

Tempe kedelai





© BSN 2015

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN

Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)

[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta

## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif .....	1
3 Istilah dan definisi .....	1
4 Komposisi.....	1
5 Syarat mutu .....	2
6 Pengambilan contoh.....	2
7 Cara uji .....	2
8 Syarat lulus uji .....	3
9 Higiene .....	3
10 Pengemasan .....	3
11 Syarat penandaan .....	3
Lampiran A (normatif) Cara uji tempe kedelai .....	4
Bibliografi.....	26
Tabel 1 - Syarat mutu tempe kedelai.....	2

## Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Tempe kedelai* ini merupakan revisi SNI 3144:2009, *Tempe kedelai*. Standar ini direvisi dan dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut:

1. Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam metode uji dan persyaratan mutu;
2. Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku;
3. Melindungi kesehatan dan kepentingan konsumen;
4. Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
5. Mendukung perkembangan dan diversifikasi industri tempe kedelai.

Perubahan yang terjadi pada standar ini adalah:

1. Penambahan kalimat untuk tempe kedelai segar dan/atau tempe kedelai beku pada ruang lingkup;
2. Penghilangan kata keabu-abuan, dan penambahan kata kedelai kupas yang direbus dengan penyusunan ulang kalimat pada istilah dan definisi;
3. Penambahan pasal komposisi;
4. Penambahan kriteria uji yaitu tekstur, dan penghilangan kriteria uji rasa, kadar abu, serta penyesuaian nilai kriteria uji protein dan cemaran logam dan cemaran mikroba sesuai dengan ketentuan yang berlaku pada syarat mutu;
5. Penyesuaian metode uji mengacu standar terkini.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan ketentuan pada:

1. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
2. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
3. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 18 Tahun 2012 tentang Pangan.
4. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 3 Tahun 2014 tentang Perindustrian.
5. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 20 Tahun 2014 tentang Standardisasi dan Penilaian Kesesuaian.
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
7. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan.
8. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia Nomor 24/M-IND/PER/2/2010 tentang Pencantuman Logo Tara Pangan dan Kode Daur Ulang pada Kemasan Pangan dari Plastik.
9. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia Nomor 75/M-IND/PER/7/2010 tentang Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik (*Good Manufacturing Practices*).
10. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 033/2012, tentang Bahan Tambahan Pangan.
11. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
12. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor HK. 00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Kimia dalam Makanan.

Standar ini dirumuskan oleh **Komite Teknis 67-04, Makanan dan Minuman**, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 28 April 2014 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 16 Februari 2015 dengan perpanjangan satu bulan sampai dengan tanggal 14 Mei 2015 dengan hasil akhir RASNI.



## Tempe kedelai

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, komposisi, syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji tempe kedelai segar dan/atau tempe kedelai beku.

### 2 Acuan normatif

Acuan berikut merupakan bagian tidak terpisahkan untuk penggunaan standar ini. Untuk acuan bertanggal, hanya edisi yang diacu digunakan. Untuk acuan tidak bertanggal, edisi terakhir dari dokumen acuan (termasuk amandemen) digunakan.

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

SNI ISO 4831, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metode horizontal untuk deteksi dan enumerasi koliform – Teknik Angka Paling Mungkin (APM)*.

SNI ISO 6887-1, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Penyiapan contoh uji, suspensi awal dan pengenceran desimal untuk pengujian mikrobiologi – Bagian 1: Aturan umum untuk penyiapan suspensi awal dan pengenceran desimal*.

SNI ISO 6887-4, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Penyiapan contoh uji, suspensi awal dan pengenceran desimal untuk pengujian mikrobiologi – Bagian 4 : aturan khusus untuk penyiapan produk lain selain susu dan produk susu, daging dan produk daging, dan ikan serta produk perikanan*

### 3 Istilah dan definisi

#### 3.1

##### **tempe kedelai**

produk berbentuk padatan kompak berwarna putih, yang diperoleh dari kedelai kupas yang sudah direbus dan difermentasi menggunakan kapang *Rhizopus spp*

### 4 Komposisi

#### 4.1 Bahan baku

4.1.1 Kedelai (*Glycine max*) dari berbagai varietas.

4.1.2 Kapang *Rhizopus spp.* (*R. oligosporus*, *R. oryzae*, *R. stolonifer*, dan/atau *R. arrhizus*) yang dicampur dengan tepung nasi, tepung bekatul, dan atau tepung onggok sebagai inokulum.

#### 4.2 Bahan penolong

Bahan penolong dapat digunakan untuk mengatur keasaman pada saat perendaman kedelai sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

## 5 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	Tekstur	-	kompak, jika diiris tetap utuh (tidak mudah rontok)
1.2	Warna	-	putih merata pada seluruh permukaan
1.3	Bau	-	bau khas tempe tanpa adanya bau amoniak
2	Kadar air	fraksi massa, %	maks. 65
3	Kadar lemak	fraksi massa, %	min. 7
4	Kadar protein (N x 5,71)	fraksi massa, %	min. 15
5	Kadar serat kasar	fraksi massa, %	maks. 2,5
6	Cemaran logam		
6.1	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,2
6.2	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 0,25
6.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40
6.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,03
7	Cemaran Arsen (As)	mg/kg	maks. 0,25
8	Cemaran mikroba		
8.1	<i>Coliform</i>	APM/g	maks. 10
8.2	<i>Salmonella sp.</i>	-	negatif/25 g

## 6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428.

## 7 Cara uji

Cara uji untuk tempe kedelai seperti di bawah ini:

- a) Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1
- b) Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
  - Cara uji tekstur sesuai Lampiran A.2.1
  - Cara uji warna sesuai Lampiran A.2.2
  - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.3

- c) Cara uji kadar air sesuai Lampiran A.3
- d) Cara uji kadar lemak sesuai Lampiran A.4
- e) Cara uji kadar protein sesuai Lampiran A.5
- f) Cara uji kadar serat kasar sesuai Lampiran A.6
- g) Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.7
  - Cara uji kadmium (Cd) dan timbal (Pb) sesuai Lampiran A.7.1
  - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.7.2
  - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.7.3
- h) Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.8
- i) Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.9
  - Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan SNI ISO 6887-1 dan SNI ISO 6887-4
  - Cara uji bakteri *Coliform* sesuai dengan SNI ISO 4831
  - Cara uji *Salmonella sp.* sesuai Lampiran A.9.1

## **8 Syarat lulus uji**

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Tabel 1.

