

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/btla>

PENENTUAN LIMIT DETEKSI METODE IDENTIFIKASI BAKTERI *Aeromonas hydrophila* MENGGUNAKAN *Kit Analytical Profile Index (API) 20 E*

Diah Artati dan Moh. Oman

Balai Riset Pemuliaan Ikan

Jl. Raya 2 Sukamandi, Subang, Jawa Barat 41263

E-mail: bpsukamandi@kkp.go.id

ABSTRAK

Limit deteksi atau batas deteksi dalam pengujian mikrobiologi merupakan konsentrasi analit (mikroba) dalam sampel yang masih dapat dideteksi dalam kondisi percobaan yang ditentukan. Penentuan limit deteksi perlu dilakukan sebagai salah satu parameter uji dalam kegiatan validasi metode analisis mikrobiologi. Validasi dan verifikasi metode dibutuhkan sebagai standar ISO/IEC 17025:2017 (persyaratan umum laboratorium pengujian dan laboratorium kalibrasi) dan juga sebagai *mandatory* untuk ISO/IEC 17025:2017 bagian yang harus dikomunikasikan kepada pelanggan. Tujuan dari kegiatan penentuan limit deteksi ini adalah untuk mengetahui batasan konsentrasi terendah yang masih dapat dideteksi oleh metode *Kit API 20 E* dalam kegiatan identifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* di Laboratorium Mikrobiologi BRPI Sukamandi. Sampel uji bakteri yang digunakan adalah bakteri hasil isolasi pada ikan patin yang sebelumnya sudah diidentifikasi dan dinyatakan positif terdeteksi sebagai *Aeromonas hydrophila*. Hasil penentuan limit deteksi metode identifikasi *Aeromonas hydrophila* menggunakan *Kit API 20 E* dengan enam replikasi menunjukkan bahwa konsentrasi 100 CFU/mL merupakan batas deteksi untuk pengujian identifikasi *Aeromonas hydrophila* menggunakan *Kit API 20 E* di Laboratorium Mikrobiologi BRPI Sukamandi dengan persentase *recovery* sebesar 83,33%.

KATA KUNCI: limit deteksi; *API 20 E*; *Aeromonas hydrophila*; validasi metode

PENDAHULUAN

Limit deteksi atau batas deteksi dalam pengujian mikrobiologi merupakan konsentrasi analit (mikroba) dalam sampel yang masih dapat dideteksi dalam kondisi percobaan yang ditentukan. Batas deteksi disebut juga sebagai konsentrasi analit terkecil atau terendah yang dinyatakan dalam CFU/mL atau CFU/g. Menurut ISO 16140-2 (2016), batas deteksi atau disebut juga *limit of detection* (LOD) merupakan kemampuan metode untuk mendeteksi tingkat konsentrasi analit (mikroba) terendah. Limit deteksi juga memiliki pengertian sebagai jumlah terendah yang dapat dideteksi, dengan jumlah sampel > 5 replika dan memberikan hasil perolehan kembali sebesar > 50%. Limit deteksi adalah konsentrasi atau jumlah terkecil/terendah dari analit dalam sampel yang masih menunjukkan nilai serapan atau absorbansi pada alat tanpa harus memenuhi kriteria akurasi dan presisi (Torowati & Galuh, 2014).

Penentuan limit deteksi perlu dilakukan sebagai salah satu parameter uji dalam kegiatan validasi metode analisis mikrobiologi. Validasi metode analisis adalah proses pembuktian atau konfirmasi pengujian

yang objektif di laboratorium dan bahwa metode itu memenuhi persyaratan yang telah ditentukan yang sesuai dengan tujuan penggunaannya (ISO 16140-2, 2016). Penilaian yang dilakukan adalah berdasarkan parameter analitik tertentu berdasarkan percobaan untuk memenuhi syarat sesuai dengan tujuan penggunaan, serta dilakukan konfirmasi melalui pengujian dan bukti objektif agar persyaratan untuk maksud khusus dipenuhi.

