



OBAT BIRU IKAN SEBAGAI REAGEN ALTERNATIF UNTUK METHYLENE BLUE REDUCTION TEST (MBRT) SUSU SEGAR

Blue Medicine for Fish as Alternative Reagent for Raw Milk Methylene Blue Reduction Test (MBRT)

**Edy Tya Gullit Duta Pamungkas¹; Yulina Lailatul Maslukhah¹; Amirotul
Muniroh¹; Rizqi Sofi Nur Fitriyah¹; Nundiah Zuhrohfi Immaroh¹**

¹ Fakultas Teknologi dan Sains, Universitas PGRI Wiranegara

Email:

edit.gullit.d.p@gmail.com

Abstrak

MBRT merupakan teknik analisis kualitatif susu segar yang mudah, tanpa kebutuhan laboratorium dan peralatan khusus. Reagen yang dibutuhkan hanyalah larutan *methylene blue*. Daerah-daerah tertentu yang jauh dari kota besar di Indonesia tidak memiliki akses supplier bahan kimia kualitas reagen terdekat, sehingga menjadi tantangan dalam memperoleh larutan dalam waktu cepat. Obat biru ikan secara umum memiliki kandungan daripada *methylene blue* dan relatif mudah diperoleh. Penelitian ini bertujuan menganalisis performa beberapa obat ikan komersil dalam MBRT. 4 obat biru (RA, SP, BI dan YR) ikan komersil diaplikasikan dalam MBRT dibandingkan dengan MB dan susu segar steril dan terkontaminasi. Seluruh perlakuan diinkubasi selama 240 menit. Keempat obat ikan menunjukkan performa reduksi warna biru terhadap susu terkontaminasi. RA dan BI menunjukkan sisa warna biru yang tidak tereduksi, sedangkan MB, SP dan YR menunjukkan reduksi sempurna selama masa inkubasi. SP dan YR berpotensi dapat digunakan sebagai alternatif MB dalam MBRT.

Kata kunci: Obat Biru, Obat Ikan, Susu, Uji Reduksi Metilen Biru

Abstract

MBRT is qualitative analysis technique for raw milk that is easy with no sophisticated laboratory and equipment requirement. The only reagent needed is methylene blue solution. In the certain area which far from big city in Indonesia had difficult access for proper chemical supplier then become challenge to acquire reagent grade chemical. "Obat biru", the named is based from the color of solution, is generally contain methylene blue and easier to obtain. The aim of this research was to analyze the performance of some "obat biru" in MBRT. The 4 commercial "obat biru" (RA, SP, BI and YR) were applied in MBRT then were compared to MB and sterilized and contaminated milk. All treatments incubated for 240 minutes. The reduction of blue color was performed by all contaminated

raw milk. RA and BI left some trace of blue color in the end of observation, while MB, SP and YR showed complete reduction. SP and YR has potency as alternative for substituting MB in MBRT

Keywords: *Fish Medicine, Methylene Blue Reduction Test, Milk, Obat Biru,*

1 Pendahuluan

Susu sapi dikenal sebagai salah satu sumber protein hewani yang paling banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia. Menurut Standar Nasional Indonesia (SNI), susu segar (*raw milk*) didefinisikan sebagai cairan yang berasal dari ambung sapi sehat dan bersih. Perolehan cairan tersebut harus melalui cara pemerahan yang benar, kandungan alami tidak dikurangi dan ditambah sesuatu apapun dan proses maksimal yang dikenakan adalah pendinginan (Susu Segar: SNI 3141.1:2011, 2011). Konsumsi tinggi ditunjukkan dengan keterpenuhan susu nasional mencapai 40% dari kebutuhan nasional dan diasumsikan terjadi peningkatan kebutuhan per tahunnya. Produksi dan konsumsi susu pada tahun 2026 dirpoyeksikan akan meningkat dengan pertumbuhan 0.65% per tahun untuk produksi susu dan 2.07% per tahun untuk konsumsi (Pertanian, 2022). Permintaan yang besar membutuhkan upaya menjamin kualitas susu.