## **9 Higiene**

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya mengacu pada ketentuan yang berlaku.

## **10 Pengemasan**

Produk dikemas dalam kemasan yang tertutup baik, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, dan aman selama pengangkutan dan distribusi.

## **11 Syarat penandaan**

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku.



**Lampiran A**  
(normatif)  
**Cara uji tempe kedelai**

**A.1 Persiapan contoh**

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

**A.1.1 Persiapan contoh untuk uji keadaan**

Buka kemasan tempe kedelai dan ambil contoh 400 g, kemudian tempatkan dalam wadah yang bersih dan kering.

**A.1.2 Persiapan contoh untuk analisis kimia**

Ambil tempe kedelai yang mewakili contoh uji sebanyak 400 g, buka kemasan kemudian hancurkan dengan menggunakan blender dan aduk hingga homogen. Kemudian masukkan ke dalam wadah yang bersih, kering dan kedap udara.

**A.1.3 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi**

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

**A.2 Keadaan****A.2.1 Tekstur****A.2.1.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera peraba yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian keadaan.

**A.2.1.2 Cara kerja**

- a) Ambil contoh uji dan letakkan di atas wadah yang bersih dan kering;
- b) amati contoh uji untuk mengetahui teksturnya dengan menekan menggunakan jari tangan dan mengiris menggunakan pisau yang bersih; dan
- c) lakukan pengerjaan minimum oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

**A.2.1.3 Cara menyatakan hasil**

- a) Jika tempe ditekan dan diiris tetap utuh (tidak mudah rontok), maka hasil dinyatakan "kompak, jika diiris tetap utuh (tidak mudah rontok)"; dan
- b) Jika teksturnya ketika ditekan dan diiris tidak kompak, tidak utuh (mudah rontok), maka disebutkan tekstur yang diamati.

## A.2.2 Warna

### A.2.2.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera penglihatan yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian keadaan.

### A.2.2.2 Cara kerja

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

### A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika warnanya putih merata, hasil dinyatakan “putih merata pada seluruh permukaan”; dan
- b) jika warnanya lain dari putih merata, hasil dinyatakan “tidak normal”.

## A.2.3 Bau

### A.2.3.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian keadaan.

### A.2.3.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji dan letakkan di atas wadah yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimum oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

### A.2.3.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tercium bau khas tempe tanpa ada bau amoniak, maka hasil dinyatakan “bau khas tempe tanpa ada bau amoniak”; dan
- b) jika tercium selain bau tersebut, maka hasil dinyatakan “tidak normal”.

## A.3 Kadar air

### A.3.1 Prinsip

Kadar air dihitung berdasarkan bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven vakum pada temperatur (95 - 100) °C.

### A.3.2 Peralatan

- a) Cawan nikel, platina atau aluminium;
- b) desikator; dan
- c) oven vakum.

### A. 3.3 Cara kerja

- a) Panaskan cawan dalam oven pada temperatur  $(100 \pm 5) ^\circ\text{C}$  selama satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 20 menit sampai dengan 30 menit, kemudian timbang dengan neraca analitik ( $W_0$ );
- b) masukkan 2 g contoh ke dalam cawan, dan timbang ( $W_1$ );
- c) panaskan cawan yang berisi contoh di dalam oven pada temperatur  $(95 - 100)^\circ\text{C}$  dengan tekanan  $\leq 100$  mmHg (13,3 kPa) selama 5 (lima) jam setelah temperatur oven  $(95 - 100)^\circ\text{C}$ ;
- d) pindahkan cawan berisi sampel 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  $\leq 2$  mg ( $W_2$ );
- f) lakukan pekerjaan duplo; dan
- g) hitung kadar air dalam contoh.

### A. 3.4 Perhitungan

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

#### 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).

### A. 3.5 Ketelitian

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

## A.4 Kadar lemak

### A.4.1 Prinsip

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

### A.4.2 Peralatan

- a) Alat *Soxhlet* lengkap;
- b) oven;
- c) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) penangas air;
- e) *thimble* ekstraksi atau selongsong kertas saring ukuran 33 mm x 80 mm;
- f) desikator;
- g) labu lemak 250 mL;
- h) gelas piala 500 mL atau 300 mL;
- i) gelas arloji; dan
- j) kertas saring bebas lemak.

### A.4.3 Pereaksi

- Larutan asam klorida (HCl) 8 M;
- petroleum eter atau heksan;
- larutan perak nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) 0,1 M;  
larutkan ( $17,0 \pm 0,1$ ) g ( $\text{AgNO}_3$ ) p.a. di dalam 1 000 mL air suling.
- air suling; dan
- batu didih.

### A.4.4 Cara kerja

#### A.4.4.1 Hidrolisis

- Timbang 4 g sampai dengan 5 g contoh (W) yang telah dipersiapkan 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 (30 mL HCl ditambah 20 mL air) dan beberapa butir batu didih;
- tutup gelas piala tersebut dengan gelas arloji lalu didihkan perlahan-lahan selama 15 menit;
- bilas gelas arloji dengan air suling dan masukkan air pembilas tersebut ke dalam gelas piala;
- saring endapan menggunakan kertas saring bebas lemak;
- bilas gelas piala 3 kali dengan air suling, lakukan pencucian hingga bebas klor yang dapat ditentukan dengan penambahan 1 tetes sampai dengan 3 tetes  $\text{AgNO}_3$  0,1 M pada filtrat, jika tidak terdapat endapan putih ( $\text{AgCl}$ ) maka telah bebas klor; dan
- pindahkan kertas saring serta isinya ke dalam *thimble* ekstraksi atau selongsong kertas saring bebas lemak dan keringkan 6 jam pada temperatur 100 °C sampai dengan 101 °C.

#### A.4.4.2 Ekstraksi

- Keringkan selama 1 jam labu didih yang berisi beberapa butir batu didih;
- dinginkan dalam desikator dan timbang ( $W_0$ ), sambungkan dengan alat ekstraksi soxhlet;
- 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;
- ekstrak selama 4 jam dengan kecepatan ekstraksi lebih dari 30 kali;
- keringkan labu didih beserta lemak di dalam oven pada temperatur 100 °C sampai dengan 101°C selama 1,5 jam sampai dengan 2 jam;
- dinginkan dalam desikator dan timbang ( $W_1$ ); dan
- ulangi pengeringan sampai perbedaan penimbangan bobot lemak yang dilakukan berturut-turut kurang dari 0,05 %.

