kebijakan jaminan mutu dan keamanan produk hasil perikanan (Riyadi, *Dkk*, 2007)

Untuk mengidentifikasi mutu produk perikanan dilakukan dengan melakukan pengujian mikrobiologi di Laboratorium Pengendalian dan Pengujian Mutu Hasil Perikanan (LPPMHP). LPPMHP merupakan otoritas kompeten yaitu lembaga yang berwenang sebagai pengendali mutu produk perikanan, serta memberi keputusan bahwa produk perikanan layak untuk dikonsumsi dan diperdagangkan di luar negeri (ekspor). Pengujian Angka Lempeng Total (ALT) atau jumlah mikroorganisme, dapat dijadikan parameter (tolak ukur) mutu pada produk perikanan. Pengujian ALT di Indonesia sesuai dengan Standar Nasional Indonesia (SNI) 01-2332.3-2006 (2006). Namun saat ini telah berkembang metode pengujian ALT menggunakan *Petriefilm Aerobic Count Plate* (PACP) yang penggunaannya lebih mudah dan cepat (Method Organization 3M, 2000).

Dari uraian diatas, maka dilakukan penelitian tentang metode pengujian ALT menggunakan PACP yang pengerjaannya lebih mudah dan cepat, terhadap kesesuaiannya dalam pengujian ALT pada produk perikanan. Serta mengevaluasi kesesuaiannya dengan Standar Nasional Indonesia (SNI) 01-2332.3-2006, di Laboratorium Pengendalian dan Pengujian Mutu Hasil Perikanan (LPPMHP) Surabaya Jawa Timur. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi untuk pengujian ALT pada produk lainnya.

MATERI DAN METODE

Alat dan Bahan

Bahan baku yang digunakan pada penelitian ini adalah *plate count agar*, PACP, Larutan *butterfield's phosphat buffered*, tiga kultur biakan murni bakteri, dan 24 jenis produk perikanan. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan dengan ketelitian 0,0001 g, *autoclave*, inkubator $35^{\circ} C \pm ^{\circ} C$, *anaerobic jar*, cawan petri 15 mm x 90 mm, botol pengencer 20 ml, alat penghitung koloni, blender beserta *jar* yang dapat

disterilisasi atau stomacher, batang gelas bengkok diameter 3 mm – 4 mm, dengan panjang tangkai 15 cm – 20 cm, Pipet gelas atau pipetor : 0,1 ml, 1 ml, 5 ml, 10 ml.

Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental laboratorium, dengan menggunakan teknis pengumpulan data yang dilakukan secara langsung terhadap gejala subjek yang diteliti dalam situasi yang sebenarnya maupun dalam situasi buatan dalam kegiatan percobaan (Nasir, 1998). Selanjutnya untuk mengetahui kesesuaian dua metode, data hasil pengujian dievaluasi menggunakan perhitungan statistik ISO 4833.

Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian berdasarkan (SNI) 01-2332.3-2006, yaitu sebagai berikut :

1. Metode cawan agar tuang/*pour plate method*
 - a. Pipet 1 ml dari setiap pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , dan seterusnya kedalam cawan petri steril. Lakukan secara duplo untuk setiap pengenceran;
 - b. Tambahkan 12 ml – 15 ml PCA yang sudah didinginkan dalam *waterbath* hingga mencapai suhu $45^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ ke dalam masing-masing cawan yang sudah berisi contoh. Supaya contoh dan media tercampur sempurna lakukan pemutaran cawan ke depan ke belakang dan ke kiri ke kanan (catatan : untuk pengujian bakteri termofilik, penambahan media PCA kedalam cawan sebanyak 40 ml sampai 50 ml);
 - c. Setelah agar menjadi padat, untuk penentuan mikroorganisme aerob inkubasi cawan-cawan tersebut dalam posisi terbalik dalam inkubator selama 48 jam ± 2 jam pada suhu $22^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ (psikofilik), 35°C (mesofilik), 45°C (termofilik).
2. Metode cawan agar sebar/*Spread Plate Method*
 - a. Tuang 12 ml – 15 ml PCA ke dalam cawan-cawan petri steril dan dinginkan. Pipet 0,1 ml dari setiap pengenceran ke dalam cawan petri yang berisi media PCA diatas dan ratakan dengan menggunakan batang sendok. Lakukan secara duplo pada setiap pengenceran.
 - b. Setelah contoh meresap kedalam agar. Untuk menentukan mikroorganisme aerob inkubasi cawan-cawan tersebut dalam posisi terbalik dalam inkubator
 - c. Lakukan kontrol tanpa contoh dengan melakukan larutan pengencer dengan larutan PCA.
 - d. Selama 48 jam ± 2 jam pada suhu $22^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ (psikofilik), 35°C (mesofilik), 45°C (termofilik);

Prosedur penelitian PACP (LPPMHP,2011) yaitu sebagai berikut:

1. Persiapan alat
2. Persiapan bahan
 - a. Pembuatan larutan stok BFB dengan melarutkan senyawa KH_2PO_4 sebanyak 34 gr kedalam 500 ml air, homogenkan dengan *stearer* dan *hot plate*. Atur pH pada kisaran netral ($7 \pm 0,2$) dengan menambahkan larutan NaOH 1 N, tambahkan aquades hingga volume tepat 1 liter dan simpan larutan stok dalam *refrigator*. Untuk mendapatkan larutan BFP pengencer, lakukan dengan menggunakan pipet, ambil 10 ml larutan BFP stok dan tepatkan hingga 1 Lt dengan penambahan aquades. Sterilisasi dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C .

