

Identifikasi Bakteri pada Ikan Pindang Tongkol (*Euthynnus affinis*) di Pasar Tradisional Semarapura, Klungkung, Bali

(BACTERIAL IDENTIFICATION ON MACKEREL TUNA
(*EUTHYNNUS AFFINIS*) BRINE SALTING TRADED IN TRADISIONAL MARKET
OF SEMARAPURA, KLUNGKUNG, BALI)

Purwaningtyas Kusumaningsih¹, Ni Made Diaris²

¹Program Studi Ilmu Gizi

²Program Studi Perkam dan Informasi Kesehatan
Fakultas Kesehatan, Sains dan Teknologi,
Universitas Dhyana Pura,
Jl. Raya Padang Luwih, Tegaljaya, Dalung,
Kuta Utara, Badung, Bali, Indonesia 80361
Telpon (0361) 426450,
Email: purwak.05@undhirabali.ac.id

ABSTRACT

Mackerel tuna (*Euthynnus affinis*) brine salting is a famous seafood product in Indonesia due to its good nutrition content. Bacterial contamination on this product may increase risk of foodborne diseases to happen, in addition to a decrease in quality and nutritious value of the product. The main objective of this research was to identify bacteria contaminating the brine salting Mackerel tuna (*Euthynnus affinis*) sold in Tradisional Markets in Klungkung, Bali, Indonesia. Polymerase Chain Reaction (PCR) was applied in the process of identification of bacterial contaminants. Samples were collected from 5 fish kiosks at the Tradisional market in Klungkung, Bali Indonesia. Each sample was cultured in Blood Agar or Nutrient Agar. Colonies with different morphology were selected, enriched in Tryptic Soy Broth (TSB), and their DNA was extracted before being amplified with 16S rRNA primers. This PCR products were then sequenced, and the results were compared with those available in the geneBank. Basic Local Alignment Search Tool was conducted with help of MEGA software version 6. Seven bacterial species were identified, and these included *Serratia nematodiphila*, *Bacillus cereus*, *Shewanella seohaensis*, *Vibrio alginolyticus*, *Kurthia gibsonii*, *Enterobacter cloacae*, and *Staphylococcus sciuri*. All but one *Kurthia gibsonii* are potential pathogens in human. *Staphylococcus sciuri* is not commonly found in seafood. The present of such species in the mackerel tuna brine salting product was probably due to poor handling during the process and distribution.

Keywords: pindang, bakteri; Polymerase Chain Reaction (PCR); sequencing

ABSTRAK

Pindang merupakan salah satu produk perikanan yang digemari masyarakat karena mengandung gizi yang baik. Kontaminasi bakteri dapat meningkatkan resiko keamanan pangan dan mengurangi mutu serta nilai gizi pindang. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menemukan identitas bakteri yang mencemari pindang tongkol (*Euthynnus affinis*) yang diperdagangkan di pasar tradisional, kota Semarapura, Klungkung, Bali. Metode yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri dalam penelitian ini adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Sampel diambil dari 5 pedagang pindang di pasar tradisional di Kota Semarapura, Klungkung, kemudian ditumbuhkan pada media *Blood Agar* atau *Nutrient Agar*. Koloni yang berbeda secara morfologi dipilih dan dikultur dalam *Tryptic Soy Broth* (TSB), dilanjutkan ekstraksi DNA dilanjutkan diamplifikasi dengan primer 16S rRNA. Hasil PCR kemudian disequensing dan dibandingkan dengan sekuens DNA bakteri di genBank. Data DNA diolah menggunakan MEGA 6 sebelum dilakukan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Tujuh sampel teridentifikasi sebagai bakteri *Serratia nematodiphila*, *Bacillus cereus*, *Shewanella seohaensis*, *Vibrio alginolyticus*, *Kurthia gibsonii*,

Enterobacter cloacae, dan *Staphylococcus sciuri*. Enam bakteri memiliki potensi patogen pada manusia kecuali *Kurthia gibsonii*. *Staphylococcus sciuri*, tidak umum ditemukan pada ikan, bakteri ini berkaitan dengan tingkat hygiene sanitasi individu selama proses produksi dan distribusi.

Kata-kata kunci: pindang; bakteri; *Polymerase Chain Reaction* (PCR); *sekuensing*

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara maritim dengan luas wilayah perikanan di laut sekitar 5,8 juta km², memiliki sumber daya ikan dengan tingkat keragaman hayati (*bio-diversity*) paling tinggi (Adisanjaya, 2018). Ikan dapat dijadikan sumber protein alternatif karena rendah kolesterol, mengandung omega-3 dan asam amino esensial dibandingkan dengan daging (Pal *et al.*, 2012). Tur *et al.* (2012) dan Diana (2012) menyatakan bahwa ikan sebagai salah satu sumber makanan yang mengandung asam lemak omega-3. Pratama *et al.* (2011), melaporkan kadar lemak ikan tongkol hanya 0,87% dan total asam lemak tak jenuh sebesar 38,21%. Tongkol merupakan jenis ikan yang mudah ditemukan di perairan Indonesia, dan dijadikan bahan baku pindang (Hardiprasetya, 2015). Hal tersebut menunjukkan prospek yang baik sebagai salah satu kegiatan ekonomi yang strategis untuk pemenuhan sumber protein bagi masyarakat Indonesia selain daging (Adisanjaya, 2018).

Pindang sangat digemari oleh masyarakat Indonesia, khususnya di Kabupaten Klungkung, Bali. Hal ini disebabkan oleh harga pindang yang terjangkau dan memiliki citarasa yang enak (Hardiprasetya, 2015). Pindang banyak diperdagangkan di pasar tradisional di kota Semarang, Kabupaten Klungkung. Usaha pengolahan ikan pindang di Kabupaten Klungkung terletak di Desa Kusamba, Kecamatan Dawan (Muriati dan Hadiwijaya, 2011).

Pada tahun 2007, Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Nomor: KEP.01/MEN/2007, menetapkan Sentra Pengolahan Pindang di Desa Kusamba, Kecamatan Dawan, Kabupaten Klungkung sebagai lokasi Pengembangan Sentra Pengolahan Hasil Perikanan. Namun, dalam perkembangannya, fasilitas yang disediakan tidak difungsikan secara optimal. Proses pengolahan ikan belum dilakukan dengan baik, drainase tidak diperhatikan kebersihannya dan berbau. Konstruksi bangunan belum memenuhi standar, secara

sanitasi dan higienitas, sehingga memengaruhi mutu dan kualitas produk pindang Dawan (Muriati dan Hadiwijaya, 2011).