### A.4.5 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/cawan alumunium kosong, dinyatakan dalam gram (g);

$W_1$  adalah bobot labu lemak/cawan alumunium kosong dan lemak, dinyatakan dalam gram (g).

#### A.4.6 Ketelitian

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

### A.5 Kadar protein (N x 5,71)

#### A.5.1 Prinsip

Contoh uji didestruksi dengan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  menggunakan  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  sebagai katalis dan  $\text{K}_2\text{SO}_4$  untuk meningkatkan titik didihnya bertujuan melepaskan nitrogen dari protein sebagai garam amonium. Garam amonium tersebut diuraikan menjadi  $\text{NH}_3$  pada saat destilasi menggunakan  $\text{NaOH}$ .  $\text{NH}_3$  yang dibebaskan dan diikat dengan asam borat menghasilkan ammonium borat yang secara kuantitatif dititrasi dengan larutan baku asam sehingga diperoleh total nitrogen.

#### A.5.2 Peralatan

- Alat destilasi *Kjeldahl* konvensional atau semi otomatis;
- alat destruksi;
- neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg; dan
- buret 10 mL.

#### A.5.3 Pereaksi

- Asam sulfat,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat bebas nitrogen;
- larutan katalis tembaga,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  bebas nitrogen 0,05 g/mL  $\text{H}_2\text{O}$ ;  
larutkan 5 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dengan air suling menjadi 100 mL, lalu pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- katalis selen;  
campurkan 4 g serbuk  $\text{SeO}_2$ , 150 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$  atau  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  dan 30 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .
- kalium sulfat,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  bebas nitrogen;
- batu didih;
- 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.
- larutan asam borat,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  4 %;  
larutkan 40 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$  dengan air suling menjadi 1 000 mL dan tambahkan 3 mL larutan indikator MR/BCG, aduk, (larutan akan berwarna kuning terang) dan pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- larutan natrium hidroksida,  $\text{NaOH}$  30 %;  
larutkan 600 g hablur  $\text{NaOH}$  dengan air suling menjadi 2 000 mL, simpan ke dalam botol bertutup karet.
- larutan indikator fenolftalein (PP) 1 %;  
larutkan 1 g serbuk indikator PP dengan alkohol 95 % dan encerkan menjadi 100 mL.
- larutan asam klorida,  $\text{HCl}$  0,1 N; dan  
pipet dengan hati-hati 8,60 ml  $\text{HCl}$  pekat (36,5 % sampai dengan 38 %) kedalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan ditetapkan normalitasnya.
- batu didih.

#### A.5.4 Cara kerja

- Timbang 1 g contoh (W) ke dalam labu *Kjeldahl*, tambahkan 15,00 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mL larutan katalis CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O atau 1 g campuran katalis selen, 8 butir sampai dengan 10 butir batu didih dan 25 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat;
- 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;
- biarkan dingin, kemudian encerkan dengan air suling secukupnya;
- tambahkan 75 mL larutan NaOH 30 % (periksa dengan indikator PP sehingga campuran menjadi basa);
- 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<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 4 %;
- bilas ujung pendingin dengan air suling;
- titar larutan campuran destilat dengan larutan HCl 0,1 N; dan
- kerjakan penetapan blanko.

#### A.5.5 Perhitungan

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 14,007 \times 5,71 \times 100\%}{W}$$

##### Keterangan:

- V<sub>1</sub> adalah volume HCl 0,1 N untuk titrasi contoh, dinyatakan dalam mililiter (mL);  
 V<sub>2</sub> adalah volume HCl 0,1 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;  
 5,71 adalah faktor protein untuk kedelai.

#### A.5.6 Ketelitian

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

### A.6 Kadar serat kasar

#### A.6.1 Prinsip

Serat kasar adalah bagian yang tidak dapat dihidrolisis oleh asam sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) dan natrium hidroksida (NaOH). Bahan tersebut dihitung secara gravimetri.

#### A.6.2 Peralatan

- Oven ;
- neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- pompa vakum;
- rotary evaporator*;
- sentrifus;
- tanur dengan ketelitian 1 °C;
- desikator;
- penangas listrik;
- alat penggiling;
- alat pengayak dengan ukuran saringan 1 mm ;
- kertas saring tak berabu;
- pendingin;



- m) labu ekstraksi;
- n) corong *Buchner*;
- o) sudip atau sendok; dan
- p) cawan platina, kuarsa atau porselein.

### A.6.3 Perekasi

- a) Petroleum eter;
- b) larutan asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ );  
 $c(1/2 \text{H}_2\text{SO}_4) = 0,255 \pm 0,005 \text{ mol/L}$  (sesuai dengan 12,5 g asam sulfat per liter larutan).
- c) larutan natrium hidroksida ( $\text{NaOH}$ );  
 $c(\text{NaOH}) = 0,313 \pm 0,005 \text{ mol/L}$  (sesuai dengan 12,5 g natrium hidroksida per liter larutan)  
larutan ini harus bebas dari karbonat .
- d) etanol 95 %;
- e) anti buih; dan
- f) batu didih.

### A.6.4 Cara Kerja

#### A.6.4.1 Menghilangkan lemak

- a) Timbang 8 g sampai dengan 10 g contoh tempe kedelai, kemudian keringkan dalam oven selama kurang lebih 3 jam pada temperatur 100 °C dan timbang sampai bobot tetap. Tetapkan kadar berat kering ( $M_s$ ). Kemudian haluskan sampel dengan alat penggiling dan ayak. Tentukan kadar berat kering sampel setelah di ayak ( $M'_s$ );
- b) tambahkan 100 mL petroleum eter kemudian tabung ditutup dan dikocok sehingga lemak larut dalam eter kemudian disaring;
- c) cuci saringan dengan petroleum eter;
- d) larutan kemudian di sentrifugasi selama 10 menit pada 2 000 rpm dan supernatan dibuang;
- e) tambahkan 100 mL eter untuk ekstraksi kembali dan lakukan pasal d;
- f) tambahkan 100 mL eter, tabung ditutup, dan kocok;
- g) segera tuangkan ke dalam labu rotary evaporator dan lakukan evaporasi eter selama  $\pm$  20 menit hingga kering, sehingga diperoleh sampel bebas lemak.