Kualitas susu menentukan kualitas produk susu. Kualitas susu yang umumnya dianalisis adalah kandungan mikroroganisme (baik pathogen maupun tidak) dan sel somatik, begitu juga keberadaan antibiotik dan obat-obatan. Menurut (Quigley *et al.*, 2013), dikarenakan kandungan nutrisinya yang tinggi susu dapat mendukung pertumbuhan berbagai jenis mikroorganisme fermentasi, pembusuk, meningkatkan kesehatan manusia dan penyebab penyakit pada manusia (*Foodborne disease*) Berdasarkan SNI-13141-2011 (Susu Segar: SNI 3141.1:2011, 2011), syarat mutu susu segar memiliki karakteristik fisik, kimia dan mikroorganisme. Syarat mutu mikroorganisme yang diatur antara lain *Total Plate Count* (TPC), *Staphylococcus aureus* dan *Enterobacteriaceae*.

Pengujian mikroorganisme pada susu segar biasanya dilakukan di laboratorium yang terakreditasi dan berlokasi di daerah perkotaan sehingga jauh dari peternakan. Pengujian tersebut biasanya memerlukan biaya mahal dan membutuhkan waktu cukup lama untuk perolehan hasil analisis (Cuomo *et al.*, 2023). *Methylene Blue Reduction Test* (MBRT) merupakan metode evaluasi kualitas susu segar secara kualitatif. Metode ini merupakan salah satu metode sederhana dan cepat serta tidak memerlukan bahan kimia yang banyak dan peralatan laboratorium rumit (Nandy & Venkatesh, 2014). Prinsip kerja MBRT yaitu warna yang diberikan pada susu ,dalam hal ini *Methylene Blue* (MB), akan menghilang secara cepat atau lambat (Anwer *et al.*, 2018). Metode ini cukup mudah untuk dilakukan oleh pengumpul susu dan atau lembaga-lembaga yang menyalurkan susu dari petani di daerah pinggiran kota. Umumnya kualitas susu dari peternak tidak diketahui jumlah cemarannya sehingga tepat menggunakan MBRT yang bersifat kualitatif.

Kondisi lain yang menjadi tantangan adalah akses terhadap bahan kimia untuk analisis atau *analysis grade*. Toko atau supplier bahan kimia analisis umumnya berada di daerah perkotaan dan tidak seluruh daerah yang terkategori kota di Indonesia memilikinya, sebagai contoh di Kota Pasuruan, Jawa Timur. Akses bahan kimia tersebut dapat diatasi dengan toko *online*, tetapi tidak dapat diandalkan ketika dalam keadaan mendesak dan kebutuhan bahan yang cepat.

Solusi yang dapat dilakukan adalah menggunakan produk komersil yang mengandung MB sebagai pengganti *analysis/reagent grade*. Produk yang berpotensi adalah obat ikan biru. Obat

ikan biru ini digunakan untuk merawat ikan hias dari beberapa penyakit dan juga menjaga pembentukan lumut pada akuarium. MB secara tradisional dan sering digunakan oleh para penghobi dan industri ikan hias sebagai bahan kimia disinfektan, anti jamur, dan anti parasit (Sipos & Urakawa, 2016). Umumnya obat biru memiliki kandungan MB dengan konsentrasi tertentu dan tidak semua merek memberikan informasi yang mendetil. Akses terhadap produk ini pun lebih mudah dan murah dibandingkan analisis grade dan sudah dalam bentuk larutan.

Obat biru ikan, sebagai produk komersil, umumnya memiliki standar di bawah *reagent grade* MB. Parameter yang dimungkinkan menjadi pembeda adalah konsentrasi MB dan kemurnian pada produk. Konsentrasi pewarna akan memberikan kualitas warna yang berbeda walaupun menggunakan volume yang tetap. Penggunaan obat ikan tidak dimaksudkan menjadi pengganti, tetapi sebagai alternatif dalam kondisi tertentu. Evaluasi performa obat ikan perlu dibandingkan terhadap *reagent grade* dalam kondisi susu yang sama. Tujuan dari penelitian ini adalah membandingkan performa reduksi warna beberapa obat ikan biru sebagai alternatif MB *reagent grade* dalam MBRT pada susu yang tidak diketahui jumlah mikrobanya.