- b. PACP: Merupakan bahan utama dalam proses pengujian ALT, berbentuk kertas film berwarna kuning. PACP dikemas dalam wadah *sealable*, berisi 50 film setiap wadah. PACP disimpan dalam lemari pendingin. Ketika akan digunakan, terlebih dahulu dibiarkan pada ruangan terbuka hingga suhunya mencapai suhu kamar sebelum dapat digunakan dalam pengujian ALT.
 - c. Preparasi dan Pengenceran Sampel
 - d. Sampel diberi kode contoh diruangan organoleptic, dikirim ke ruang penerimaan laboratorium mikrobiologi kemudian ditata pada meja sampel. Selanjutnya siapkan larutan *Butterfield's Phosphat Buffered* (BFP) 225 ml. Dengan menerapkan teknis aseptis letakkan sampel pada pan, potong dan ambil sampel masukkan ke dalam BFP 225 ml hingga beratnya bertambah 25 gr. Kemudian masukkan dalam plastik steril dan homogenkan menggunakan mesin *stomacher* selama 60 detik. Homogenat ini merupakan larutan pengenceran 10^{-1} . Dengan menggunakan pipet steril, ambil 1 ml homogenat diatas dan masukkan kedalam 9 ml larutan BFP untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} . Siapkan pengenceran selanjutnya (10^{-3}) dengan mengambil 1 ml sampel dari pengenceran 10^{-2} ke dalam 9 ml larutan BFP. Pada setiap pengenceran dilakukan pengocokan menggunakan vortex mixer. Selanjutnya lakukan hal yang sama untuk pengenceran 10^{-4} .
3. Prosedur Pengujian
- Pengujian angka lempeng total di laboratorium mikrobiologi LPPMHP Surabaya menggunakan PACP, memiliki tahapan prosedur pengujian sebagai berikut :
- a. Siapkan PACP yang sudah tidak dingin, berikan tanda kode sampel dan tanda pengencerannya.
 - b. Tempatkan PACP pada permukaan yang datar.
 - c. Dengan pipet, tegak lurus sedot larutan suspensi sampel.
 - d. Angkat film atas dan dengan pipet tegak lurus mengeluarkan 1 ml suspensi sampel ke pusat film bawah.
 - e. Tekan tombol *down accu jet* hingga sampel terlepas dari pipet.
 - f. Tempatkan *spreader* (plastik penyebar sampel) dengan sisi tersembunyi yang terdapat rongga diletakkan dibagian bawah. Tekan lembut di tengah *spreader* untuk membagikan sampel secara merata. Jangan geser *spreader* di film sebelum gel terbentuk.
 - g. Jangan lepaskan spreader dari film sebelum sampai satu menit untuk mengizinkan gel terbentuk.
4. Inkubasi
- Film yang telah berisi sampel diinkubasikan dengan posisi horisontal dengan penyusunan sisi yang seragam, film dapat disusun bertumpuk dengan tidak lebih dari 20 tumpukan. Inkubasi dilakukan selama 48 jam \pm 1 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
5. Pembacaan dan perhitungan koloni pada PACP
- Koloni yang tumbuh dihitung dengan *coloni counter*. Kemudian dilakukan perhitungan jumlah koloni menggunakan metode standar lokal yaitu sesuai SNI 01-2332.3-2006 tentang pengujian angka lempeng total. Adapun perhitungannya adalah sebagai berikut :

- a. PACP yang mengandung antara 25-250 koloni.
Catat pengenceran yang digunakan dan hitung total jumlah koloni. Perhitungan Angka Lempeng Total (ALT) sbb:

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)] \times (d)}$$

dimana:

N = Jumlah koloni produk (koloni /ml atau koloni /g).

$\sum c$ = Jumlah koloni pada semua cawan yang dihitung.

n_1 = Jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung.

n_2 = Jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung.

d = Pengenceran pertama yang dihitung.

- b. PACP yang mengandung lebih besar dari 250 koloni.
Bila jumlah koloni per cawan lebih besar dari 250 pada seluruh pengenceran maka laporan hasilnya sebagai terlalu banyak untuk dihitung (TBUD), tetapi jika salah satu pengenceran mempunyai jumlah koloni mendekati 250 laporkan sebagai perkiraan ALT.
- c. PACP yang mengandung kurang dari 25 koloni atau cawan tanpa koloni.
Bila pada kedua pengenceran yang digunakan diperoleh koloni kurang dari 25, catat koloni yang ada, tetapi nyatakan perhitungan sebagai kurang dari 25 dan dikalikan dengan $1/d$, dimana d adalah faktor pengenceran pertama yang digunakan dan dilaporkan sebagai perkiraan ALT.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian Angka Lempeng Total (ALT) yang digunakan oleh Laboratorium Pengendalian dan Pengujian Mutu Hasil Perikanan (LPPMHP) Surabaya, biasanya mengacu pada SNI 01-2332.3-2006. Namun saat ini telah dilakukan pengembangan metode pengujian menggunakan PACP yang telah mendapatkan sertifikat ISO 9001, untuk meningkatkan efektifitas dan efisiensi kerja mikrobiologu LPPMHP Surabaya dalam pengujian ALT

Pada penelitian ini menggunakan kultur murni bakteri (*E. Coli*, *S. Aureus* dan *Salmonella*) agar tidak terjadi kontaminasi atau pengaruh dari pertumbuhan bakteri lain pada masing-masing metode. Adapun hasil evaluasi pengujian Angka Lempeng Total (ALT) kultur murni bakteri dengan dua metode, adalah berikut :

Metode *Plate Count Agar* (PCA)

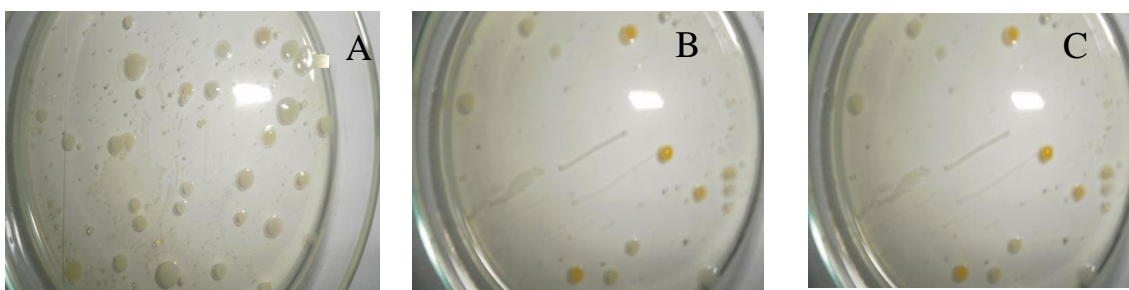
Hasil pengujian ALT yang menggunakan media *Plate Count Agar* (PCA) dapat dilihat pada Tabel 1 di bawah ini:

Tabel 1. Hasil Pengujian ALT pada Kultur Murni Bakteri dengan Media PCA

No.	Kode contoh	Cawan petri	Pengenceran				Keterangan
			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
1.	AS 31	A	76	10	2	2	Koloni berwarna putih
		B	113	14	0	0	
2.	AS 32	A	99	16	6	0	Koloni berwarna putih
		B	95	18	1	0	
3.	AS 33	A	90	8	2	0	Koloni berwarna putih
		B	89	10	1	0	
4.	BS 31	A	519	101	6	8	Koloni motil berwarna putih dan bulat kuning
		B	621	92	8	1	
5.	BS 32	A	504	106	25	20	Koloni motil berwarna putih dan bulat kuning
		B	577	124	18	2	
6.	BS 33	A	685	78	17	1	Koloni motil berwarna putih dan bulat kuning
		B	662	91	10	4	
7.	CS 21	A	TBUD	28	3	1	Koloni tampak lonjong dengan kenampakan yang jelas
		B	TBUD	28	1	0	
8.	CS 22	A	TBUD	34	3	1	Koloni tampak lonjong dengan kenampakan yang jelas
		B	TBUD	43	5	1	
9.	CS 23	A	TBUD	51	5	1	Koloni tampak lonjong dengan kenampakan yang jelas
		B	TBUD	43	3	1	

Keterangan: AS= *E. Coli*, BS= *S. Aureus* dan CS=*Salmonella*; Kode pengulangan= 31,32 & 33, masing-masing dilakukan duplo

Untuk mengidentifikasi kelayakan jumlah koloni yang tumbuh pada media PCA, maka dibuatkan kontrol pengencer dan media, dilakukan secara duplo. Pada pengujian ini didapatkan kontrol pengencer I sebanyak 1 koloni, kontrol pengencer II sebanyak 1 koloni, kontrol media I sebanyak 1 koloni dan kontrol media II tidak ditumbuhi koloni. Dapat dilihat dari kontrol pengencer dan kontrol media hanya ditumbuhi koloni atau jamur ≤ 1 . Sedangkan standar LPPMHP Surabaya terhadap jumlah koloni atau jamur yang tumbuh pada kontrol media dan agar maksimal adalah 5 (lima). Hal ini menunjukkan kalau jumlah koloni dari hasil pengujian ALT menggunakan media PCA ini dapat diterima, karena cemaran dari media ataupun pengencer yang dapat diabaikan.



Gambar 1. Koloni Kultur Murni Bakteri *E. Coli* pada Media PCA (A= *E. Coli*, B= *S. Aureus*, dan C= *Salmonella*)

Dari pegujian ALT ini, dapat diamati karakteristik koloni yang tumbuh pada media PCA ditinjau dari sampel kultur murni bakteri yang digunakan. Sampel dengan kultur murni bakteri *Eschericia coli*, mencirikan koloni yang berwarna putih dan menyebar pada media PCA. Pada sampel kultur murni bakteri *Staphylococcus aureus* didapatkan koloni *motil* (melakukan pergerakan) berwarna putih dan berbentuk bulat agak besar berwarna kuning. Sedangkan untuk kultur murni bakteri *Salmonella*, koloninya berbentuk lonjong, berwarna putih dengan titik hitam dibagian tengahnya. Seperti terlihat pada Gambar 1 di atas.

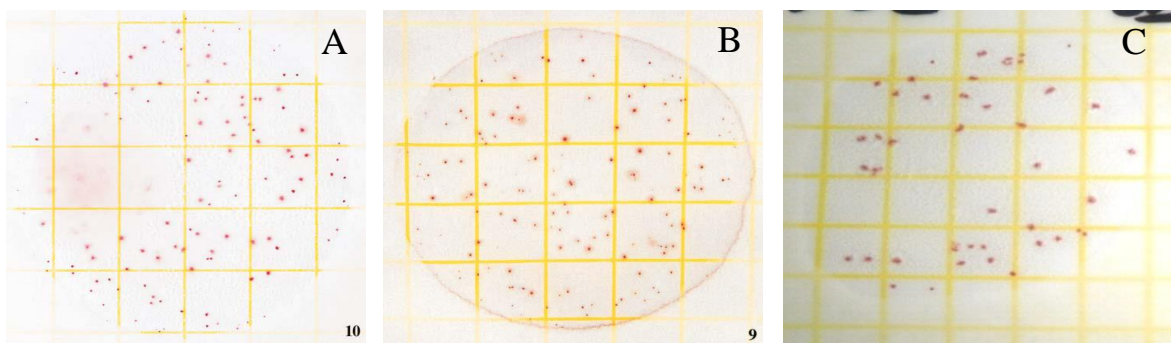
Metode PACP

Selanjutnya pengujian ALT menggunakan PACP. Pengujian ini dilakukan menggunakan 3 kultur bakteri yaitu : AS, BS dan CS. Masing-masing kultur dilakukan pengulangan

Tabel 2. Hasil Pengujian ALT pada Kultur Murni Bakteri Menggunakan PACP

No.	Kode contoh	Cawan petri	Pengenceran				Keterangan
			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
1.	AS 31	A	99	11	0	0	Koloni berwarna merah atau merah muda
		B	93	13	1	0	
2.	AS 32	A	117	5	0	0	Koloni berwarna merah atau merah muda
		B	106	7	0	0	
3.	AS 33	A	98	10	0	0	Koloni berwarna merah atau merah muda
		B	84	7	0	0	
4.	BS 31	A	TBUD	66	8	1	Koloni berwarna merah atau merah muda
		B	620	156	5	0	
5.	BS 32	A	TBUD	90	16	0	Koloni berwarna merah atau merah muda
		B	TBUD	96	8	0	
6.	BS 33	A	TBUD	93	16	2	Koloni berwarna merah atau merah muda
		B	TBUD	93	9	2	
7.	CS 21	A	TBUD	26	0	1	Koloni berwarna merah atau merah muda dan terpecah
		B	TBUD	16	4	0	
8.	CS 22	A	TBUD	36	4	2	Koloni berwarna merah atau merah muda dan terpecah
		B	TBUD	14	2	0	
9.	CS 23	A	TBUD	31	4	0	Koloni berwarna merah atau merah muda dan terpecah
		B	TBUD	32	4	1	