Validasi dan verifikasi metode dibutuhkan sebagai standar ISO/IEC 17025:2017 (persyaratan umum laboratorium pengujian dan laboratorium kalibrasi) dan juga sebagai *mandatory* untuk ISO/IEC 17025:2017 merupakan bagian yang harus dikomunikasikan kepada pelanggan. Selain itu, validasi dan verifikasi metode dibutuhkan dalam rangka penyajian bukti ilmiah akan unjuk kerja metode yang digunakan dan untuk komunikasi kepada semua pihak yang berkepentingan bahwa semua kriteria dan persyaratan telah ditetapkan dan dipenuhi.

Validasi dan verifikasi metode membantu praktisi laboratorium dalam mencapai hasil yang benar sekaligus dapat membuktikan kebenarannya sehingga

customer mempercayai kinerja laboratorium dengan didukung data yang valid dan *reliable*. Selain itu, validasi dan verifikasi metode juga membantu praktisi laboratorium dalam proses pembuktian bahwa fungsi dari sebuah metode telah sesuai dengan tujuan. Kegiatan validasi dan verifikasi metode dapat digunakan sebagai sistem jaminan mutu suatu metode kerja, sehingga seringkali menjadi bagian dari prosedur legal atau peraturan perundang-undangan, serta memungkinkan untuk membandingkan hasil dari contoh sampel yang dianalisis di laboratorium yang berbeda-beda.

Jenis pengujian validasi dan verifikasi terbagi menjadi dua yaitu metode kualitatif dan kuantitatif. Metode kualitatif merupakan metode di mana hasil pengujiannya berupa respons positif atau negatif, sedangkan metode kuantitatif merupakan metode dengan hasil berupa jumlah analit baik yang diukur secara langsung (misal Angka Lempeng Total/ALT) maupun tidak langsung (misal absorban) terhadap sejumlah sampel. Persyaratan dalam melakukan kegiatan validasi dan verifikasi adalah personel yang kompeten, peralatan dan instrumen yang terkalibrasi, mikroba acuan, program statistik untuk mengevaluasi, dan menginterpretasikan hasil pengujian dan protokol yang sudah tervalidasi atau terverifikasi.

Pengujian karakteristik analitik untuk kualitatif terdiri atas lima jenis pengujian, yaitu limit deteksi, spesifitas/selektivitas, sensitivitas, tingkat positif palsu, dan tingkat negatif palsu (ISO 16140-2, 2016). Tujuan dari kegiatan penentuan limit deteksi ini adalah untuk mengetahui batas konsentrasi terendah yang masih dapat dideteksi oleh metode *Kit API 20 E* dalam kegiatan identifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* di Laboratorium Mikrobiologi BRPI Sukamandi.

BAHAN DAN METODE

Kegiatan ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Balai Riset Pemuliaan Ikan Sukamandi. Sampel uji bakteri yang digunakan adalah bakteri hasil isolasi pada ikan patin yang sebelumnya sudah diidentifikasi dan dinyatakan positif terdeteksi sebagai *Aeromonas hydrophila*. Proses penanaman dan pemurnian bakteri dilakukan di dalam *bio safety cabinet* kemudian diinkubasi pada suhu 30°C dan digunakan untuk pengujian pada umur 18-24 jam. Sampel yang digunakan dalam pengujian berjumlah satu sampel dengan enam replika. Pengujian dilakukan pada konsentrasi 10 CFU/mL dan 100 CFU/mL. Prosedur pengujian yang dilakukan berdasarkan acuan petunjuk tingkat operasional *Kit API 20 E* (Biomerieux, 2020).

Uji Oksidase

Uji oksidase dilakukan dengan menggunakan *oxidase discs*. Pengujian ini dilakukan dengan cara mengambil 1-2 ose koloni menggunakan jarum ose non logam steril kemudian digoreskan pada *oxidase discs*. Hasil goresan kemudian diamati muncul tidaknya warna biru pada *oxidase discs*. Jika terjadi perubahan warna menjadi biru berarti menunjukkan hasil yang positif.