Pemasaran pindang yang ditemukan di pasar tradisional Kabupaten Klungkung hanya ditaruh dalam baskom, tidak dikemas dan dijual di tempat terbuka, meningkatkan potensi tercemar mikroorganisme yang menurunkan nilai gizi dan mutu pindang (Pandit, 2017). Mikroorganisme pada pindang dapat saja bersifat patogen serta berpotensi menimbulkan penyakit (*Seafood borne illnesses*) (Pal *et al.*, 2016).

Meningkatnya kasus seafood borne illnesses di Amerika menghantarkan pada permasalahan resistensi antibiotik dan urgensi terhadap kajian mutu makanan asal laut (Pal *et al.*, 2012). *Staphylococcal foodborne diseases (SFD) yang bersumber dari hidangan laut diketahui sebagai penyebab foodborne disease di seluruh dunia* (Iwamoto *et al.*, 2010; Kadariya *et al.*, 2014).

Penelitian tentang identifikasi bakteri pada daging ayam, daging sapi, kerang laut, dan ikan yang diperjualbelikan di masyarakat sudah dilaporkan. Begitu pula identifikasi bakteri pada ikan pindang di Weleri, Jawa Tengah (Hardiprasetya, 2015) dan identifikasi jamur pada ikan pindang di Jakarta, Pelabuhan Ratu, Bogor, Bandung, Cirebon dan Semarang yang bersifat toksin (Hermana *et al.*, 2018), telah dilaporkan, tetapi identifikasi bakteri terhadap pindang di kota Semarang, Klungkung Bali, belum ada yang melaporkan. Melalui penelitian ini, diketahui apakah pindang yang diperdagangkan di pasar tradisional di kota Semarang tercemar bakteri patogen yang berpotensi menimbulkan penyakit.

Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri yang mencemari pindang di pasar kota Semarang, Klungkung Bali, sehingga dapat memberikan informasi asal terjadinya kontaminasi sesuai dengan bakteri yang ditemukan. Memberikan masukan kepada produsen dan penjual pindang di Kabupaten Klungkung untuk memperbaiki proses pengolahan dan cara

menjual pindang guna menurunkan pencemaran bakteri yang ditemukan. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan solusi dalam menurunkan dan mengeliminasi bakteri pencemar dengan cara perbaikan proses pengolahan ikan pindang.

Dengan diketahuinya bakteri yang mencemari pindang, maka diharapkan pencegahan munculnya *foodborne diseases* di Kabupaten Klungkung dapat dicegah. Penelitian ini dapat dijadikan dasar epidemiologi penyebaran bakteri patogen yang bersumber dari makanan laut di Indonesia.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan selama empat bulan, sejak bulan Mei sampai bulan Agustus 2019. Pelaksanaan penelitian dilakukan di Laboratorium Fakultas Pertanian, Universitas Warmadewa, Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana, Laboratorium Biomedik dan Biologi Molekuler Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Bali dan sekuensing dilakukan di PT. Genetika Indonesia, Jakarta.

Pengambilan sampel ikan pindang menggunakan metode *purposive random sampling* (Hermana *et al.*, 2018), berdasarkan kriteria yaitu sampel diambil di pagi hari, pindang yang diambil dalam bentuk utuh dan penjual berasal dari Desa Kusamba.

Penentuan Kadar Garam dan Air

Sampel pindang untuk analisis kadar garam dan kadar air dibeli dari lima pedagang di pasar tradisional Kota Semarapura, Klungkung. Masing-masing sebanyak satu ekor pindang, sehingga total lima sampel dan dilakukan analisis di laboratorium Fakultas Pertanian, Universitas Warmadewa.

Isolasi Bakteri Pencemar

Sampel pindang dibeli dari lima pedagang di pasar tradisional kota Semarapura, Klungkung. Setiap pedagang diambil tiga sampel, sehingga total sampel adalah 15 pindang tongkol. Sampel dilakukan analisis terhadap kandungan bakteri di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana.

Sampel pindang dari lima pedagang, diberi label P1-P5. Karena setiap pedagang diambil tiga sampel, maka diberi label menjadi P1 (P1.1;

P1.2; P1.3) dan seterusnya. Dari 15 sampel, masing-masing diambil bagian kulit, daging dan saluran pencernaan, ditimbang sebanyak 10 g. Masing-masing dimasukkan ke dalam tabung berisi 9 mL larutan NaCl dan dihomogenkan. Kemudian sebanyak 1 mL larutan diambil dari tabung pertama, dimasukkan ke dalam 9 mL NaCl pada tabung ke-2. Sebanyak 10 μ L larutan diambil dari masing-masing 15 tabung sampel dan dilakukan penanaman bakteri pada 15 media nutrisi umum (*Blood agar* dan *Nutrient agar*) dengan metode *spread*, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pada media ditemukan 15 koloni yang berbeda dari segi warna, bentuk dan tepian koloninya. Masing-masing koloni diambil, diinokulasi dan diperbanyak pada media *Nutrient agar* dengan metode *streak*. Satu koloni diambil dan diperkaya pada 1 mL media *Tryptic Soy Broth* (TSB), diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Ekstraksi Deoxyribonucleic Acid (DNA)

Ekstraksi DNA koloni yang sudah disubkultur dan diperkaya di media *Tryptic Soy Broth* (TSB) dilakukan di Laboratorium Biomedik dan Biologi Molekuler Hewan, FKH, Universitas Udayana dengan metode Chelex 10%.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Ekstraksi DNA bakteri di amplifikasi menggunakan primer 16S rRNA, primer *forward* 63f 5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3' dan *reverse* 1387r 5'-GGGCGGWTGTA CAAGGC-3'.² *Polymerase Chain Reaction* mixes sebanyak 10 μ L terdiri dari 3 μ L ddH₂O, 5 μ L MM Promega (*master mix*), masing-masing primer (1.5 μ L), dan 1 μ L DNA template. Amplifikasi dilakukan dan menggunakan alat *Thermal Cycler* (Bio-Rad MJ *Mini*). Amplifikasi dilakukan dengan tahapan pre-PCR selama tujuh menit pada suhu 95°C. *Polymerase Chain Reaction* dilakukan sebanyak 35 siklus yaitu *denaturasi* pada suhu 95°C selama 45 detik, *annealing* selama 45 detik pada suhu 50°C, dan *extension* selama 1,5 menit pada suhu 72°C. Setelah 35 siklus terselesaikan, dilanjutkan dengan post-PCR selama lima menit pada suhu 72°C dan satu menit pada suhu 22°C.