2. Metodologi

Alat, Bahan dan Waktu Penelitian

Alat yang digunakan antara lain *waterbath*, mikropipet 1 ml, pipet mohr 10 ml, tabung reaksi, *vortex*, *waterbath*, *timer digital*, *lightbox*, *lightmeter*, kamera digital. *Software* yang digunakan dalam penelitian ini adalah GIMP 2.10 (lisensi *open-source*). Bahan yang digunakan adalah MB *reagent grade* 1% (dilarutkan dalam air demineral), obat ikan komersil, susu steril dan susu terkontaminasi. Obat ikan komersil diperoleh dari Pasar Ikan di Kota Malang dengan kriteria tertulis MB pada label kemasan atau komposisi. Obat ikan yang diperoleh yaitu: Raid All (RA), Sakakai Pro (SP), Blitz Icht (BI), dan Yukari (YR). Susu terkontaminasi diperoleh dengan cara mendiamkan susu selama 1 hari dalam keadaan terbuka. Pemilihan dan penggunaan merek obat ikan semata-mata dikarenakan ketersediaan obat ikan di lokasi serta tidak berhubungan dengan kegiatan promosi satu atau beberapa merek. Penelitian dilakukan bulan Juli-Agustus 2022. Pelaksanaan penelitian berlokasi di Laboratorium Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi dan Sains, Universitas PGRI Wiranegara, Kota Pasuruan, Jawa Timur.

Metode Penelitian

Penelitian menggunakan *Completed Randomized Design* dengan menggunakan 12 perlakuan. Perlakuan yang diterapkan yaitu: MB + Susu Steril (MBS), MB + susu terkontaminasi (MBK), Raid-all + susu steril (RAS), Raid-all + susu terkontaminasi (RAK), Sakakai Pro + susu steril (SPS), Sakakai Pro + susu terkontaminasi (SPK), Blitz icht + susu steril (BIS), Blitz icht + susu terkontaminasi (BIK), Yukari + susu steril (YRS), Yukari + susu terkontaminasi (YRK), Susu steril (SS) dan susu terkontaminasi (SK).

Prosedur Methylene Blue Reduction Test

Prosedur pelaksanaan pengujian merujuk pada (Hermawati *et al.*, 2021). MBRT dilakukan dengan cara menambahkan 10 ml susu (steril dan terkontaminasi) di tabung reaksi dengan tutup dengan 1 ml MB dan obat ikan. Tabung reaksi dihomogenkan menggunakan *vortex* kemudian diinkubasi di dalam *waterbath*. Suhu *waterbath* diatur konstan 30 °C. Pengamatan dilakukan per 30 menit dengan cara mengambil gambar tabung beserta isi di dalam *lightbox* dengan intensitas cahaya yang tetap. Pengamatan dihentikan pada menit ke-240.

Persiapan Susu Terkontaminasi dengan Jumlah Mikroba Tidak Diketahui

Susu terkontaminasi dipersiapkan melalui tahapan sterilisasi susu dengan suhu 121.1 °C selama 15 menit. Susu steril setelah dingin dibuka penutup botolnya dan dibiarkan berkontak dengan udara bebas pada suhu ruang. Botol susu dibuka pada pukul 15.00 WIB dan dipergunakan pada keesokan harinya pukul 9.30 WIB.

Pengukuran Nilai Warna CIE L*a*b*

Pengukuran warna menggunakan metode analisis gambar hasil kamera DSLR (Ak & Kaki, 2016) yang dimodifikasi. Gambar diambil menggunakan pencahayaan tetap di dalam *lightbox*. Cahaya *lightbox* bersumber dari 1 untai LED yang diletakkan pada bagian atas *lightbox*. Penempatan cahaya yaitu pada sudut 45° dari sampel dengan sumber pencahayaan konstan sebesar 1200k. Gambar diambil menggunakan kamera DSLR 450D lensa 50 mm 1.8. Pengaturan kamera dengan ISO 100, shutter speed 1/30, diafragma 1,8 dan resolusi 480 dpi.

Nilai warna CIE L*a*b* dari gambar diperoleh melalui software GIMP (GNU *Image Manipulation Program*). GIMP 2.10 digunakan karena secara bawaan memiliki ruang warna CIE L*a*b*. Nilai CIE L*a*b* secara langsung diekstrak menggunakan *pick tool* atau *color picker*. Radius kursor yang digunakan adalah 10 untuk setiap penggunaan *pick tool*.