Preparasi Strip *Kit API 20 E*

Kit API 20 E telah dilengkapi dengan kotak inkubasi yang terdiri atas wadah dan penutup berbahan plastik transparan untuk inkubasi strip selama pengujian berlangsung. Wadah yang akan digunakan sebelumnya telah diberikan kode sampel terlebih dahulu kemudian tiap sumurannya diisi dengan akuades. Strip yang akan digunakan kemudian ditempatkan pada kotak inkubasi tersebut secara hati-hati. Strip terdiri atas sumur-sumur yang telah berisi *reagen* dalam bentuk kering dengan dilengkapi kode-kode jenis pengujian (keterangan masing-masing kode uji terdapat pada Tabel 1).

Preparasi Inokulum dan Proses Inokulasi pada Strip

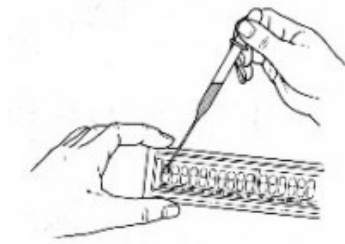
Inokulum yang digunakan untuk pengujian ini adalah inokulum yang berumur 18-24 jam yang ditumbuhkan pada media TSA. Inokulum tersebut diambil 2-3 ose dan dilarutkan dalam 5 mL PBS kemudian dihomogenkan. Suspensi bakteri yang telah dibuat kemudian didistribusikan pada masing-masing sumur-sumur pada strip secara hati-hati agar tidak terbentuk gelembung udara yang akan memengaruhi pengujian (Gambar 1). Volume suspensi bakteri pada sumur terbagi menjadi dua, yaitu untuk uji dengan kode CIT, VP, dan GEL maka sumur diisi penuh sedangkan untuk uji lainnya hanya diisi sebagian yaitu hanya sampai pada batas penutup sumur (Gambar 2). Penambahan mineral oil dilakukan pada uji ADH, LDC, ODC, H₂S, dan URE untuk membuat kondisi menjadi anaerob. Setelah distribusi sampel selesai kemudian kotak inkubasi ditutup dan sampel diinkubasi pada suhu 36°C ± 2°C selama 18-24 jam.

Pembacaan Strip

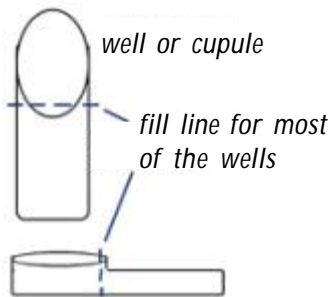
Setelah periode inkubasi selesai kemudian strip dibaca berdasarkan *reading table* yang telah tersedia pada *Kit API 20 E*. Jika terdapat tiga atau lebih hasil pengujian yang dinyatakan positif (tidak termasuk hasil uji GLU) maka dapat dilanjutkan ke tahap pengujian selanjutnya dengan terlebih dahulu mencatat hasil