Masing-masing kultur dilakukan pengulangan pengujian sampai 3 kali dengan sampel kultur bakteri yang identik, yaitu : AS (AS 31, AS 32, AS 33), BS (BS 31, BS 32, BS 33) dan CS (CS 21, CS 22, CS 23). Pengujian ini dilakukan secara *duplo* untuk memberikan akurasi jumlah mikroba yang tumbuh pada pengujian ALT, dengan pengkodean A dan B pada tutup film bagian atas. Pengenceran dilakukan sebanyak 4 kali, hingga pengenceran ke 10⁻⁴. Hasil pengujian ALT pada kultur murni bakteri menggunakan PACP dapat dilihat pada Tabel 2 di atas.



Gambar 2. Koloni Kultur Murni Bakteri *E. Coli* pada PACP (A= *E. Coli*, B= *S. Aureus*, dan C= *Salmonella*)

Evaluasi Metode Terhadap Sampel Kultur Murni Bakteri

Evaluasi ini dilakukan sebagai acuan awal penelitian untuk pengujian ALT dengan dua metode ini. Apabila pada pengujian ini didapatkan hasil sesuai dengan yang diharapkan, maka penelitian selanjutnya dapat dilakukan. Evaluasi yang dilakukan sesuai dengan ISO 4833 (2003). Berikut adalah evaluasi yang dilakukan :

1. Keterulangan (*Repeatability*)

Keterulangan dilakukan untuk memberikan jaminan hasil pengujian yang telah dilakukan oleh peneliti adalah baik atau akurat dan tidak menyimpang dari metode uji, ataupun mendapatkan pengaruh lain yang mempengaruhi hasil pengujian. Keterulangan yang dilakukan sesuai ISO 4833.

Keterulangan diartikan sebagai perbedaan absolut antara dua hasil uji independen tunggal, diperoleh dengan menggunakan metode yang sama pada identik uji materi di laboratorium yang sama oleh operator yang sama menggunakan peralatan yang sama dalam waktu singkat interval waktu, tidak boleh lebih besar dari batas keterulangan, dengan r (simpangan) = 0,25, di log₁₀ mikroorganisme per mililiter (Sesuai dengan 1,8 pada skala normal dalam mikroorganisme per mililiter). Adapun keterulangan yang telah dilakukan dapat dilihat pada tabel-tabel berikut di bawah:

Sampel kultur murni bakteri *Eschericia Coli*

Jumlah koloni yang didapatkan pada sampel kultur murni *E. Coli*, kemudian dilakukan perhitungan ALT. Hasil perhitungan ALT kemudian dilog₁₀. Jumlahkan hasil log₁₀ dan hitung rata-ratanya. Rata-rata log₁₀ ALT ditambah dan dikurangi dengan $r = 0,25$, hasil perhitungan ini merupakan batas keterulangan. Log ALT yang masuk dalam batas Keterulangan, disimpulkan sebagai hasil pengujian yang baik. Hasil perhitungan Keterulangan kultur murni *E. Coli* dapat dicermati lebih jelas seperti pada Tabel 3 dan Tabel 4 sebagai berikut ini.

Tabel 3. Keterulangan pada Kultur Murni Bakteri *E. Coli* dengan media PCA

No.	Kode contoh	PCA		Batas Keterulangan* (Log ALT)	Kesimpulan
		ALT	Log		
1.	AS 31	760	2,8808	2,6906 – 3,1906	Diterima
2.	AS 32	970	2,9868	2,6906 – 3,1906	Diterima
3.	AS 33	900	2,9542	2,6906 – 3,1906	Diterima
Jumlah			8,8218		
Rata-rata			2,9406		

Keterangan * : 0,25, nilai batas keterulangan sesuai ISO 4833. Sesuai Tabel 3. diatas, semua hasil pengujian ALT kultur murni bakteri *E. Coli* pada media PCA, masuk dalam batas keberterimaan keterulangan ISO 4833.

Tabel 4. Keterulangan pada Kultur Murni Bakteri *E. Coli* menggunakan PACP

No.	Kode contoh	PACP		Batas Keterulangan * (Log ALT)	Kesimpulan
		ALT	Log		
1.	AS 31	930	2,9685	2,7396 – 3,2196	Diterima
2.	AS 32	1100	3,0414	2,7396 – 3,2196	Diterima
3.	AS 33	910	2,9590	2,7396 – 3,2196	Diterima
Jumlah			8,9689		
Rata-rata			2,9896		

Keterangan * : 0,25, nilai batas keterulangan sesuai ISO 4833

Sesuai Tabel 4. diatas, semua hasil pengujian ALT kultur murni *S. Aureus* pada media PCA, masuk pada batas keberterimaan keterulangan ISO 4833.

Sampel kultur murni bakteri *Staphylococcus Aureus*

Perhitungan sama dengan pada kultur murni *E. coli*. Hasil perhitungan keterulangan kultur murni *S. Aureus* dapat dilihat pada Tabel 5. dan Tabel 6. dibawah.

Tabel 5. Keterulangan pada Kultur Murni Bakteri *S. Aureus* dengan media PCA

No.	Kode contoh	PCA		Batas keterulangan * (Log ALT)	Kesimpulan
		ALT	Log		
1.	BS 31	9700	3,9868	3,7484 – 4,2484	Diterima
2.	BS 32	12000	4,0791	3,7484 – 4,2484	Diterima
3.	BS 33	8500	3,9294	3,7484 – 4,2484	Diterima
Jumlah			11,9953		
Rata-rata			3,9984		

Keterangan * : 0,25, nilai batas keterulangan sesuai ISO 4833

Sesuai Tabel 5. diatas, semua hasil pengujian ALT kultur murni bakteri *S. Aureus* pada media PCA, masuk dalam batas keberterimaan keterulangan ISO 4833.