#### A.6.4.2 Ekstraksi serat kasar

- a) Timbang sampel bebas lemak, sekitar 3 g ( $W_0$ ) dan masukkan ke dalam labu tegak, tambahkan anti buih dan batu didih;
- b) tambahkan 200 mL larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  yang telah dipanaskan (95 – 100 °C);
- c) pasang kondensor dan didihkan dengan cepat (2 menit) hingga mendidih kemudian lanjutkan pendidihan secara perlahan selama 30 menit. Goyang secara labu secara berkala hingga partikel yang menempel di dinding labu masuk kembali ke dalam larutan;
- d) setelah waktu pendidihan tercapai, lepaskan kondensor dan tambahkan 50 mL air dingin dan pisahkan secara cepat residu tidak larut dengan corong *Buchner* yang dilapisi kertas saring;
- e) cuci labu dengan 50 mL air panas (temperatur 95 – 100 °C) dan tuang di atas residu tidak larut pada corong *Buchner*. Ulangi pencucian pada residu tidak larut hingga filtrat menjadi netral untuk kertas lakmus. Pemisahan dan pencucian residu yang tidak larut harus selesai dalam waktu kurang dari 30 menit;
- f) kembalikan residu tidak larut ke dalam labu, dan tambahkan larutan sodium hidroksida yang telah dipanaskan (temperatur 95 °C – 100 °C);
- g) pasang kondenser, dan panaskan dengan cepat hingga mendidih (selama 2 menit) menggunakan pemanas dan dilanjutkan hingga  $30 \pm 1$  menit pendidihan secara perlahan.

- h) setelah waktu pendidihan tercapai, lepaskan kondensor dan tambahkan 50 mL air dingin dan pisahkan secara cepat residu tidak larut dengan corong *Buchner* yang dilapisi kertas saring;
- i) cuci residu dengan 25 mL larutan asam sulfat yang telah dipanaskan (temperatur 95 °C – 100 °C). Cuci labu dengan 50 mL air panas (temperatur 95 – 100 °C) dan tuang di atas residu tidak larut pada corong *Buchner*. Ulangi pencucian pada residu tidak larut hingga filtrat menjadi netral untuk kertas lakmus. Pemisahan dan pencucian residu yang tidak larut harus selesai dalam waktu kurang dari 30 menit;
- j) keringkan residu dengan etanol 95 %, dan cuci dengan petroleum eter untuk menghilangkan lemak tidak tersabunkan;
- k) angkat kertas saring beserta isinya ke dalam cawan, masukkan ke oven dan keringkan pada temperatur 130 °C ± 2 °C, dinginkan dalam desikator dan timbang sampel (tanpa kertas saring) sampai bobot tetap ( $W_1$ );
- l) abukan residu kering dalam tanur temperatur 550 °C ± 25 °C, dinginkan dalam desikator dan timbang sampel sampai bobot tetap ( $W_2$ );
- m) lakukan pekerjaan duplo.

#### A.6.5 Perhitungan

$$\text{Kadar serat kasar (\%)} = (W_1 - W_2) \times \frac{100}{W_0} \times \frac{100}{M'_S} \times \frac{M_S}{100}$$

Keterangan :

$W_0$  adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);

$W_1$  adalah bobot contoh setelah pengeringan, dinyatakan dalam gram (g);

$W_2$  adalah bobot contoh setelah pengabuan, dinyatakan dalam gram (g);

$M_S$  adalah kadar berat kering, dinyatakan dalam persentase bobot produk (%);

$M'_S$  adalah kadar berat kering setelah diayak, dinyatakan dalam persentase bobot contoh yang diuji (%).

#### A.6.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimum 5% dari nilai rata-rata hasil serat kasar. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka analisa harus diulang kembali.

### A.7 Cemaran logam

#### A.7.1 Kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

##### A.7.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada temperatur 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimum 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

##### A.7.1.2 Peralatan

- a) SSA beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb, sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- b) tanur;
- c) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) pemanas listrik;



- e) penangas air;
- f) pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret ;
- g) labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL;
- h) gelas ukur kapasitas 10 mL;
- i) gelas piala 250 mL;
- j) botol polipropilen;
- k) cawan porselen/platina/kuarsa 50 mL sampai dengan 100 mL; dan
- l) kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi *particle retention liquid* 20  $\mu\text{m}$  sampai dengan 25  $\mu\text{m}$ .

### A.7.1.3 Perekasi

- a) Asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  pekat;
- b) asam klorida,  $\text{HCl}$  pekat;
- c) larutan asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  0,1 N;  
encerkan 7 mL  $\text{HNO}_3$  pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
- d) larutan asam klorida,  $\text{HCl}$  6 N;  
encerkan 500 mL  $\text{HCl}$  pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
- e) larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Cd;  
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL  $\text{HNO}_3$  pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis atau bisa digunakan larutan baku Cd 1 000  $\mu\text{g/mL}$  siap pakai.
- f) larutan baku 200  $\mu\text{g/mL}$  Cd;  
pipet 10 mL larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Cd ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200  $\mu\text{g/mL}$  Cd.
- g) larutan baku 20  $\mu\text{g/mL}$  Cd;  
pipet 10 mL larutan baku 200  $\mu\text{g/mL}$  Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20  $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{g/mL}$  kemudian tambahkan 5 mL larutan  $\text{HNO}_3$  1 N atau  $\text{HCl}$  6 N, dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,1  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,2  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,4  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,8  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,4  $\mu\text{g/mL}$  dan 1,8  $\mu\text{g/mL}$  Cd.
- i) larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Pb;  
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL  $\text{HNO}_3$  pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis atau bisa digunakan larutan baku Pb 1 000  $\mu\text{g/mL}$  siap pakai.
- j) larutan baku 50  $\mu\text{g/mL}$  Pb; dan  
pipet 5,0 mL larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50  $\mu\text{g/mL}$ .
- 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  $\mu\text{g/mL}$  kemudian tambahkan 5 mL larutan  $\text{HNO}_3$  1 N atau  $\text{HCl}$  6 N, dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,1  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,25  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,0  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,5  $\mu\text{g/mL}$  dan 2,0  $\mu\text{g/mL}$  Pb.