Tabel 1. Reading table Kit API 20 E

Tests	Active ingredients	Qty (mg/cup.)	Reaction/Enzymes	Results	
				Negative	Positive
ONPG	2-nitrophenyl-βD-galactopyranoside	0,223	β-galactosidase (Ortho NitroPhenyl-βD-Galactopyranosidase)	Colorless	Yellow (1)
<u>ADH</u>	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	Yellow	Red/orange (2)
<u>LDC</u>	L-lysine	1,9	Lysine DeCarboxylase	Yellow	Red/orange (2)
<u>ODC</u>	L-omithine	1,9	Ornithine DeCarboxylase	Yellow	Red/orange (2)
<u>[CIT]</u>	Trisodium citrate	0,756	CITrate utilization	Pale green/yellow	Blue-green/blue (3)
<u>H₂S</u>	Sodium thiosulfate	0,075	H ₂ S production	Colorless/greyish	Black deposit/thin line
<u>URE</u>	Urea	0,76	UREase	Yellow	Red/orange (2)
TDA	L-tryptophane	0,38	Tryptophane DeAminase	Yellow	<u>TDA/immediate</u> Pink
IND	L-tryptophane	0,19	INDole production	Colorless pale green/yellow	<u>JAMES/immediate</u> Pink
<u>[VP]</u>	Sodium pyrurate	1,9	Acetoin production (Voges Proskauer)	Colorless	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min.</u> Pink/red (5)
<u>[GEL]</u>	Gelatin (bovine origin)	0,6	GELatinase	No diffusion	Diffusion of black pigment
GLU	D-glucose	1,9	Fermentation/oxidation (GLUcose) (4)	Blue/blue-green	Yellow/greyish yellow
MAN	D-mannitol	1,9	Fermentation/oxidation (MANnitol) (4)	Blue/blue-green	Yellow
INO	Inositol	1,9	Fermentation/oxidation (INOsitol) (4)	Blue/blue-green	Yellow
SOR	D-sorbitol	1,9	Fermentation/oxidation (SORbitol) (4)	Blue/blue-green	Yellow
RHA	L-rhamnose	1,9	Fermentation/oxidation (RHAmnose) (4)	Blue/blue-green	Yellow
SAC	D-sucrose	1,9	Fermentation/oxidation (SACcharose) (4)	Blue/blue-green	Yellow
MEL	D-melibiose	1,9	Fermentation/oxidation (MELibiose) (4)	Blue/blue-green	Yellow
AMY	Amygdalin	0,57	Fermentation/oxidation (AMYgdalin) (4)	Blue/blue-green	Yellow
ARA	L-arabinose	1,9	Fermentation/oxidation (ARAbinose) (4)	Blue/blue-green	Yellow
OX	(See oxidase test package insert)		Cytochrome-OXI dase		(See oxidase test package insert)



Gambar 1. Suspensi bakteri dimasukkan ke dalam sumur yang berisi reagen kering.



Gambar 2. Suspensi bakteri dimasukkan hanya sebatas bagian sumur yang tertutup.

pengujian sementara pada lembar hasil yang telah disediakan. Jika hasil uji (termasuk uji GLU) didapatkan hasil kurang dari tiga yang menunjukkan hasil positif, maka dilakukan inkubasi kembali selama 24 jam \pm 2 jam sebelum dilakukan pengujian lebih lanjut.

Penambahan Reagen

Penambahan reagen dilakukan setelah pembacaan strip menunjukkan hasil yang telah sesuai dengan kriteria pengujian. Jenis uji yang membutuhkan penambahan reagen adalah uji TDA, IND, dan VP. Uji TDA dilakukan dengan cara menambahkan satu tetes reagen TDA pada tube strip dengan kode TDA. Jika terbentuk warna coklat kemerahan maka mengindikasikan bahwa terjadi reaksi positif pada uji tersebut. Penambahan reagen JAMES dilakukan pada uji IND yaitu dengan cara menambahkan satu tetes reagen JAMES pada tube strip dengan kode IND kemudian diamati ada tidaknya warna pink yang terbentuk pada bagian atas tabung (cupule) yang menunjukkan reaksi positif. Sedangkan pada uji VP, ditambahkan reagen VP-1 dan VP-2 masing-masing sebanyak satu tetes kemudian ditunggu selama 10 menit. Jika muncul warna pink atau merah maka menunjukkan reaksi positif. Jika setelah 10 menit muncul sedikit warna pink maka dapat dikategorikan hasil reaksinya negatif.

Proses Pengisian Data Menggunakan Software

Proses identifikasi diperoleh berdasarkan *numerical profile*. Penentuan nilai *numerical profile* pada lembar hasil dibagi dalam tiga kelompok nilai yaitu nilai 1, 2, dan 4 untuk tiap-tiap jenis uji yang akan mengindikasikan hasil tertentu. Penilaian masing-masing kelompok berdasarkan reaksi positif yang ditunjukkan selama pengujian akan memperoleh tujuh digit nomor profil untuk 20 jenis pengujian pada strip API 20 E. Reaksi oksidase merupakan pengujian ke-21 dan memiliki nilai empat jika positif. Hasil identifikasi dapat diketahui dengan menggunakan *apiweb™ identification software*.