Tabel 6. Keterulangan pada Kultur Murni Bakteri *S. Aureus* menggunakan PACP

No.	Kode contoh	PACP		Batas keterulangan * (Log ALT)	Kesimpulan
		ALT	Log		
1.	BS 31	11000	4,0414	3,7671 – 4,2671	Diterima
2.	BS 32	11000	4,0414	3,7671 – 4,2671	Diterima
3.	BS 33	9300	3,9685	3,7671 – 4,2671	Diterima
Jumlah			12,0513		
Rata-rata			4,0171		

Keterangan * : 0,25, nilai batas keterulangan sesuai ISO 4833

Semua hasil pengujian ALT kultur murni bakteri *S. Aureus* menggunakan PACP, masuk dalam keberterimaan keterulangan ISO 4833.

Contoh kultur murni bakteri *Salmonella*

Perhitungan dilakukan sama dengan kultur bakteri lainnya. Hasil perhitungan keterulangan kultur murni *Salmonella* dapat dilihat pada Tabel 7. dan Tabel 8. dibawah.

Tabel 7. Keterulangan pada Kultur Murni Bakteri *Salmonella* dengan media PCA

No.	Kode contoh	PCA		Batas keterulangan * (Log ALT)	Kesimpulan
		ALT	Log		
1.	CS 21	2800	3,4472	3,3201 – 3,8201	Diterima
2.	CS 22	3900	3,5911	3,3201 – 3,8201	Diterima
3.	CS 23	4700	3,6721	3,3201 – 3,8201	Diterima
Jumlah			10,7104		
Rata-rata			3,5701		

Keterangan * : 0,25, nilai batas keterulangan sesuai ISO 4833

Sesuai tabel diatas, semua hasil pengujian ALT kultur murni bakteri *E. Coli* pada media PCA, masuk dalam batas keberterimaan keterulangan ISO 4833.

Tabel 8. Keterulangan pada Kultur Murni Bakteri *Salmonella* menggunakan PACP

No.	Kode contoh	PACP		Batas keterulangan * (Log ALT)	Kesimpulan
		ALT	Log		
1.	CS 21	2600	3,4150	3,2421 – 3,7421	Diterima
2.	CS 22	3600	3,5563	3,2421 – 3,7421	Diterima
3.	CS 23	3200	3,5051	3,2421 – 3,7421	Diterima
Jumlah			10,4764		
Rata-rata			3,4921		

Keterangan * : 0,25, nilai batas keterulangan sesuai ISO 4833

Semua hasil pengujian ALT kultur murni bakteri *Salmonella* menggunakan PACP, masuk dalam keberterimaan keterulangan ISO 4833.

Setelah dilakukan perhitungan keterulangan (keterulangan) pada kultur murni bakteri, ternyata semua hasil pengujian ALT pada sampel kultur murni bakteri dapat diterima sesuai perhitungan statistik ISO 4833. Hal ini menunjukkan bahwa kerja peneliti dalam pengujian ini, telah dilakukan dengan baik sesuai metode. Sehingga dapat dikatakan bahwa data pengujian yang didapatkan adalah akurat.

2. Reproduksiabilitas (*Reproducibility*)

Reproduksiabilitas dilakukan untuk melihat kesamaan atau kesesuaian antara metode yang dikembangkan dengan metode standar. Reproduksiabilitas yang dilakukan sesuai dengan ISO 4833. Pada evaluasi awal dilakukan perhitungan reproduksiabilitas pada hasil pengujian ALT kultur murni bakteri. Digunakan kultur murni bakteri dengan harapan tidak banyak terjadi penyimpangan pada hasil pengujian nantinya. Hasil perhitungan ini digunakan sebagai acuan awal, sebelum dilakukan evaluasi metode dengan sampel produk perikanan.

Reproduksiabilitas diartikan sebagai perbedaan absolut antara dua hasil uji tunggal, diperoleh dengan menggunakan metode yang sama pada uji identik bahan di laboratorium yang berbeda dengan operator berbeda menggunakan peralatan yang berbeda, tidak boleh lebih besar dari batas reproduktifitas, $R = 0,45$, di \log_{10} mikroorganisme per mililiter (Sesuai dengan 2,8 pada skala normal dalam mikroorganisme per mililiter).

Jumlah koloni kultur murni bakteri yang didapatkan dari masing-masing media, dilakukan perhitungan ALT. Hasil perhitungan ALT kemudian dilog₁₀ dan catat hasilnya. Karena standar metode pengujian adalah SNI 01-2332.3-2006, maka kurangi dan tambahkan masing-masing log₁₀ ALT PCA dengan $r = 0,45$, hasil ini merupakan batas reproduksiabilitas (reproduksiabilitas). Log ALT PACP yang masuk pada batas reproduksiabilitas, disimpulkan sebagai hasil pengujian ALT yang sesuai dengan metode standar (SNI 01-2332.3-2006). Adapun perhitungan reproduksiabilitas yang telah dilakukan dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Reproduksiabilitas Metode Pengujian ALT dengan Sampel Kultur Murni Bakteri *E. Coli*, *S. Aureus* dan *Salmonella*

No.	Kode contoh	PCA		PACP		Batas Reproduksiabilitas* (Log ALT)	Kesimpulan
		ALT	Log	ALT	Log		
1.	AS 31	760	2,8808	930	2,9685	2,4308 – 3,3308	Diterima
2.	AS 32	970	2,9868	1100	3,0414	2,5368 – 3,4368	Diterima
3.	AS 33	900	2,9542	910	2,9590	2,5042 – 3,4042	Diterima
4.	BS 31	9700	3,9868	11000	4,0414	3,4368 – 4,4914	Diterima
5.	BS 32	12000	4,0791	11000	4,0414	3,6291 – 4,5291	Diterima
6.	BS 33	8500	3,9294	9300	3,9685	3,4794 – 4,3794	Diterima
7.	CS 21	2800	3,4472	2600	3,4150	2,9972 – 3,8972	Diterima
8.	CS 22	3900	3,5911	3600	3,5563	3,1411 – 4,0411	Diterima
9.	CS 23	4700	3,6721	3200	3,5051	3,2221 – 4,1221	Diterima

Keterangan * : 0,45, nilai batas reproduksiabilitas sesuai ISO 4833

Dari perhitungan reproduksibilitas ternyata semua hasil perhitungan ALT kultur murni bakteri dengan dua metode berbeda, memiliki hasil pengujian yang sama sesuai perhitungan statistik ISO 4833. Hasil ini menunjukkan bahwa pengujian ALT menggunakan PACP memiliki kesesuaian yang baik dengan SNI 01-2332.3-2006 sebagai metode standar pengujian ALT, ditinjau dari penggunaan sampel kultur murni bakteri. Selanjutnya dapat dilakukan evaluasi kesesuaian metode pada sampel produk perikanan.