Elektroforesis

Koloni positif teramplifikasi di *running* pada gel agarose 1% (50 g agarose ditambah dengan 50 mL Buffer) yang telah diisi etidium bromide

(*EtBr*), sebanyak 2 µL, pita DNA menunjukkan di posisi di ± 1300 bp. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 v, dengan arus 400 mA. Pada proses elektroforesis ini digunakan *low mass marker* DNA Ladder (Bioneer). Elektroforesis dilakukan selama 30 menit, dan hasilnya divisualisasi di bawah sinar ultraviolet dan difoto menggunakan kamera digital.

Sequensing

Hasil positif yang diperoleh dikirim ke PT. Genetika Indonesia di Jakarta untuk dilakukan sekuensing dan dilanjutkan analisis sekuensing DNA di Laboratorium Genetika, Jakarta. Hasil DNA sekuensing dianalisis menggunakan program MEGA 6, dan di BLAST pada situs NCBI untuk membandingkan sekuens bakteri yang diperoleh dengan data pada *GenBank* (Violentina *et al.*, 2015).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengawetan menggunakan garam merupakan salah satu metode pengawetan makanan laut tertua. Garam diketahui mampu membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri. Cara kerja garam dengan menggantikan kandungan air dalam daging ikan, sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan menurunkan aktivitas enzim memproduksi senyawa biogenik dari proses dekarboksilase asam amino bebas seperti histamin (Fatuni *et al.*, 2014). Bicini *et al.* (2018), menambahkan bahwa untuk memperpanjang waktu simpan ikan yang diawetkan dengan teknik *brine salting* adalah dengan meningkatkan konsentrasi garam terlarut, terlebih bagi ikan yang memiliki kandungan lemak tinggi.

Analisis kadar garam dan air dilakukan pada lima sampel dari lima pedagang pindang tongkol di Pasar Klungkung. Hasil kadar garam dan kadar air pindang dari lima pedagang disajikan pada Tabel 1.

Metode penggaraman pindang tongkol yang diproduksi di Desa Kusamba adalah merebus ikan tongkol pada larutan garam atau disebut *brine salting* (Pandit, 2017). Kelima sampel dari masing-masing pedagang, berdasarkan dari hasil analisis, diperoleh kadar garam pindang tongkol yang dijual berkisar 2-3%, sedangkan apabila dilihat pada standar SNI 2717:2017 persyaratan mutu kadar garam yang dianjurkan maksimal 10% pada pengolahan pindang air

garam. Hasil ini menunjukkan bahwa syarat kadar garam pindang tongkol yang diproduksi di Desa Kusamba dan dijual di Klungkung memenuhi standar SNI. Penambahan garam dimaksudkan sebagai pengawet yang mampu menarik kandungan air dalam daging ikan tongkol digantikan dengan larutan garam yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba (Alonzo *et al.*, 2015). Kadar garam yang terlalu tinggi dapat memengaruhi rasa pindang (Hasan dan Fatma, 2015) sendiri dan kandungan natrium yang tinggi pada olahan ikan laut berdampak tidak baik bagi kesehatan konsumen karena dapat menyebabkan penyakit hipertensi apabila dikonsumsi terlalu sering dan tidak dianjurkan bagi penderita hipertensi dan Ibu hamil (Sri *et al.*, 2016).

Kadar air dari kelima sampel menunjukkan masih di atas nilai kadar air yang dianjurkan sesuai SNI 2717:2017 sebesar 60%. Kadar air yang tinggi berbanding lurus dengan nilai aktivitas air (a_w) pada bahan pangan, yang bertanggungjawab terhadap aktivitas pertumbuhan mikroba (Arzu dan Gulderen, 2018). Hal ini dapat menjelaskan bahwa produk pindang yang dijual di pasar Klungkung konsentrasi garam yang dipakai dalam perebusan belum dapat menggantikan air yang terdapat dalam daging ikan tongkol, meskipun kadar garamnya masih dalam standar SNI. Kondisi ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti perebusan yang berulang sehingga mengurangi konsentrasi garam dalam air rebusan (Hermana *et al.*, 2018). Waktu perebusan yang tidak cukup lama dengan konsentrasi garam yang kurang, belum mampu menguapkan air di dalam daging ikan tongkol (Fathin *et al.*, 2016), perebusan pindang di Desa

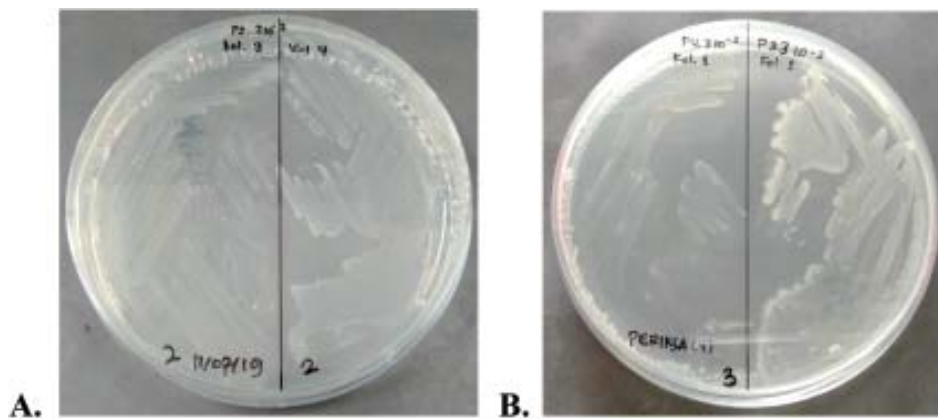
Tabel 1. Kadar garam dan kadar air pindang tongkol yang dipasarkan di Kota Semarapura, Klungkung, Bali