HASIL DAN BAHASAN

Penentuan limit deteksi metode merupakan salah satu syarat terpenuhinya kegiatan validasi pada pengujian identifikasi *Aeromonas hydrophila* menggunakan Kit API 20 E. Beberapa kondisi yang masuk kriteria perlunya dilakukan validasi dan atau verifikasi metode analisis adalah jika performa parameter metode uji tersebut belum valid atau belum dibuktikan valid untuk penggunaan problem analisis khusus atau jika laboratorium mengembangkan atau mengadopsi metode yang sesuai penggunaannya. Selain itu, validasi dan verifikasi juga dibutuhkan jika laboratorium menggunakan metode tidak baku, laboratorium menggunakan metode baku yang digunakan di luar lingkup yang dimaksudkan dan jika laboratorium memodifikasi metode baku untuk konfirmasi bahwa metode itu sesuai dengan penggunaan yang dimaksud.

Hasil penentuan limit deteksi metode identifikasi *Aeromonas hydrophila* menggunakan Kit API 20 E dengan enam replikasi menunjukkan bahwa konsentrasi 100 CFU/mL merupakan batas deteksi untuk pengujian identifikasi *Aeromonas hydrophila* menggunakan Kit API 20 E di Laboratorium Mikrobiologi BRPI Sukamandi. Hal ini dapat dilihat sebagaimana hasil pengujian pada Tabel 2.

Berdasarkan Tabel 2, hasil pengujian pada konsentrasi 100 CFU/mL pada enam replikasi menunjukkan ada satu replika yang karakteristiknya tidak sesuai dengan karakteristik bakteri *Aeromonas hydrophila* yaitu pada replika ke-2, di mana uji VP yang seharusnya positif tetapi mendapatkan hasil negatif. Sedangkan pada konsentrasi 10 CFU/mL pada enam replikasi menunjukkan bahwa terdapat lima replika yang karakteristiknya tidak sesuai dengan karakteristik bakteri *Aeromonas hydrophila* dan hanya terdapat satu replika yang sesuai yaitu pada replika nomor empat. Penentuan hasil positif *Aeromonas hydrophila* berdasarkan pada keterangan *Significant taxa* yang menyebutkan bahwa jenis bakteri merupakan

Tabel 2. Hasil uji limit deteksi (*Kit* API 20E)

Parameter pengujian	Kode sampel											
	100 CFU/mL						10 CFU/mL					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LDC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
CIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
VP	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
GEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
MEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMY	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
ARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

bakteri target dengan *Category "Very good identification"* seperti yang terlihat dalam *apiweb™ identification software* pada Tabel 3.

Data hasil pengujian yang dilakukan pada sampel dengan konsentrasi 100 CFU/mL dan 10 CFU/mL menggunakan *Kit* API 20 E memperoleh hasil persentase *recovery* sebesar 83,33% (Tabel 4). Hasil ini sudah memenuhi syarat keberterimaan yang ditentukan yaitu > 50%. Penentuan hasil didasarkan pada hasil uji presumtif terhadap hasil uji yang terkonfirmasi. Pengujian sampel pada konsentrasi 100 CFU/mL dari enam replika dengan presumtif positif ternyata hanya lima replika yang terkonfirmasi positif sedangkan satu replika terkonfirmasi negatif. Berbeda dengan sampel pada konsentrasi 10 CFU/mL, di mana hanya ada satu replika yang terkonfirmasi positif sedangkan lima replika lainnya terkonfirmasi negatif.