Hasil dan Evaluasi Pengujian ALT Menggunakan PACP dan Metode SNI 01-2332.3-2006 Terhadap Produk Perikanan

Setelah didapatkan evaluasi hasil pengujian ALT pada kultur murni bakteri dan hasil pengujian ALT, kemudian dilakukan pengujian ketahanan PACP terhadap pengujian ALT pada produk perikanan, serta untuk melihat kesesuaian hasil pengujian dengan metode SNI 01-2332.3-2006. Pengujian ini dilakukan pada beberapa sampel produk perikanan yang diujikan oleh perusahaan di LPPMHP Surabaya. Adapun hasil pengujian dan evaluasi yang dilakukan adalah sebagai berikut :

Hasil Pengujian dari Sampel Produk Hasil Perikanan I

Setelah dilakukan pengujian ALT pada produk perikanan, akhirnya didapatkan perhitungan jumlah koloni yang beragam dengan beberapa karakteristik tertentu. Berikut adalah hasil dari pengujian yang telah dilakukan :

Pengujian ALT produk perikanan I menggunakan media PCA dan PACP, dilakukan menggunakan 6 sampel produk perikanan yang diujikan beberapa perusahaan di LPPMHP Surabaya. Pengujian ini dilakukan secara *duplo* untuk memberikan akurasi jumlah mikroba yang tumbuh pada pengujian ALT, dengan pengkodean A dan B pada bagian tutup media. Pengenceran dilakukan sebanyak 4 kali, hingga pengenceran ke 10^{-4} . Berikut adalah Keterangan kode sampel dan hasil pengujian ALT pada produk perikanan I :

29968642 SCP 1-13 : Prefried frozen dim sum shrimpers (vannamei cook)
 249934756 SOO 1-21 : Frozen breaded shrimp
 1191 SO 1-13 : Vannamei PND
 509952657 OCT 1-6 : Gurita beku (octopus boiled)
 509952545 IT 1-13 : Tuna steak
 ..6564 : Fillet salmon beku (king salmon nat fillet)

Tabel 10. Hasil Pengujian ALT pada Produk Perikanan dengan Media PCA

No.	Kode contoh	Cawan petri	Pengenceran				Keterangan
			10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	
1.	29968642	A B	57 62	7 15	0 2	0 0	Koloni berwarna putih dan kuning, dan terdapat koloni motil
2.	1191	A B	TBUD TBUD	229 242	29 26	8 2	Pengenceran 10^{-1} terbentuk jamur, Koloni berwarna putih dan kuning

No.	Kode contoh	Cawan petri	Pengenceran				Keterangan
			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
3.	249934756	A	TBUD	99	11	2	Koloni berwarna putih dan kuning dan terdapat koloni motil
		B	TBUD	140	36	6	
4.	509952657	A	TBUD	388	26	0	Pengenceran pertama terbentuk jamur
		B	TBUD	286	27	4	
5.	509952545	A	TBUD	TBU	151	16	Pengenceran pertama terbentuk jamur
		B	TBUD	D 505	119	12	
6.	..6564	A	283	48	5	2	Koloni berwarna putih dan kuning
		B	328	52	6	0	

Untuk mengidentifikasi kelayakan jumlah koloni yang tumbuh pada media PCA, maka dibuatkan kontrol pengencer dan media, dilakukan secara duplo. Pada pengujian ini didapatkan kontrol pengencer I sebanyak 1 koloni, kontrol pengencer II sebanyak 2 koloni, kontrol media I sebanyak 1 koloni dan kontrol media II sebanyak 2 koloni. Dapat dilihat dari kontrol pengencer dan media, ternyata hanya ditumbuhi ≤ 2 koloni, sedangkan standar LPPMHP Surabaya terhadap jumlah koloni atau jamur yang tumbuh pada kontrol media dan agar maksimal adalah 5 (lima). Hal ini menunjukkan hasil pengujian ALT menggunakan media PCA ini dapat diterima, karena kontaminan yang diberikan dari pengencer dan media sangat kecil. Koloni yang tumbuh berwarna putih dan kuning, terdapat koloni yang membentuk pergerakan (motil), beberapa sampel juga membentuk jamur pada media PCA.

Tabel 11. Hasil Pengujian ALT pada Produk Perikanan I menggunakan PACP

No.	Kode contoh	Cawan petri	Pengenceran				Keterangan
			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
1.	29968642	A	111	18	2	0	Koloni berwarna merah atau merah muda
		B	80	15	2	0	
2.	1191	A	TBUD	TBUD	55	5	Koloni berwarna merah atau merah muda
		B	TBUD	304	44	4	
3.	249934756	A	TBUD	91	12	0	Koloni berwarna merah atau merah muda
		B	TBUD	96	15	3	
4.	509952657	A	TBUD	TBUD	35	2	Koloni berwarna merah atau merah muda
		B	TBUD	339	34	7	
5.	509952545	A	TBUD	TBUD	152	13	Koloni berwarna merah atau merah muda
		B	TBUD	TBUD	122	11	
6.	..6564	A	259	17	5	1	Koloni berwarna merah atau merah muda
		B	245	32	6	0	

Untuk mengidentifikasi kelayakan jumlah koloni yang tumbuh pada media PACP, maka dibuatkan kontrol pengencer, dilakukan secara duplo. Kontrol pengujian ALT menggunakan PACP hanya dilakukan terhadap pengencer. Ini dikarenakan PACP hanya dapat bekerja ketika bereaksi dengan pengencernya. Pada pengujian ini didapatkan kontrol pengencer I dan kontrol pengencer II tidak ditumbuhi koloni. Dapat dilihat pada pengujian ini, kontrol pengencer yang sama sekali tidak ditumbuhi koloni, sedangkan standar

LPPMHP Surabaya terhadap jumlah koloni atau jamur yang tumbuh pada kontrol media dan agar maksimal adalah 5 (lima). Hal ini menunjukkan hasil pengujian ALT menggunakan PACP ini dapat diterima, karena tidak terdapat kontaminasi dari pengencer. Koloni yang tumbuh berwarna merah dan merah muda.