Sampel	Jumlah Sampel	Kadar Garam (%)*	Kadar Air (%)*
P1	1	3,04±0,19	66,27±0,78
P2	1	3,55±0,29	70,69±1,73
P3	1	2,61±0,09	69,39±0,14
P4	1	3,50±0,12	65,34±1,49
P5	1	2,99±0,14	69,75±0,07

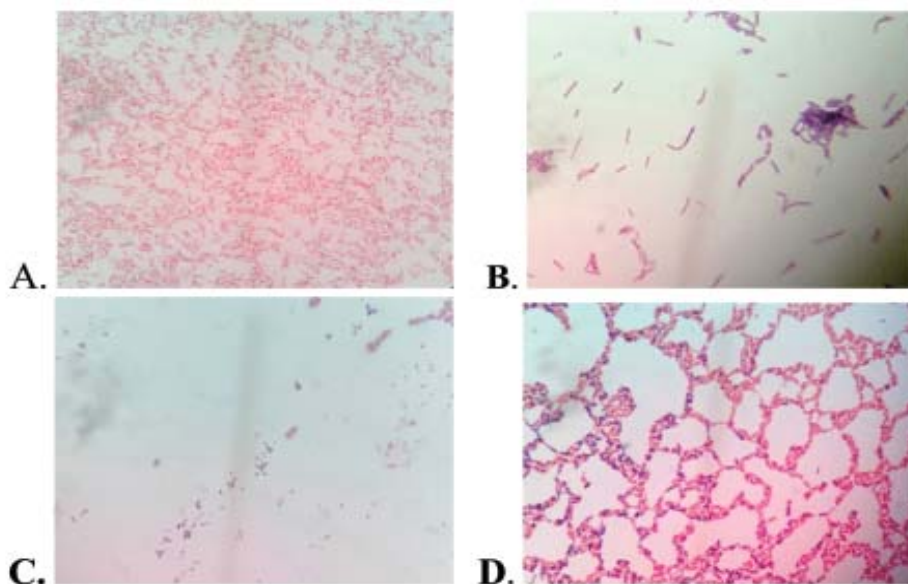
Keterangan: Data merupakan nilai rata-rata dari sampel pindang tongkol (*Euthynnus affinis*) dua kali ulangan



Gambar 1. Koloni bakteri pindang tongkol (*Euthynnus affinis*) P4 sampel ke-3 yang tumbuh pada media *Blood agar* dan *Nutrient agar*



Gambar 2. A: Subkultur koloni 9 (K9) dan 8 (K8) sampel P2; B: koloni 2 (K2) sampel P4 dan koloni 5 (K5) sampel P3 yang berbeda morfologinya pada *Nutrient agar*.



Gambar 3. A: koloni 2 (K2) bacil Gram negatif sampel P4. B: koloni 5 (K5) bacil Gram positif sampel P3. C: koloni 8 (K8) coccus Gram positif sampel P2. D. Koloni 9 (K9) bacil Gram positif

Tabel 2. Jumlah isolat bakteri yang diperoleh pada setiap sampel pindang tongkol yang dipasarkan di Semarang, Klungkung, Bali

Sampel	Jumlah Sampel	Presentase Isolat
P1	3	0
P2	3	60
P3	3	26
P4	3	6,66
P5	3	6,66
Total	15	99,98

Kusamba hanya dilakukan sekitar satu jam. Perebusan yang terlalu lama dapat memengaruhi kualitas nutrisi terutama kandungan protein. Dapat pula membuat tekstur daging lebih liat karena proses denaturasi dan koagulasi protein (Fathin *et al.*, 2016). Cara menjual pindang di Klungkung tetap direndam pada air rebusan pindang, hal ini memungkinkan air kembali masuk ke dalam daging ikan pindang.

Sebanyak 15 sampel pindang tongkol dari lima pedagang telah dibiakkan pada media *blood agar* dan *nutrient agar*. Sebanyak 15 koloni bakteri ditemukan tumbuh yang memiliki perbedaan secara morfologi dari segi warna, bentuk dan tepian koloni. Hasil penanaman bakteri dari pindang tongkol disajikan pada Gambar 1.

Sebanyak 15 sampel dari lima pedagang pindang diperoleh 15 koloni yang menunjukkan morfologi yang berbeda. Pada pedagang pertama (P1) dari ketiga sampel pindang tidak ditemukan koloni bakteri yang berbeda dengan koloni bakteri sampel pindang dari pedagang lain, sedangkan pada pedagang P2, P3, P4 dan P5 paling banyak ditemukan morfologi koloni yang berbeda adalah pada pedagang ke-2 (P2) sebanyak 9 koloni, diikuti P3 sebanyak 4 koloni dan P4 dengan P5, masing-masing satu koloni. Lima belas koloni bakteri yang berbeda morfologinya diinokulasi pada media *Nutrient agar*, sebelum dilanjutkan ekstraksi DNA bakteri untuk mendapatkan koloni tunggal. Hasil inokulasi bakteri disajikan pada Gambar 2.

Untuk mengetahui golongan Gram dari 15 sampel bakteri dilakukan pengecatan Gram. Sebanyak empat koloni yaitu K2, K5, K8 dan K9 hasil pengecatan Gram disajikan pada Gambar 3.