Perbedaan Warna

Parameter ΔE mengidentifikasi terdapat nilai perubahan atau perbedaan yang tampak pada sampel sebagai akibat dari L* a* dan b*. Nilai tersebut dapat diperoleh menggunakan persamaan 1. (Sitanggang *et al.*, 2023). ΔE_{ab} bernilai antara 0 hingga 100. Dalam jangkauan ini nilai 0 menunjukkan tidak ada perbedaan diantara 2 gambar, sementara nilai 100 menunjukkan bahwa gambar-gambar menunjukkan perbedaan warna yang bertolak belakang (Zehra & Bashir, 2019).

$$\Delta E_{ab} = \sqrt{\Delta a^2 + \Delta b^2 + \Delta L^2} \quad \dots(1)$$

Indeks Biru

Pengukuran nilai biru menggunakan data CIE lab mengacu pada nilai Indeks Biru (IB) (Cuomo *et al.*, 2023). Nilai biru diwujudkan sebagai indeks biru (b*) yang didefinisikan sebagai -b* (Persamaan 2). Semakin tinggi nilai indeks biru, maka warna biru semakin kuat.

$$IB = -(b) \quad \dots(2)$$

Pengukuran Kualitas Mikrobiologi Susu

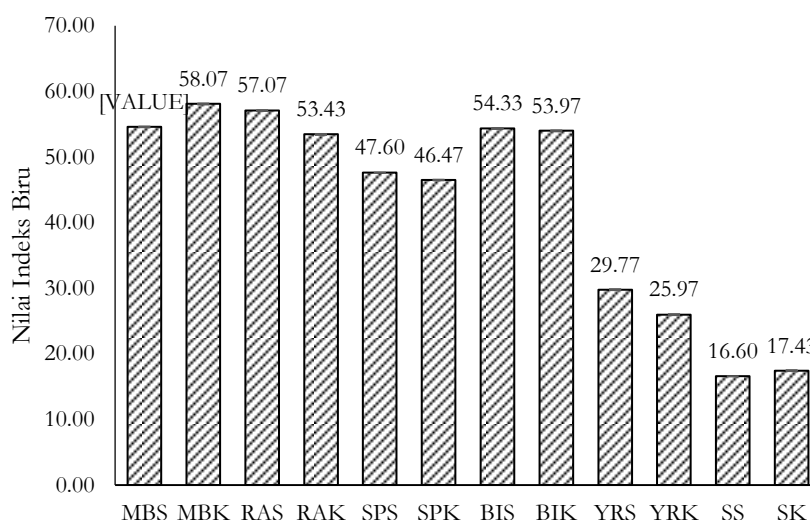
Kualitas mikrobiologi susu didasarkan reduksi/dekolorisasi warna biru berdasarkan satuan menit. Penilaian MBRT ini bersifat kualitatif. Penilaian kualitas susu dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kualitas susu metode MBRT (Alias *et al.*, 2020).

Time taken for decolorization	Milk Condition
5 hours and above	Excellent
3 – 4 hours	Good
1 – 2 hours	Fair
Less than ½ hours	Poor

3. Hasil dan Pembahasan

MBRT merupakan pengujian mikrobiologis pada susu dengan penilaian kualitatif sebagai evaluasinya. Prinsip MBRT yaitu aktivitas mikroorganisme pencemar pada susu yang mampu mereduksi warna yang dihasilkan oleh MB. Kualitas susu diidentifikasi berdasarkan perubahan warna yang diamati dalam jangka waktu tertentu. Kualitas susu ditentukan berdasarkan kecepatan warna biru berubah menjadi tidak berwarna. Penambahan obat ikan yang diduga mengandung MB menghasilkan perubahan warna biru pada susu steril dan terkontaminasi selama inkubasi.



Gambar 1. Nilai IB pada Observasi Menit ke-0

Tabel 2. Warna biru pada perlakuan menit ke-0

	Perlakuan											
	MBS	MBK	RAS	RAK	SPS	SPK	BIS	BIK	YRS	YRK	SS	SK
Warna												

MB dan obat biru yang diberikan pada susu memberikan warna biru dengan intensitas yang berbeda. Perbedaan tersebut terlihat pada tingkat kecerahan warna biru pada sampel yang diberikan terlihat seperti pada Gambar 1. SPS, SPK, YRS dan YRK memberikan warna yang berbeda dibandingkan perlakuan lain. Perbedaan tersebut dikonfirmasi pada nilai indeks ibu pada Tabel 2. Nilai SPS, SPK, YRS dan YRK bernilai lebih rendah dan semakin mendekati nilai 0 atau warna biru yang lebih pudar atau semakin menjauh dari warna biru.