#### A.7.1.4 Cara kerja

- Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh (W) dengan teliti dalam cawan porselen/platina/ kuarsa;
- tempatkan cawan berisi contoh uji di atas pemanas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi;
- lanjutkan pengabuan dalam tanur pada temperatur  $(450 \pm 5) ^\circ\text{C}$  sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes  $\text{HNO}_3$  pekat kira-kira 0,5 mL sampai dengan 3 mL;
- keringkan cawan di atas pemanas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada temperatur  $(450 \pm 5) ^\circ\text{C}$  kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan  $\text{HNO}_3$  pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas pemanas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan  $\text{HNO}_3$  0,1 N dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan aquabides (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring ke dalam botol polipropilen;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- hitung kandungan logam dalam contoh.

#### A.7.1.5 Perhitungan

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

##### Keterangan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ );  
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL); dan  
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

#### A.7.1.6 Ketelitian

Kisaran *Relative Standard Deviation* (RSD) dari dua kali ulangan maksimum 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

### A.7.2 Timah (Sn)

#### A.7.2.1 Prinsip

Contoh didekstruksi dengan  $\text{HNO}_3$  dan HCl kemudian tambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi  $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$ .

**A.7.2.2 Peralatan**

- a) SSA beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) ;
- b) tanur;
- c) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) pemanas listrik;
- e) penangas air;
- f) labu ukur 1 000 mL, 100 mL dan 50 mL;
- g) pipet ukur berskala 0,1 mL;
- h) labu *Erlenmeyer* 250 mL;
- i) gelas ukur 50 mL; dan
- j) gelas piala 250 mL.

**A.7.2.3 Pereaksi**

- a) Larutan kalium klorida, 10 mg/mL K;  
larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 mL.
- b) Asam nitrat, HNO<sub>3</sub> pekat;
- c) Asam klorida, HCl pekat;
- d) Larutan baku 1 000 mg/mL Sn; dan  
larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL HCl pekat dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan 200 mL aquabides, dinginkan pada temperatur ruang dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis.
- e) 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 1 000 mg/mL Sn dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL; 15 µg/mL; 20 µg/mL dan 25 µg/mL Sn.

**A.7.2.4 Cara kerja**

- a) Timbang contoh 10 g sampai dengan 20 g (W) dengan teliti ke dalam labu *Erlenmeyer* 250 mL, tambahkan 30 mL HNO<sub>3</sub> 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 labu *Erlenmeyer* dari pemanas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan sampai selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl<sub>2</sub> 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 labu *Erlenmeyer* tersebut dengan 10 mL air suling (V);
- g) tambahkan 1,0 mL KCl, dinginkan pada temperatur ruang, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis 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 N<sub>2</sub>O-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>;
- 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.

### A.7.2.5 Perhitungan

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

#### Keterangan:

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

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

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

### A.7.2.6 Ketelitian

Kisaran RSD dari dua kali ulangan maksimum 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

## A.7.3 Merkuri (Hg)

### A.7.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan  $\text{NaBH}_4$  atau  $\text{SnCl}_2$  dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm.

### A.7.3.2 Peralatan

- a) SSA yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida (HVG);
- b) *microwave digester*;
- c) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) pemanas listrik;
- e) 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;
- f) tabung destruksi;
- g) labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- h) labu ukur 1 000 mL, 500 mL, dan 100 mL;
- i) gelas ukur 25 mL;
- j) pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret; dan
- k) gelas piala 500 mL.

### A.7.3.3 Pereaksi

- a) Larutan asam sulfat,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  9 M;
- b) larutan asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  7 M;
- c) campuran  $\text{HNO}_3$  :  $\text{HClO}_4$  (1:1);
- d) hidrogen peroksida,  $\text{H}_2\text{O}_2$  pekat;
- e) larutan natrium molibdat,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 %;
- f) larutan pereduksi;  
campurkan 50 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dengan 300 mL aquabides dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai temperatur ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g  $\text{SnCl}_2$ . Pindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.

- g) larutan natrium borohidrida,  $\text{NaBH}_4$ ;  
larutkan 3 g serbuk  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g  $\text{NaOH}$  dengan air suling dalam labu ukur 500 mL.
- h) larutan pengencer;  
masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL air suling kedalam labu ukur 1 000 mL dan tambahkan 58 mL  $\text{HNO}_3$  kemudian 67 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- i) larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Hg;  
larutkan 0,1354 g  $\text{HgCl}_2$  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.
- j) larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  Hg;  
pipet 1 mL larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Hg ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1  $\mu\text{g/mL}$ .
- k) larutan baku kerja Hg; dan  
pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; dan 2 mL larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,0025  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,005  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,02  $\mu\text{g/mL}$  Hg; dan
- l) Batu didih.

#### A.7.3.4 Cara kerja

##### A.7.3.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g contoh (W) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  9 M, 20 mL  $\text{HNO}_3$  7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2 %, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- b) hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas pemanas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- c) tambahkan 20 mL campuran  $\text{HNO}_3$  :  $\text{HClO}_4$  (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 listrik dan cuci pendingin dengan 15 mL air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai temperatur 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.

**A.7.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup**

- a) Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO<sub>3</sub>, 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* 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 (µg/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.

**A.7.3.5 Perhitungan**

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

**Keterangan:**

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL);  
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);  
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);  
 fp adalah faktor pengenceran.

**A.7.3.6 Ketelitian**

Kisaran RSD dari dua kali ulangan maksimum 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

**A.8 Cemar arsen (As)****A.8.1 Prinsip**

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As<sup>5+</sup> direduksi dengan KI menjadi As<sup>3+</sup> dan direaksikan dengan NaBH<sub>4</sub> atau SnCl<sub>2</sub> sehingga terbentuk AsH<sub>3</sub> yang kemudian dibaca dengan SSA pada panjang gelombang maksimum 193,7 nm.