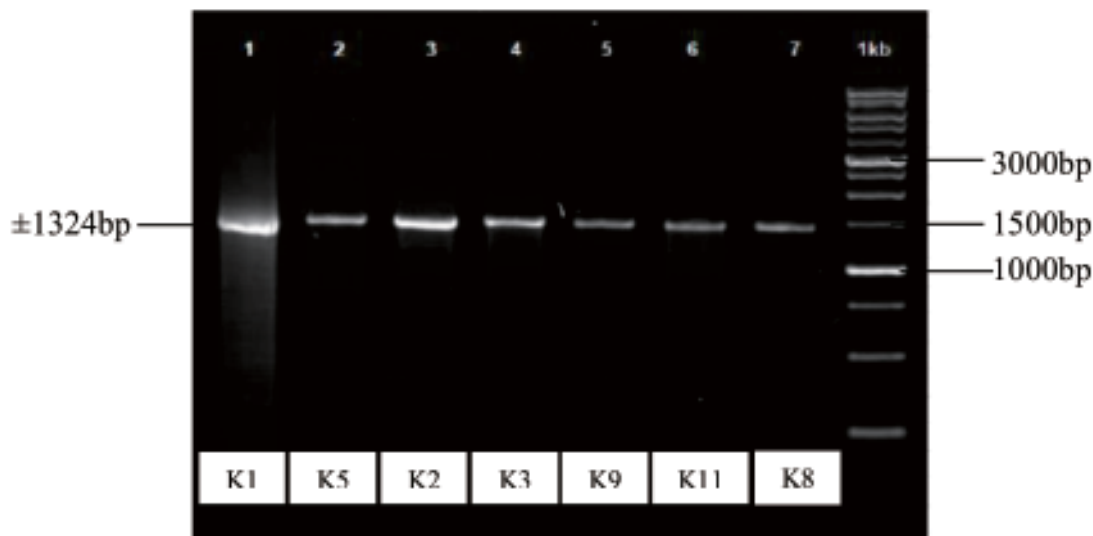
Pengecatan Gram terhadap bakteri dapat

digunakan sebagai diagnostik awal untuk dapat mengidentifikasi spesies bakteri termasuk golongan Gram positif atau negatif. Morfologi bakteri dapat dilihat melalui pewarnaan, dengan pewarnaan dapat diamati apakah bakteri berbentuk coccus, bacil atau kombinasi keduanya. Bahkan ukuran serta bentuk bakteri membentuk rantai atau berkelompok dapat dilihat dengan jelas di bawah mikroskop (Giuliano *et al.*, 2019). Tidak semua hasil pengecatan ditampilkan di sini, hanya diwakilkan empat koloni bakteri dari 15 koloni. Keempat koloni pada gambar tersebut, berdasarkan hasil pengecatan diketahui sampel bakteri yang diambil selain memiliki morfologi yang berbeda dari segi bentuk dan warna, juga berbeda golongan Gramnya. Dari 15 sampel koloni bakteri, empat di antaranya termasuk golongan Gram positif berbentuk bacil dan cocci, yang lainnya adalah Gram negatif berbentuk bacil.

Hasil pengecatan bakteri memiliki kelemahan, seperti warna yang dihasilkan pengecatan Gram positif berwarna ungu atau biru, sedangkan Gram negatif berwarna merah. Namun, keduanya dapat menjadi positif palsu atau negatif palsu, hal ini disebabkan *human error* saat preparasi sampel pada slide, fiksasi dengan methanol dan umur kultur bakteri. Pada gambar pengecatan hasil penelitian ini, warna sampel K5, K8 dan K9 yang tergolong Gram positif, tidak semua terwarnai ungu atau biru, tetapi ada berwarna merah karena kultur koloni yang dicat Gram berumur satu hari, sehingga dinding sel bakteri menjadi tidak stabil karena reaksi dari enzim autolisis (Samuel *et al.*, 2016). Sampel tidak diwarnai langsung setelah ditumbuhkan di dalam inkubator, tetapi disimpan sehari dalam kulkas, keesokan hari baru dilakukan pengecatan Gram.

Sebelum dilakukan ekstraksi DNA bakteri, koloni bakteri diperkaya pada media TSB sebanyak 1 mL dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Sampel DNA bakteri diberi label K1-15. Sebanyak 10 μ L kultur bakteri diekstraksi menggunakan metode Chelax 10%. Hasil ekstraksi diamplifikasi dengan primer *forward* 63f 5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3' dan *reverse* 1387r 5'-GGGCGGWGT GTACA AGGC-3'. Amplifikasi dilakukan dalam siklus 35 kali, hasil PCR dicek pada gel agarose 1%.

Tujuh sampel dari limabelas sampel koloni bakteri teramplifikasi dan menunjukkan posisi pita DNA di kisaran \pm 1300 bp sesuai dengan panjang basa amplifikasi antara 1387 bp ke 63



Gambar 4. Pita DNA PCR tujuh koloni bakteri

bp. Pita DNA bakteri yang teramplifikasi adalah koloni bakteri K1, K2, K3, K5, K8, K9 dan K11 disajikan pada Gambar 4.

Hasil PCR dari tujuh sampel DNA bakteri yang menunjukkan hasil positif teramplifikasi menggunakan primer 16s rRNA dan dilanjutkan dengan sekuensing. Hasil DNA sekuensing dianalisis menggunakan program MEGA 6.0 dan dilakukan BLAST pada *GenBank*. Hasil BLAST DNA sekuens teridentifikasi *Serratia nematodiphila* (K1), *Bacillus cereus* (K5), *Shewanella seohaensis* (K2), *Vibrio alginolyticus* (K3), *Kurthia gibsonii* (K9), *Enterobacter cloacae* (K11), dan *Staphylococcus sciuri* (K8). Hasil identifikasi disajikan pada Tabel 3.

Bakteri *Serratia proteomaculans* dan *S. fanticola* diketahui sebagai bakteri pembusuk pada ikan makarel kuda (*Trachurus trachurus*) di Spanyol (Hernandez, 2017). Bakteri *S. marcescens* diketahui berpotensi patogen pada manusia dan hewan. Bakteri *S. marcescens* dapat menyebabkan meningitis, infeksi saluran kemih dan dermatitis (Mahlen, 2011; Miranda *et al.*, 2018). Jalal *et al.* (2017) menemukan genus *Serratia* penyebab pembusukan pada ikan patin (*Pangasius pangasius*) di Malaysia. Khusus untuk *S. nematodiphila*, hanya diketahui pernah ditemukan hidup bersimbiosis di usus nematoda (*Heterorhabditoides chongmingensis*), tetapi belum ada yang melaporkan tentang patogenitas yang ditimbulkan (Zhang *et al.*, 2009). Beberapa penelitian yang telah dilakukan pada genus *Serratia* golongan Gram negatif, oleh Chun *et*

al. (2016) menemukan bahwa prodigiosin dan serrawettin W2 yang diproduksi oleh *S. surfactantfaciens* dapat dimanfaatkan sebagai bahan farmasi dan antipolusi. Darshan dan Manonmani (2016), menemukan bahwa *S. nematodiphila* ternyata mampu memproduksi suatu senyawa prodigiosin yang memiliki kemampuan sebagai antibakteri, antijamur dan antiprotozoa.