Sampel Produk Hasil Perikanan II

Pengujian ALT produk perikanan II menggunakan media PCA dan PACP, dilakukan menggunakan 6 sampel produk perikanan yang diujikan beberapa perusahaan di LPPMHP Surabaya. Pengujian ini dilakukan secara *duplo* untuk memberikan akurasi jumlah mikroba yang tumbuh pada pengujian ALT, dengan pengkodean A dan B pada bagian tutup media. Pengenceran dilakukan sebanyak 4 kali, hingga pengenceran ke 10^{-4} . Berikut adalah Keterangan kode sampel dan hasil pengujian ALT pada produk perikanan II :

1271 ISE	: kapasan HL (kapasan beku tanpa kepala)
1258 KTT 17-21	: Meat (daging paha katak)
509954750 IT 1-8 SSFNCCO	: Fillet kakap
279927429 FUU 1-6	: Frog meat (paha katak beku kecil)
1268 IBJ 1-12	: King snapper fillet
29969594 IG 9-13	: Ikan Gulama

Tabel 12. Hasil Pengujian ALT pada Produk Perikanan II dengan Media PCA

No.	Kode contoh	Cawan petri	Pengenceran				Keterangan
			10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	
1.	1271	A	TBUD	TBUD	TBUD	109	Pengenceran 10^{-1} terbentuk jamur, koloni berwarna putih dan kuning
		B	TBUD	TBUD	TBUD	108	
2.	1258	A	TBUD	TBUD	TBUD	42	Pengenceran 10^{-1} terbentuk jamur, koloni berwarna putih dan kuning
		B	TBUD	TBUD	TBUD	43	
3.	509954750	A	TBUD	TBUD	TBUD	39	Koloni berwarna putih dan kuning
		B	TBUD	TBUD	TBUD	33	
4.	279927429	A	TBUD	TBUD	TBUD	42	Pengenceran 10^{-1} terbentuk jamur, koloni berwarna putih dan kuning
		B	TBUD	TBUD	TBUD	55	
5.	1268	A	TBUD	TBUD	TBUD	134	Pengenceran 10^{-1} terbentuk jamur, koloni berwarna putih dan kuning
		B	TBUD	TBUD	TBUD	122	
6.	29969594	A	TBUD	TBUD	183	20	Koloni berwarna putih dan kuning
		B	TBUD	TBUD	132	13	

Pada pengujian kali ini dibuatkan kontrol lingkungan, untuk melihat seberapa tinggi kontaminasi dari lingkungan. Kontrol lingkungan dibuat setelah dilakukan penghidupan lampu UV selama ± 30 menit. Penghidupan lampu UV dilakukan 2 sampai 3 kali setiap bulan untuk mengurangi kontaminasi dari bakteri di ruang laboratorium mikrobiologi. Standar LPPMHP terhadap jumlah koloni atau jamur pada kontrol lingkungan adalah 15.

Dari kontrol lingkungan didapatkan ≤ 6 koloni. Jumlah ini masih dapat diterima, karena dalam pengujian dilakukan pada *laminary flow chart* dan digunakan bunsen untuk meminimalkan kontaminan dari lingkungan. Selain itu pengujian dilakukan dengan cepat dan teliti, sehingga jumlah kontaminan yang sedikit tidak akan mempengaruhi hasil pengujian.

Sedangkan untuk mengidentifikasi kelayakan jumlah koloni yang tumbuh pada media PCA, maka dibuatkan kontrol pengencer dan media, dilakukan secara duplo. Pada pengujian ini didapatkan kontrol pengencer I sebanyak 2 koloni, kontrol pengencer II sebanyak 1 koloni, kontrol media I tidak ditumbuhi koloni dan kontrol media II sebanyak 1 koloni. Dapat dilihat kontrol pengencer dan media hanya ditumbuhi ≤ 2 koloni, sedangkan standar LPPMHP Surabaya terhadap jumlah koloni atau jamur yang tumbuh pada kontrol media dan agar maksimal adalah lima. Hal ini menunjukkan hasil pengujian ALT menggunakan media PCA ini dapat diterima, karena kontaminan yang diberikan dari pengencer dan media sangat kecil. Koloni yang tumbuh berwarna putih dan kuning, beberapa sampel juga membentuk jamur pada media PCA.

Tabel 13. Hasil Pengujian ALT pada Produk Perikanan II Menggunakan PACP

No.	Kode contoh	Cawan petri	Pengenceran				Keterangan
			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
1.	1271	A	TBUD	TBUD	TBUD	107	Koloni berwarna merah atau merah muda
		B	TBUD	TBUD	TBUD	112	
2.	1258	A	TBUD	TBUD	TBUD	45	Koloni berwarna merah atau merah muda
		B	TBUD	TBUD	TBUD	43	
3.	509954750	A	TBUD	TBUD	TBUD	42	Koloni berwarna merah atau merah muda
		B	TBUD	TBUD	TBUD	45	
4.	279927429	A	TBUD	TBUD	TBUD	69	Koloni berwarna merah atau merah muda
		B	TBUD	TBUD	TBUD	63	
5.	1268	A	TBUD	TBUD	TBUD	146	Koloni berwarna merah atau merah muda
		B	TBUD	TBUD	TBUD	154	
6.	29969594	A	TBUD	TBUD	148	10	Koloni berwarna merah atau merah muda
		B	TBUD	TBUD	117	15	

Untuk mengidentifikasi kelayakan jumlah koloni yang tumbuh pada media PACP, maka dibuatkan kontrol pengencer, dilakukan secara duplo. Kontrol pengujian ALT menggunakan PACP hanya dilakukan terhadap pengencer. Ini dikarenakan PACP hanya dapat bekerja ketika bereaksi dengan pengencernya. Pada pengujian ini didapatkan kontrol pengencer I ditumbuhi 1 koloni dan kontrol pengencer II tidak ditumbuhi koloni. Dari hasil pengujian ini, dapat dilihat kontrol pengencer ditumbuhi ≤ 1 koloni. Hal ini menunjukkan

hasil pengujian ALT menggunakan PACP ini dapat diterima, karena kontaminan dari pengencer sangat kecil. Koloni yang tumbuh pada PACP berwarna merah dan merah muda.