**A.8.2 Peralatan**

- a) SSA yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida (HVG);
- b) tanur;
- c) *microwave digester*;
- d) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- e) pemanas listrik;
- f) *Bunsen burner*;
- g) labu *Kjeldahl* 250 mL;
- h) labu terbuat dari borosilikat berdasar bulat 50 mL.
- i) labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL;
- j) gelas ukur 25 mL;
- k) pipet volumetrik 25 mL;



- l) pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret;
- m) cawan porselen kapasitas 50 mL; dan
- n) gelas piala 200 mL.

### A.8.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  pekat;
- b) asam sulfat,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat;
- c) asam perklorat,  $\text{HClO}_4$  pekat;
- d) ammonium oksalat,  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$  jenuh;
- e) hidrogen peroksida,  $\text{H}_2\text{O}_2$  pekat;
- f) larutan natrium borohidrida,  $\text{NaBH}_4$ ;  
larutkan 3 g  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g  $\text{NaOH}$  dengan air suling sampai tanda garis ke dalam labu ukur 500 mL.
- g) larutan asam klorida,  $\text{HCl}$  8 M;  
larutkan 66 mL  $\text{HCl}$  pekat kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- h) larutan 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 gelas piala 200 mL dan tambahkan 100 mL  $\text{HCl}$  pekat. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) larutan kalium iodida,  $\text{KI}$  20 %;  
timbang 20 g  $\text{KI}$  ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- j) larutan  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  75 mg/mL;  
larutkan 3,75 g  $\text{MgO}$  dengan 30 mL  $\text{H}_2\text{O}$  secara hati-hati, tambahkan 10 mL  $\text{HNO}_3$ , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan air suling;
- k) larutan baku 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  As;  
larutkan 1,320 3 g  $\text{As}_2\text{O}_3$  kering dengan sedikit  $\text{NaOH}$  20% dan netralkan dengan  $\text{HCl}$  atau  $\text{HNO}_3$  1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- l) larutan baku 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  As;  
pipet 10 mL larutan baku As 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  As.
- m) larutan baku 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  As.
- n) 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 0,02  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 0,03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 0,04  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dan 0,05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  As.

### A.8.4 Cara kerja

#### A.8.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (W) ke dalam labu *Kjeldahl* 250 mL, tambahkan 5 mL sampai dengan 10 mL  $\text{HNO}_3$  pekat dan 4 mL sampai dengan 8 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan  $\text{HNO}_3$  pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;

- c) tambahkan 2 mL HClO<sub>4</sub> 70 % sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangkan setelah penambahan HClO<sub>4</sub>, tambahkan lagi sedikit HNO<sub>3</sub> pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 mL H<sub>2</sub>O dan 5 mL (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> jenuh;
- e) panaskan sehingga timbul uap SO<sub>3</sub> 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 minimum 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi (NaBH<sub>4</sub>) 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 (µg/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.

#### A.8.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO<sub>3</sub>, 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* 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 ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, uapkan di atas pemanas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan temperatur 450 °C (± 1 jam);
- e) dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20% dan biarkan minimum 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan NaBH<sub>4</sub> 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* atau *bunsen* 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.

#### A.8.5 Perhitungan

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

##### Keterangan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL);  
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);  
 w adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);  
 fp adalah faktor pengenceran.



### A.8.6 Ketelitian

Kisaran RSD dari dua kali ulangan maksimum 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

## A.9 Cemar mikroba

### A.9.1 *Salmonella* sp.

#### A.9.1.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pra pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media pengkayaan, dan kemudian dilanjutkan 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 ditegaskan melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella* sp.

#### A.9.1.2 Peralatan

- a) Inkubator ( $37 \pm 1$ ) °C;
- b) Autoklaf;
- c) Oven;
- d) Neraca, kapasitas 2 000 g, dengan ketelitian 0,1 g;
- e) Neraca, kapasitas 120 g, dengan ketelitian 5 mg;
- f) Penangas air, (44 sampai dengan 47) °C;
- g) Penangas air, bersirkulasi, *thermostatically-controlled*, ( $41,5 \pm 1$ ) °C;
- h) Penangas air bertemperatur ( $37 \pm 1$ ) °C;
- i) pH meter;
- j) Blender dan blender jar (botol) steril;
- k) Botol bertutup ulir bermulut lebar (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 plastik;
- o) Pipet steril, 1 mL dengan ketelitian 0,01 mL; dan pipet steril 5 mL dan 10 mL dengan skala 0,1 mL;
- p) Jarum Ose (diameter  $\pm 3$  mm), terbuat dari *nichrome*, *platinum-iridium chromel wire* atau plastik steril;
- q) Jarum Ose yang berujung runcing;
- r) Tabung reaksi atau tabung biakan steril, 16 mm x 150 mm dan 20 mm x 150 mm; tabung serologikal, 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm;
- s) Botol pengencer 500 mL;
- t) Rak tabung reaksi atau rak tabung biakan;
- u) *Vortex mixer*;
- v) Lampu (untuk mengamati reaksi serologi);
- w) *Fisher* atau *Bunsen burner*;
- x) Kertas pH (kisaran pH 6 sampai dengan 8) dengan ketelitian maksimum 0,4 unit pH per perubahan warna; dan
- y) Gunting, gunting besar, pisau bedah, dan *forceps* steril.

#### A.9.1.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) *Buffered peptone water* (BPW);
- b) Media *Rappaport-Vassiliadis* dengan soya (RVS broth);

- c) *Muller – Kauffmann Tetrathionate / novobiocin* (MKTTn) broth;
- d) *Xylose lysine desoxycholate* (XLD) agar;
- e) *Hektoen enteric* (HE) agar;
- f) *Bismuth sulfite* (BS) agar;
- g) *Triple sugar iron* (TSI) agar;
- h) Urea agar;
- i) *Lysine decarboxylase broth* (LDB);
- j) Larutan *physiological saline*, 0,85 % (steril);
- k) Toluene;
- l) Pereaksi uji  $\beta$ - galaktosidase;
- m) Media *Voges-Proskauer* (VP);
- n) Pereaksi uji *Voges-Proskauer* (VP);
- o) Larutan *creatine*;
- p) 1-*naphthol* yang dilarutkan dengan etanol;
- q) Larutan potasium hidroksida (KOH), 40 %;
- r) *Tryptone* (atau *tryptophane*) broth (TB);
- s) Pereaksi Kovacs;
- t) *Semi-solid Nutrient Agar* (NA);
- u) *Salmonella monovalent* dan *polyvalent somatic* (O) antiserum;
- v) *Salmonella monovalent* dan *polyvalent flagellar* (H) antiserum; dan
- w) *Salmonella anti-Vi* sera.