Berdasarkan pengujian, maka didapatkan limit deteksi yaitu pada konsentrasi 100 CFU/mL, karena didapatkan *recovery* \geq 50%, seperti perhitungan sebagai berikut:

Penggunaan *Kit* API 20 E didasarkan pada kemampuannya dalam mengidentifikasi spesies dan

subspesies *Enterobacteriaceae* dan identifikasi kelompok, serta spesies mikroorganisme non-fermentatif. Bakteri kelompok *Enterobacteriaceae* merupakan kelompok bakteri Gram negatif yang berbentuk batang, bersifat anaerob fakultatif dan bisa bergerak menggunakan alat bantu gerak yang disebut flagella peritrik yaitu flagella yang secara merata tersebar di seluruh permukaan sel (Pelczar & Chan, 1986). Bakteri ini terdiri atas bakteri non-patogen dan patogen yang bisa ditemukan di tanah, hewan, tanaman, dan manusia. Spesies dari bakteri ini banyak ditemukan hidup di sistem pencernaan dan merupakan penyebab sebagian besar penyakit. Sebagian spesies bersifat motil dan mampu menempel pada inang (*host*), serta menghasilkan enterotoksin. Salah satu jenis bakteri yang dapat diidentifikasi menggunakan *Kit* API 20 E adalah bakteri *Aeromonas hydrophila*.

KESIMPULAN

Limit deteksi metode atau batas konsentrasi terendah pada pengujian identifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* menggunakan *Kit* API 20 E adalah 100 CFU/mL dengan persentase perolehan kembali sebesar 83,33%.

Tabel 3. Hasil pembacaan software uji limit deteksi (API 20 E)

Kode sampel	Replikasi	Taxa signifikan	Persentase (%) id	Kategori
100 CFU/mL	1	<i>Aeromonas hydrophila/caviae/sobria</i> 2	99	Identifikasi sangat baik
	2	<i>Aeromonas hydrophila/caviae/sobria</i> 2	89,8	Identifikasi sangat baik untuk genus
	3	<i>Aeromonas hydrophila/caviae/sobria</i> 2	99	Identifikasi sangat baik
	4	<i>Aeromonas hydrophila/caviae/sobria</i> 2	99	Identifikasi sangat baik
	5	<i>Aeromonas hydrophila/caviae/sobria</i> 2	99	Identifikasi sangat baik
	6	<i>Aeromonas hydrophila/caviae/sobria</i> 2	99	Identifikasi sangat baik
10 CFU/mL	1	<i>Burkholderia cepacia</i>	63,7	Profil meragukan
	2	<i>Aeromonas hydrophila/caviae/sobria</i> 2	89,8	Identifikasi sangat baik untuk genus
	3	<i>Aeromonas hydrophila/caviae/sobria</i> 2	-	Profil yang tidak dapat diterima
	4	<i>Aeromonas hydrophila/caviae/sobria</i> 2	99,8	Identifikasi sangat baik
	5	<i>Aeromonas hydrophila/caviae/sobria</i> 2	89,8	Identifikasi sangat baik untuk genus
	6	<i>Aeromonas hydrophila/caviae/sobria</i> 2	89,8	Identifikasi sangat baik untuk genus

Tabel 4. Perhitungan hasil uji limit deteksi (Kit API 20 E)

Konsentrasi CFU/mL	Hasil	Replikasi					
		1	2	3	4	5	6
100	Presumtif	+	+	+	+	+	+
	Terkonfirmasi	+	-	+	+	+	+
10	Presumtif	+	+	+	+	+	+
	Terkonfirmasi	-	-	-	+	-	-

DAFTAR ACUAN

Biomerieux. (2020). <https://www.biomerieux-usa.com/clinical/api>. Diakses pada tanggal 10 Februari 2020.

ISO 16140-2. (2016). Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. Geneva, Switzerland. 66 pp.

SNI ISO/IEC 17025. (2017). Persyaratan umum untuk kompetensi laboratorium pengujian dan kalibrasi. 49 pp.

Pelczar, M.J. & Chan, E.C.S. (1986). Dasar-dasar mikrobiologi. Volume 2. Jakarta: Universitas Indonesia Press, 949 hlm.

Torowati & Galuh, B.S. (2014). Penentuan nilai limit deteksi dan kuantitasi alat titrasi potensiometer untuk analisis uranium. Puspitex Serpong: Pusat Teknologi Bahan Bakar Nuklir.