Bakteri *Shewanella seohaensis* dan *Vibrio alginolyticus* keduanya merupakan bakteri halofilik, sehingga mampu hidup di lingkungan dengan kadar garam tinggi seperti di laut. Bakteri tersebut berkaitan dengan penyakit yang menyerang ikan dan sensitif pada suhu 48-50°C. Keberadaan kedua bakteri ini dapat disebabkan mutu bahan baku ikan tongkol yang digunakan tidak baik. Suhu perebusan oleh pembuat ikan pindang tidak diukur disertai waktu perebusannya pun tidak maksimal. Kemungkinan waktu perebusan dihitung sejak pertama kali ikan tongkol direbus dengan air garam, tidak dihitung saat air garam mendidih (Sabir *et al.*, 2013).

Bakteri *Bacillus cereus* pernah ditemukan pada daging ikan salmon, ikan segar di India dan Tunisia. Bakteri ini dapat menimbulkan keracunan dan menyebabkan diare dan muntah pada penderitanya. Oleh karena *B. cereus* memiliki kemampuan untuk membentuk spora dan toksin, bakteri ini sanggup bertahan pada suhu tinggi (Rasool *et al.*, 2017). Bakteri *Kurthia gibsonii*, diketahui sebagai bakteri yang ditemukan pada saluran genitalia dan dapat ditularkan melalui hubungan seksual.

Tabel 3. Hasil BLAST sekuen DNA bakteri pindang tongkol yang dipasarkan di Semarapura, Klungkung, Bali

Kode Isolat	Jenis Bakteri	Kemiripan (%)	Nomor Akses
K1	<i>Serratia nematodiphila</i>	99%	NR_044385.1
K2	<i>Shewanella soehaensis</i>	99%	NR_108852.1
K3	<i>Vibrio alginolyticus</i>	98%	NR_113781.1
K5	<i>Bacillus cereus</i>	98%	NR_074540.1
K8	<i>Staphylococcus sciuri</i>	99%	NR_025520.1
K9	<i>Kurthia gibsonii</i>	99%	NR_118298.1
K11	<i>Enterobacter cloacae</i>	99%	NR_044978.1

Pencemaran bakteri ini dapat berasal dari pencemaran lingkungan terkontaminasi urin manusia atau air yang digunakan untuk perebusan tercemar urin (Ongradi *et al.*, 2014). Bakteri *K. gibsonii* merupakan bakteri golongan *psychotropic* yang mampu beradaptasi pada lingkungan yang ekstrim seperti dasar laut dalam (Rebeiro *et al.*, 2018).

Bakteri *Enterobacter cloacae* sebenarnya adalah bakteri yang umum ada pada ikan, tetapi penggunaan antibiotik pada ikan dengan sembarangan dapat meningkatkan toleransi sehingga bakteri tersebut dapat berkembang dan menginfeksi manusia (Renato *et al.*, 2017). Selain itu *E. cloacae* pernah ditemukan pada makanan laut dan filet daging ikan, bakteri ini dapat menyebabkan penyakit diare dan kasus keracunan makanan (Noha *et al.*, 2014). Bakteri *Staphylococcus sciuri* yang ditemukan pada sampel pindang, merupakan bakteri nonpatogen yang wajar ditemukan dalam olahan makanan fermentasi. Keberadaan mereka dalam makanan fermentasi relatif aman (Marino *et al.*, 2010). Biasanya *staphylococci* ditemukan pada olahan makanan frementasi dengan kadar garam rendah. Pada dasarnya bakteri *staphylococci* bukan merupakan flora normal pada ikan, tetapi dapat ditemukan pada saluran pernafasan dan kulit manusia. Beberapa strain seperti *S. epidermidis*, *S. pasteurii* dan *S. aureus* mampu memproduksi enterotoksin dan resisten terhadap beberapa antibiotik. Cemaran ini dapat berasal dari lingkungan, penjual pindang dan pekerja yang mengolah ikan menjadi pindang atau ikan yang digunakan sebagai bahan pindang dalam kondisi sakit. *Staphylococcus* yang berada di perairan laut dapat menginfeksi ikan dan salah satunya menyebabkan penyakit *rainbow trout* (Oh *et al.*, 2019). Apabila ditemukan *Staphylococcus* strain patogen, hal tersebut lebih berkaitan

dengan tingkat sanitasi proses pengolahan ikan menjadi pindang, karena bakteri tersebut tidak berasal dari ikan sehat tetapi berhubungan dengan ikan yang sakit dan kontaminasi bakteri dari manusia, lingkungan ataupun peralatan yang kontak dengan pindang (Sergelidis *et al.*, 2014).

Keberadaan tujuh bakteri yang ditemukan pada pindang tongkol (*Euthynnus affinis*) yang diperdagangkan di pasar tradisional Kabupaten Klungkung, tidak melulu disebabkan oleh bakteri rasal ikan tongkol yang diolah menjadi pindang. Cemaran dapat saja terjadi setelah ikan tongkol dalam keadaan mati, dan bakteri mulai berkembang. Khususnya bakteri halofilik yang mampu berkembang dan hidup pada lingkungan asin, mengingat pindang tongkol (*E. affinis*) yang diambil sebagai sampel dijual dalam keadaan terendam di air rebusan garam, dan hanya satu pedagang yang tidak menjual pindang dalam keadaan terendam air rebusan. Bakteri halofilik mampu bertahan hidup dalam lingkungan salinitas tinggi karena kandungan ion inorganik (Na⁺, K⁺, Cl⁻) di dalam sitoplasma, sehingga membuat bakteri halofilik mampu menghindari tekanan osmotik di lingkungan berkadar garam tinggi, dan cairan tidak mengalir keluar sel. Protein yang dihasilkan bersifat stabil dan tetap aktif di lingkungan yang memiliki tingkat salinitas tinggi (Aljohny, 2015). Pengolahan pindang lebih lanjut di tangan konsumen perlu dilakukan untuk mematikan bakteri yang ditemukan.