#### A.9.1.4 Cara Kerja

##### A.9.1.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) Timbang 25 g contoh ke dalam blender yang steril dan tambahkan 225 mL BPW steril. Kocok selama 2 menit;
- b) inkubasikan pada temperatur  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(18 \pm 2)$  jam.

##### A.9.1.4.2 Pengkayaan

- a) Pipet 0,1 mL biakan pra-pengkayaan ke dalam 10 mL media RVS dan 1 mL biakan pra-pengkayaan lainnya ke dalam 10 mL MKTTn broth dan vorteks masing-masing campuran tersebut; dan
- b) inkubasikan media RVS pada temperatur  $(41,5 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 3)$  jam dalam penangas air bersirkulasi dan MKTTn broth pada  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 3)$  jam.

##### A.9.1.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif

- a) Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum Ose diameter 3 mm, goreskan biakan pengkayaan MKTTn broth ke dalam cawan petri yang berisi media agar XLD, HE dan BS. Siapkan agar BS sehari sebelum digunakan dan simpan di tempat gelap pada temperatur ruang sampai siap digores.
- b) ulangi cara di atas dari media agar pengkayaan RVS;
- c) inkubasikan cawan-cawan media agar BS, HE dan XLD selama  $(24 \pm 3)$  jam pada temperatur  $37 ^\circ\text{C}$ ;
- d) amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella* sp., setelah inkubasi  $(24 \pm 3)$  jam. Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* sp. dari masing-masing media agar selektif setelah inkubasi  $(24 \pm 3)$  jam. Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri 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;

- HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat 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 diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi (24 ± 3) jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama (24 ± 3) jam. Jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi (48 ± 2) jam, ambil 2 atau lebih koloni tersebut.

#### A.9.1.4.4 Uji penegasan

##### A.9.1.4.4.1 Seleksi koloni untuk uji penegasan

- Ambil sedikitnya 1 koloni tipikal pada masing-masing cawan yang berisi media XLD, HE, dan BS, ambil kembali sedikitnya 4 koloni bila koloni pertama tidak tipikal;
- goreskan masing-masing koloni tersebut pada cawan yang berisi NA yang akan ditumbuhi oleh koloni yang terisolasi dengan baik, kemudian inkubasikan pada temperatur (37 ± 1) °C selama (24 ± 3) jam;
- gunakan kultur murni untuk uji penegasan biokimia dan serologi selanjutnya.

##### A.9.1.4.4.2 Uji penegasan biokimia

- Dengan menggunakan jarum Ose berujung runcing steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan ke dalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak;
- inkubasi agar miring TSI pada temperatur (37 ± 1) °C selama (24 ± 3) jam. Pada TSI, perubahan yang terjadi pada medium adalah sebagai berikut:
 

- bagian tegak:	
kuning	glukosa positif
merah atau tak berubah warna	glukosa negatif
hitam	pembentukan H <sub>2</sub> S
gelembung atau retak	pembentukan gas dari glukosa
- permukaan agar miring:	
kuning	laktosa dan/atau sukrosa positif
merah atau tak berubah warna	laktosa dan sukrosa negatif

90% kasus tipikal *Salmonella* positif membentuk gelembung gas dan H<sub>2</sub>S (warna hitam);
- dengan menggunakan jarum Ose berujung runcing steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dari A.9.1.4.4.1 dan inokulasikan ke dalam media Urea agar dengan cara menggores agar miring;
- inkubasikan agar miring urea pada temperatur (37 ± 1) °C selama (24 ± 3) jam, dan amati setiap interval waktu tertentu. Pada Urea agar, reaksi positif *Salmonella* sp. ditunjukkan dengan reaksi pemecahan urea yang menghasilkan ammonia akan menunjukkan perubahan warna *phenol red* menjadi merah mawar hingga merah muda dan kemudian akan semakin pekat. Reaksi akan muncul setelah 2 jam sampai dengan 4 jam;
- dengan menggunakan jarum Ose steril, inokulasikan koloni dari A.9.1.4.4.1 ke dalam media LDB, kemudian inkubasikan pada (37 ± 1) °C selama (24 ± 3) jam, reaksi positif *Salmonella* sp. pada LDB ditandai dengan terbentuknya kekeruhan dan warna ungu setelah inkubasi. Warna kuning menunjukkan reaksi negatif;
- dengan menggunakan jarum Ose steril, inokulasikan koloni dari A.9.1.4.4.1 ke dalam tabung yang berisi 0,25 mL larutan *physiological saline* steril;

- g) tambahkan 1 tetes toluene dan kocok tabung. Tempatkan tabung pada penangas air bertemperatur 37 °C dan diamkan selama 5 menit, kemudian tambahkan sebanyak 0,25 mL pereaksi uji  $\beta$ -galaktosidase dan kocok hingga rata;
- h) inkubasikan tabung pada penangas air 37 °C dan diamkan selama (24 ± 3) jam, amati tabung pada interval waktu tertentu. Reaksi positif *Salmonella* sp. ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning. Reaksi muncul setelah 20 menit;
- i) dengan menggunakan jarum Ose steril, inokulasikan koloni dari A.9.1.4.4.1 ke dalam tabung steril yang berisi 3 mL media VP, kemudian inkubasikan pada temperatur (37 ± 1) °C selama (24 ± 3) jam;
- j) setelah inkubasi tambahkan dua tetes larutan *creatine*, tiga tetes larutan 1-*naphtol* yang dilarutkan dengan etanol, dan dua tetes larutan KOH 40 %, kemudian kocok setelah penambahan tiap pereaksi tersebut. Reaksi *Salmonella* sp. positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah terang setelah 15 menit;
- k) dengan menggunakan jarum Ose steril, inokulasikan koloni dari A.9.1.4.4.1 ke dalam tabung steril yang berisi media TB, kemudian inkubasikan pada temperatur (37 ± 1) °C selama (24 ± 3) jam; dan
- l) setelah inkubasi tambahkan 1 mL pereaksi Kovacs. Reaksi *Salmonella* sp. positif ditunjukkan dengan terbentuknya cincin yang berwarna merah, sedangkan pembentukan cincin berwarna kuning menunjukkan reaksi negatif.