Evaluasi Metode Terhadap Sampel Produk Perikanan

Setelah didapatkan hasil perhitungan ALT pada berbagai sampel produk perikanan, selanjutnya dilakukan perhitungan reproduksibilitas untuk melihat kesesuaian metode pengujian menggunakan PACP terhadap metode SNI 01-2332.3-2006.

Tabel 14. Reproduksibilitas Metode Pengujian ALT dengan Sampel Produk Perikanan

No	Kode contoh	PCA		PACP		Batas diterima* reproduksibilitas (Log ALT)	Kesimpulan
		3	4	5	6		
1.	249934756	13000	4,1139	9400	3,9731	3,6639 – 4,5639	Diterima
2.	29968642	600	2,7782	960	2,9823	2,3282 – 3,2285	Diterima
3.	1271	3000	3,4771	7500	3,8751	3,0271 – 3,9271	Diterima
4.	279927429	9600	3,9822	19000	4,2787	3,5322 – 4,4322	Diterima
5.	509954750	81000	4,9085	64000	4,8062	4,4585 – 5,3585	Diterima
6.	29969594	160000	5,2041	130000	5,1139	4,7541 – 5,6541	Diterima
7.	5099552657	27000	4,4314	35000	4,5441	3,9814 – 4,8814	Diterima
8.	1191	28000	4,4472	49000	4,6902	3,9972 – 4,8972	Diterima
9.	..6564	5000	3,6990	2500	3,3979	3,2490 – 4,1490	Diterima
10.	509954750	360000	5,5563	440000	5,6435	5,1063 – 6,0063	Diterima
11.	509952545	14000	4,1461	14000	4,1461	3,6961 – 4,5961	Diterima
12.	1268	1300000	6,1139	1500000	6,1761	5,6639 – 6,5639	Diterima

Keterangan * : 0,45 nilai batas *reproduksibilitas* metode sesuai ISO 4833

Keterangan kode sampel :

29968642 SCP 1-13	: Prefried frozen dim sum shrimpers (vannamei cook)
249934756 SOO 1-21	: Frozen breaded shrimp
1191 SO 1-13	: Vannamei PND
509952657 OCT 1-6	: Octopus boiled (gurita beku)
509952545 IT 1-13	: Tuna steak
..6564	: King salmon nat fillet (fillet salmon beku)
1271 ISE	: kapassan HL (kapasan beku tanpa kepala)
1258 KTT 17-21	: Meat (daging paha katak)
509954750 IT 1-8 SSFNCCO	: Fillet kakap
279927429 FUU 1-6	: Frog meat (paha katak beku kecil)
1268 IBJ 1-12	: King snapper fillet
29969594 IG 9-13	: Ikan Gulama

Jumlah koloni sampel produk perikanan yang didapatkan dari masing-masing media, dilakukan perhitungan ALT sesuai dengan metode standar. Hasil perhitungan ALT kemudian dilog₁₀ dan catat hasilnya. Karena standar metode pengujian ini adalah SNI 01-2332.3-2006, maka kurangi dan tambahkan masing-masing log₁₀ ALT media PCA dengan nilai simpangan (r) = 0,45 sesuai aturan ISO 4833, hasil ini merupakan batas

reproduksibilitas (reproduksibilitas). Log ALT PACP yang masuk pada batas reproduksibilitas, disimpulkan sebagai hasil pengujian ALT yang sesuai dengan metode standar (SNI 01-2332.3-2006). Adapun perhitungan reproduksibilitas, dapat dilihat pada Tabel 14. Di atas.

Dari perhitungan reproduksibilitas diatas dapat dilihat bahwa pengujian ALT pada produk perikanan menggunakan dua metode memiliki hasil pengujian yang sama, sesuai perhitungan statistik ISO 4833. Selanjutnya dapat disimpulkan bahwa pengujian ALT pada produk perikanan dapat menggunakan PACP, karena sesuai dengan SNI 01-2332.3-2006 sebagai metode standar pengujian ALT pada produk perikanan

KESIMPULAN

Setelah dilakukan evaluasi metode berdasarkan ISO 4833, ternyata pengujian ALT menggunakan PACP sesuai dengan SNI 01-2332.3-2006 sebagai metode standar pengujian, serta memiliki kesesuaian yang baik pada pengujian ALT dengan sampel produk perikanan.

DAFTAR PUSTAKA

- ISO 4883. 2003. *Horizontal method for the enumeration of microorganisms*
- Kementrian Kelautan dan Perikanan. 2008. *DKP Dorong Penerapan Food Safety Produk Perikanan*. http://www.kkp.go.id/index.php/arc_hives/c/34/208/dkp-drong-penerapan-food-safety-produk-perikanan/.diakses 12 Januari 2016.
- Method Organization 3M. 2000. *3M Petrifilm Aerobic Count Plate*. US microbiologi
- Nazir, M. 1998. *Metode Penelitian*. Ghalia Indonesia. Jakarta
- Riyadi, Dkk. 2007. *Menuju Jaminan Keamanan Pangan Produk Perikanan dengan Traceability*. <http://www.bbrrp2b.kkp.go.id/en/media-massa/menuju-jaminan-keamanan-pangan-produk-perikanan-dengan-traceability/>
- SNI 01-2332.3-2006. 2006. *Penentuan Angka Lempeng Total (ALT) pada Produk Perikanan*. Badan Standardisasi Nasional. Jakarta.