Pada penelitian ini ditemukan bakteri yang diketahui tergolong bakteri halofilik yaitu *S. soehaensis* dan *V. alginolyticus*. Bakteri yang dapat menghasilkan histamin di antaranya *S. nematodiphila* dan *E. cloacae*. Bakteri *B. cereus* yang ditemukan pada penelitian ini bersifat termofilik (50°C), sedangkan *K. gibsonii* tergolong bakteri psikotropik (4°C). Mengetahui

keberadaan ketujuh bakteri tersebut pada pindang tongkol (*E. affinis*), bakteri tersebut dapat dicegah dengan menerapkan *Good Agricultural Practices* (GAP) dan apabila dimungkinkan dilaksanakannya sistem *Hazard Analysis and Critical Control Point* (HACCP) pada proses pengolahan pindang (Satomi, 2016). Pengolahan olahan makanan laut menjadi abon diketahui mampu menurunkan tingkat kecemaran bakteri termasuk bakteri halofilik, termofilik, psikotropik dan yang menghasilkan histamin (Nusi *et al.*, 2015).

Kelemahan diagnosis bakteri menggunakan pengecatan Gram dapat didukung oleh penegakan diagnosis memakai metode PCR. Identifikasi secara molekuler lebih akurat dalam penegakan identifikasi bakteri sehingga dapat menekan penyalahgunaan dan tingkat toleransi penggunaan antibiotik (Tsalik *et al.*, 2018). Koloni K5, K8 dan K9 menunjukkan hasil 98% DNA hasil PCR dengan primer 16s rRNA teridentifikasi bakteri tunggal *B. cereus*, *S. sciuri* dan *K. gibsonii*. Hasil tersebut membuktikan bahwa isolasi koloni yang teramplifikasi murni terdiri satu koloni bakteri.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh, maka dapat disimpulkan bahwa sebanyak tujuh bakteri patogen yakni *B. cereus*, *S. seohaensis*, *V. alginolyticus*, *K. gibsonii*, *E. cloacae*, *S. sciuri* dan *S. nematodiphila* teridentifikasi mencemari produk pindang yang diperjualbelikan di pasar tradisional di Kabupaten Klungkung.

SARAN

Perlu dilakukan optimasi suhu dan siklus *Polymerase Chain Reaction* (PCR) terhadap tiga sampel bakteri yang belum diperoleh pita DNA untuk dapat mengidentifikasi bakteri lebih lanjut. Pewarnaan atau pengecatan bakteri sebaiknya dilakukan segera setelah koloni bakteri tumbuh bertujuan menghindari Gram positif atau negative palsu.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Ristekdikti yang telah memberikan dana bagi terlaksananya penelitian ini di tahun 2019 dengan kontrak nomor 112/

SP2H/PPM/DRPM/2019 tanggal 03 Maret 2019; 0903/L8/KM/2019 tanggal 27 Maret 2019; 18/Undhira-LP2M/PN/2019 tanggal 22 April 2019, dan laboratorium dari lembaga institusi terkait, Fakultas Kedokteran dan Kedokteran Hewan Universitas Udayana serta Fakultas Pertanian, Universitas Warmadewa yang menyediakan fasilitas dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Adisanjaya NN. 2018. Potensi, Produksi Sumberdaya Ikan di Perairan Laut Indonesia dan Permasalahannya. <http://www.eafm-indonesia.net/public/files/penelitian/5ae09>. Accessed April 24.
- Aljohny BO. 2015. Halophilic Bacterium - A Review of New Studies. *Biosciences Biotechnology Research Asia* 12(3): 2061-2069.
- Alonzo AG, Alexie SA. 2015. Microbial, Physicochemical, and Sensory Quality Evaluations of Salted Herring (*Sardinella fimbriata*) Subjected to Different Drying Processes. *Food Science and Technology Research* 21(2): 213-221 doi: 10.3136/fstr.21.213.
- Arzu B, Gülderen KK. 2018. Effect of Brine and Dry Salting Methods on The Physicochemical and Microbial Quality of Chub (*Squalius cephalus* Linnaeus, 1758). *Food Sci Technol Campinas* 38(Suppl. 1): 66-70.
- Bicini A, Gulderen KK. 2018. Effect of brine and dry salting methods on the physicochemical and microbial quality of chub (*Squalius cephalus* Linnaeus, 1758). *Food Sci Technol Campinas* 38(Suppl. 1): 66-70.
- Darshan N, Manonmani HK. 2016. Prodigiosin inhibits motility and activates bacterial cell death revealing molecular biomarkers of programmed cell death. *AMB Express* 6(50): 1-12. DOI 10.1186/s13568-016-0222-z.
- Diana FM. 2012. Omega 3. *Jurnal Kesehatan Masyarakat* 6(2): 113-117
- Fathin A, Widodo FM, Apri DA. 2016. Pengaruh lama perebusan ikan bandeng (*Chanos chanos Forsk*) pindang goreng terhadap kandungan lisin dan protein terlarut. *J Peng & Biotek* 5(1): 88-93.