#### A.9.1.4.4.3 Interpretasi hasil uji biokimia

Interpretasi hasil uji biokimia dapat dilihat pada Tabel A.1

Tabel A.1 – Interpretasi hasil uji biokimia

Uji biokimia	Galur <i>Salmonella</i>									
	<i>S. Typhi</i>		<i>S. Paratyphi A</i>		<i>S. Paratyphi B</i>		<i>S. Paratyphi C</i>		Galur lain	
	Reaksi	% <sup>a</sup>	Reaksi	% <sup>a</sup>	Reaksi	% <sup>b</sup>	Reaksi	% <sup>b</sup>	Reaksi	% <sup>a</sup>
TSI asam dari glukosa	+	100	+	100	+		+		+	100
TSI gas dari glukosa	- <sup>c</sup>	0	+	100	+		+		+	92
TSI asam dari laktosa	-	2	-	100	-		-		-	1
TSI asam dari sukrosa	-	0	-	0	-		-		-	1
TSI produksi H <sub>2</sub> S	+	97	-	10	+		+		+	92
Hidrolisis urea	-	0	-	0	-		-		-	1
<i>Lysine decarboxylation</i>	+	98	-	0	+		+		+	95
Reaksi $\beta$ -galaktosidase	-	0	-	0	-		-		-	2 <sup>d</sup>
Reaksi Voges-Proskauer	-	0	-	0	-		-		-	0
Produksi indol	-	0	-	0	-		-		-	1

**CATATAN:**

<sup>a</sup> Persentase mengindikasikan bahwa tidak semua serotipe *Salmonella* menunjukkan reaksi yang ditunjukkan dengan + atau -. Persentase dapat bervariasi antar serotipe dan dalam serotipe dari *food poisoning serotype* dari lokasi yang berbeda

<sup>b</sup> Persentase tidak diketahui dari literatur

<sup>c</sup> *Salmonella Typhi* bersifat anaerogenikan

<sup>d</sup> *Salmonella enterica* spp. *arizonae* memberikan reaksi laktosa positif atau negatif namun selalu menunjukkan reaksi positif pada  $\beta$ -galaktosidase.

#### A.9.1.4.4.4 Uji penegasan serologi dan serotyping

Deteksi keberadaan antigen O-, Vi-, dan H- *Salmonella* diuji dengan aglutinasi (penggumpalan) dengan sera yang sesuai, dari kultur murni yang diperoleh dari A.9.1.4.4.1 dan setelah galur auto-aglutinasi dihilangkan.

##### A.9.1.4.4.4.1 Penghilangan galur auto-aglutinasi

- a) Tempatkan 1 tetes larutan *physiological saline* 0,85 % pada gelas objek yang bersih;
- b) suspensikan sebanyak 1 Ose penuh biakan dari A.9.1.4.4.1 sampai terbentuk suspensi yang homogen dan keruh;
- c) goyangkan gelas objek selama 30 detik sampai dengan 60 detik dan amati gelas objek, bila bakteri mengelompok menjadi unit-unit terpisah maka galur tersebut termasuk auto-aglutinasi, dan tidak dilanjutkan untuk pengujian tahap selanjutnya.

##### A.9.1.4.4.4.2 Uji antigen 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) gunakan koloni yang tidak termasuk galur auto-aglutinasi, tempatkan 1 tetes larutan *physiological saline* 0,85 %;
- c) tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes antiserum O- ke dalam bagian yang lain;
- d) campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- e) klasifikasi uji *antiserum O-* menunjukkan hasil sebagai berikut:

Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;

negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan

non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

##### A.9.1.4.4.4.3 Uji antiserum Vi-

- 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) gunakan koloni yang tidak termasuk galur auto-aglutinasi, tempatkan 1 tetes larutan *physiological saline* 0,85 %;
- 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 antiserum Vi- 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 *antiserum Vi-* menunjukkan hasil sebagai berikut:

Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;

negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan

non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.



**A.9.1.4.4.4 Uji antigen H-**

- a) Inokulasikan media NA semi solid dengan koloni murni yang bukan merupakan galur auto-aglutinasi;
- b) inkubasikan media pada temperatur  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 3)$  jam;
- c) 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;
- d) emulsikan biakan pada NA semi solid setelah inkubasi dengan 2 mL 0,85 % *saline* menggunakan jarum Ose;
- e) tambahkan 1 tetes suspensi biakan tersebut di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;
- f) tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes antiserum H- ke dalam bagian yang lain;
- g) campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- h) klasifikasi uji *antiserum* H- menunjukkan hasil sebagai berikut:  
 Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;  
 negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan  
 non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

**A.9.1.4.4.5 Interpretasi hasil uji penegasan**

Interpretasi hasil uji serologi yang merupakan uji penegasan dapat dilihat pada Tabel A.2.

**Tabel A.2 – Interpretasi hasil uji penegasan**

Reaksi biokimia	Auto-aglutinasi	Reaksi serologi	Interpretasi
Tipikal	Tidak	Antigen O-, Vi-, atau H-positif	Galur dipertimbangkan sebagai <i>Salmonella</i>
Tipikal	Tidak	Semua reaksi negatif	Kemungkinan adalah <i>Salmonella</i>
Tipikal	Ya	Tidak diuji	
Tidak tipikal	Tidak / Ya	Antigen O-, Vi-, atau H-positif	Bukan <i>Salmonella</i>
Tidak tipikal	Tidak / Ya	Semua reaksi negatif	

**A.9.1.4.5 Pernyataan Hasil**

Berdasarkan hasil interpretasi dapat menunjukkan keberadaan *Salmonella* pada contoh uji per 25 g.

## Bibliografi

*AOAC Official Method 925.40, Moisture in Nuts and Nut Products.*

*AOAC Official Method 963.15, Fat in Cacao Products.*

*AOAC Official Method 971.21, Mercuri in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method.*

*AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method.*

*AOAC Official Method 988.05, Protein (Crude) in Animal feed and Pet Foods.*

*AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc.*

*Codex Stan 313R-2013, Regional Standard for Tempe.*

*ISO 5498-1981, Agricultural Food Products – Determination of Crude fiber Content – General Method*

*ISO 6579:2002, Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection of Salmonella spp.*