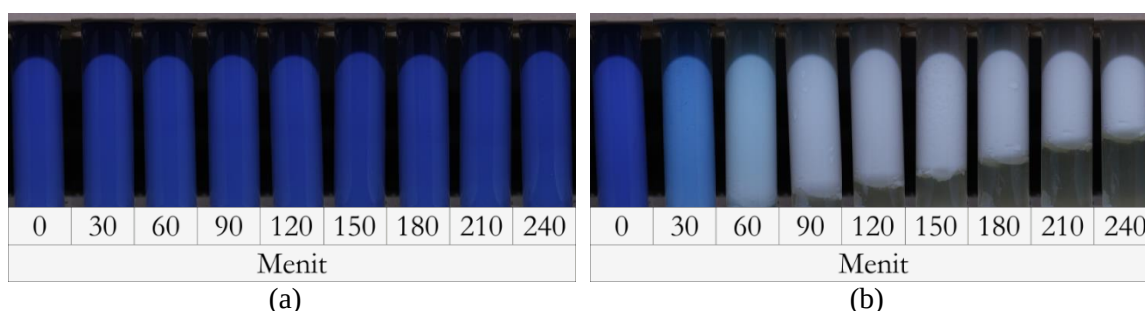
Perbedaan warna biru dapat diakibatkan konsentrasi MB atau senyawa berwarna biru yang terkandung di dalamnya. Berdasarkan komposisi yang terdapat pada label produk (Tabel 3), tidak dijelaskan secara detail konsentrasi kandungan MB. (Mariah et al., 2023) menunjukkan bahwa perbedaan konsentrasi MB memberikan perbedaan intensitas warna biru pada larutan. Perbedaan warna biru akibat konsentrasi dapat ditunjukkan melalui perbedaan absorbansi warna biru pada panjang gelombang 664 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Misran et al., 2018).

Tabel 3. Kandungan Bahan Obat Biru ikan pada Label Kemasan

No.	Nama Obat Biru	Komposisi Bahan pada Label Kemasan
1	Raid All (RA)	<i>Methylene Blue</i> BPC, <i>Acid Oxalate</i> , <i>Dimethyl Amino Triphenyl Methanol</i>
2	Sakkai Pro (SP)	<i>Methylene Blue</i> *
3	Blitz Icht (BI)	<i>Methylene Blue</i>
4	Yukari (YK)	<i>Methylene Blue</i> *

Keterangan: (*) kandungan tidak terdokumentasi pada label komposisi namun terdapat pada label kemasan produk.

Pengujian MBRT menggunakan sampel susu steril dan susu terkontaminasi. Susu terkontaminasi yang digunakan dalam kondisi tidak diketahui tingkat kontaminasinya. Ekspektasi performa susu terkontaminasi adalah terjadinya reduksi warna dari MB. Laju kecepatan perubahan warna tidak dibahas dalam penelitian ini.