- Fatuni YS, Ruddy S, Agoes MJ. 2014. Identification on Histamine Content and Histamin-Forming Bacteria of Boiled Bandeng Slender Tuna. *JPHPI* 17(2): 112-118.
- Guliano C, Patel CR, Pramodini BK. 2019. A Guide to Bacterial Culture Identification and Results Interpretation. *P&T*® 44(4): 192-200.
- Hardiprasetya DB. 2015. Penggunaan *Lactobacillus sp.* sebagai Biopreservatif pada ndang Ikan Tongkol (*Euthynnus affinis*). Universitas Atma Jaya Yogyakarta Fakultas Teknobiologi Program Studi Biologi Yogyakarta. <http://e-journal.uajy.ac.id/7672/1/JURNAL.pdf>
- Hasan BO, Fatma A. 2015. Nutritional and Sensory Properties of Salted Fish Product, Lakerda. Ormanci & Colakoglu. *Cogent Food & Agriculture* 1: 1008348 <http://dx.doi.org/10.1080/23311932.2015.1008348>.
- Hermana I, Kusmarwati A, Yennie Y. 2018. Isolasi Dan Identifikasi Kapang Dari Ikan Pindang. *JPB Kelautan dan Perikanan* 13(1): 81-92. doi <http://dx.doi.org/10.15578/jpbkp.v13i1.492>.
- Hernandez I. 2017. Bacteriophages against *Serratia* as Fish Spoilage Control Technology. *Frontiers in Microbiology* 8(449): 1-8. doi: 10.3389/fmicb.2017.00449. www.frontiersin.org
- Iwamoto M, Tracy A, Barbara EM, David LS. 2010. Epidemiology of Seafood Associated Infections in United States. *Clinical Microbiology Reviews* 23(2): 399-411.
- Jalal KCA, Akbar John B, Nurul Lyana MS, Faizul HN, Noor Isma Yanti M, Irwandi J, Mahbuba B. 2017. Comparative study on spoilage and pathogenic bacteria in selected commercial marine and freshwater fishes. *International Food Research Journal* 24(7): 298-304. <http://www.ifrj.upm.edu.my>
- Kadariya J, Tara CS, Dipendra C. 2014. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International. Article ID 827965, 9 pages.
- Mahlen SD. 2011. *Serratia* Infection: from Military Experiments to Current Practise. *Clinical Microbiology Reviews* 24(4): 755-791. doi:10.1128/CMR.00017-11.
- Marino M, Frigo F, Bartolomeoli I and Maifreni M. 2010. Safety-related properties of staphylococci isolated from food and food environments. *Journal of Applied Microbiology* 110(2): 550-561. ISSN 1364-5072. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04909.x.
- Miranda LS, Pablo V, Alejandro C, Rosario ME. 2018. The Genomic Basis of Intrinsic and Acquired Antibiotic Resistance in the Genus *Serratia*. *Frontiers in Microbiology* 9(828): 1-16. doi: 10.3389/fmicb.2018.00828.
- Muriati M, Hadiwijaya WG. 2011. Analisis Strategi Pengembangan Sentra Pengolahan Hasil Perikanan di Desa Kusamba Kabupaten Klungkung. *Jurnal Agrimeta* 1(2): 1-14. ISSN: 2088-2521.
- Noha AG, Nahla AE, Hossam AI, Ibrahim AS. 2014. Enterobacteriaceae in Some Marine Fish Fillet. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences* 40: 124-131. doi: 10.5455/ajvs.49502.
- Nusi TSI, Asri SN, Faiza AD. 2015. Pendugaan Umur Simpan Abon Ikan Tongkol Asap. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan* 3(3): 103-105.
- Oh WT, Jin WJ, Sib SG, Saekil Y, Hyoun JK, Sang GK, Sang WK, Se JH, Jun K, Se CP. 2019. *Staphylococcus xylosus* Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) As a Primary Pathogenic Cause of Eye Protrusion and Mortality. *Microorganisms* 7: 330.
- Ongradi J, Stercz B, Kovesdi V, Nagy K and Chatlyne L. 2014. Isolation of *Kurthia gibsonii* from non-gonorrhoeal urethritis: Implications for the pathomechanism upon surveying the literature. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 61(1): 79-81 doi.org/10.1556/AMicr.61.2014.1.8.
- Pal M, Ketema A, Anberber M, Mulu S, Dutta Y. 2016. Microbial quality of Fish and Fish Products. *Beverage & Food World* 43(2): 46-49
- Pandit GS. 2017. Penerapan Teknik Penanganan yang Berbeda Terhadap Kualitas Ikan Segar sebagai Bahan Baku Pembuatan Ikan Pindang. *Jurnal Perikanan* 19(2): 89-96

- Pratama RI, Muhammad YW, Safri I. 2011. Komposisi Asam Lemak Ikan Tongkol, Layur, Dan Tenggiridari Pameungpeuk, Garut. *Jurnal Akuatika* 2(2): 107-115
- Rasool U, Ajaz A, Badroo GA, Mir M, Fayaz S, Mustafa R. 2017. Isolation and Identification of *Bacillus cereus* from Fish and their Handlers from Jammu, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(8): 441-447.
- Ribeiro Júnior JC, de Oliveira AM, Silva FG, Tamanini R, Oliveira ALM, Beloti V. 2018. The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *J Dairy Sci* 101: 75–83 <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13069>.
- Renato VO, Monica CO, Afonso P. 2017. Disease Infection by Enterobacteriaceae Family in Fishes: A Review. *Journal of Microbiology & Experimentation* 4(5): 1-2
- Tsalik EL, Robert AB, Vance GF. 2018. New Molecular Diagnostic Approaches to Bacterial Infections and Antibacterial Resistance. *Annu Rev Med* 29(69): 379–394.
- Tur JA, Bibiloni MM and Pons A. 2012. Dietary Sources Of Omega 3 Fatty Acids: Public Health Risks and Benefits. *The British Journal of Nutrition* 4681: 17-28.
- Samuel LP, Joan-Miquel BL, Amanda H, Robert C. 2016. Multicenter Assessment of Gram Stain Error Rates. *Journal of Clinical Microbiology* 54(6): 1442-1447.
- Sabir M, Ennaji MM, Cohen N. 2013. *Vibrio Alginolyticus*: An Emerging Pathogen of Foodborne Diseases. *International Journal of Science and Technology* 2(4): 302-309.
- Satomi M. 2016. Effect of Histamine-producing Bacteria on Fermented Fishery Products. *Food Science and Technology Research* 22(1): 1-21.
- Sri P, Elisa DJ, Hermina. 2016. Kontribusi jenis bahan makanan terhadap konsumsi natrium pada anak usia 6-18 tahun di Indonesia. *Penelitian Gizi dan Makanan* 39(1): 55-63.
- Sergelidis D, Abraham A, Papadopoulos T, Soutos N, Martziou E, Koulourida V, Govaris A, Pexara A, Zdragas A, Papa A. 2014. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus spp.* from ready-to-eat fish products. *Letters in Applied Microbiology* 59(5): 500-506. ISSN 0266-8254. doi:10.1111/lam.12304.
- Violentina GAD, Ramona Y, Mahardika IG NK. 2015. Identifikasi Bakteri dari Ikan Tongkol (*Euthynnus affinis*) yang Diperdagangkan di Pasar Kedonganan Bali. *Jurnal Biologi* 19(2):.
- Zhang CX, Shou-Yun Y, Ming-Xu X, Jie S, Huan L, Jing-Rui L, Fei K, Jing S, Ren L, Ke-Yun Z. 2009. *Serratia nematodiphila* sp. Nov., associated symbiotically with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditoides chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59 (7): 1603-1608. DOI 10.1099/ijs.0.003871-0.