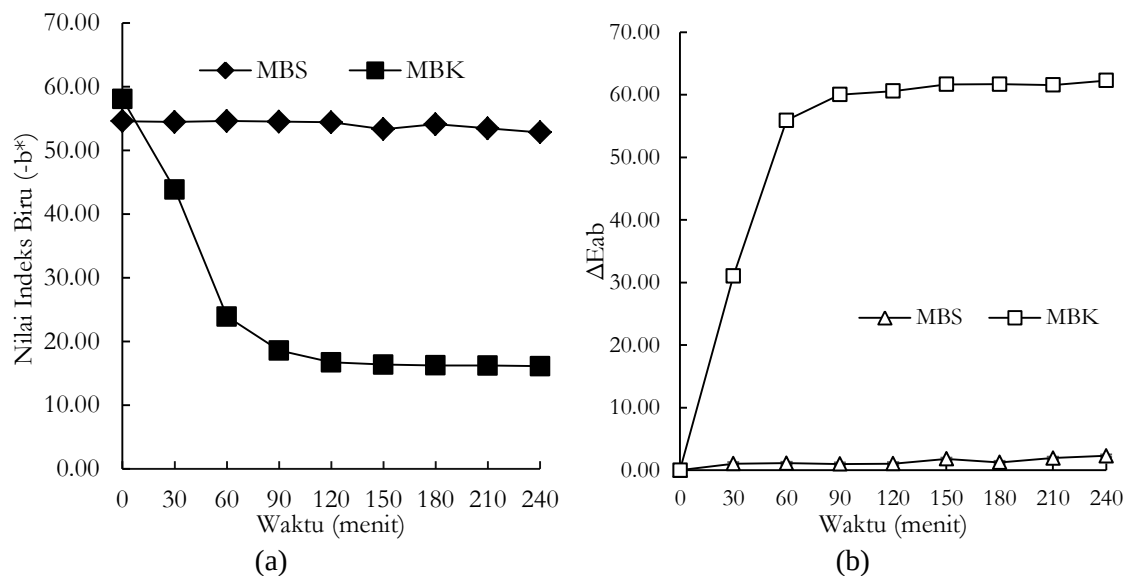


Gambar 2. Perubahan Warna Perlakuan MBS (a) dan MBK (b) Selama Inkubasi dari Menit ke-0 hingga ke-240.

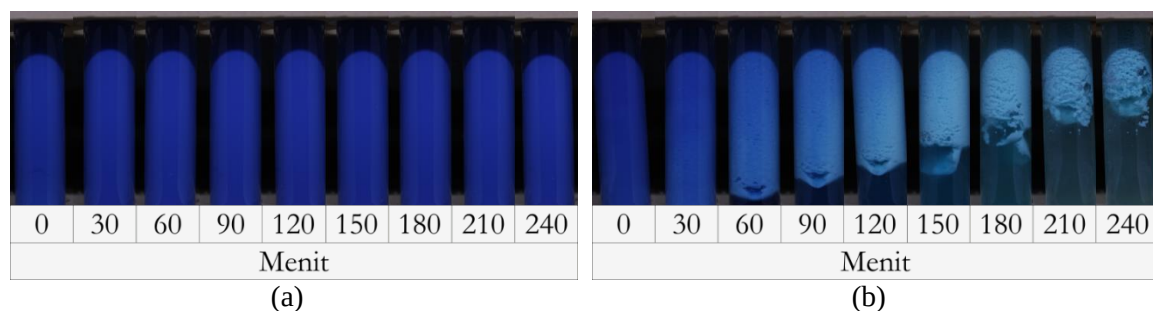
MBS dan MBK merupakan pengujian MBRT menggunakan MB *reagent grade*. Perubahan warna kedua perlakuan tersebut dari menit ke-0 hingga ke-240 dapat dilihat pada Gambar 2 (a) untuk MBS dan Gambar 2 (b) untuk MBK. Perlakuan MBS secara pengamatan tidak terjadi perubahan warna, sedangkan reduksi warna terjadi pada perlakuan MBK sejak pengamatan menit ke-30. Hasil pengukuran IB MBS dan MBK (Gambar 3 (a)) mengkonfirmasi hasil pengamatan manual. Nilai IB untuk MBS relatif stabil, sedangkan untuk MBK menunjukkan penurunan tajam sejak menit ke-30. Nilai ΔE_{ab} menunjukkan perbedaan warna secara terukur berdasarkan nilai CIE Lab. ΔE_{ab} MBS antara menit ke-0 dengan ke-30 adalah $1,04 \pm 0,23$ dan meningkat hingga $2,04 \pm 0,09$ pada menit ke-240. Nilai ΔE_{ab} MBK menit 0-30 yaitu $31,05 \pm 0,07$ sehingga mengkonfirmasi bahwa warna pada pengamatan kedua waktu ini adalah berbeda satu sama lain. Pengamatan lain yang didapati dari perlakuan ini yaitu terbentuknya gumpalan untuk MBK.

Perubahan warna terjadi pada perlakuan penggunaan obat ikan RA. Selama inkubasi 240 menit, perlakuan RAS terobservasi tidak terjadi perubahan warna (Gambar 4(a)). RAK terjadi perubahan warna sejak menit ke-30 (Gambar 4(b)). Nilai IB untuk RAS relatif stabil (Gambar 5(a)) di antara $57,07 \pm 0,06$ – $59,73 \pm 0,06$, sedangkan RAK menunjukkan penurunan pada menit ke-60 dari $57,10 \pm 0,00$ pada menit ke-30 menjadi $52,47 \pm 0,06$. Penurunan nilai berlanjut terjadi hingga akhir pengamatan. Pada menit ke-30, baik RAS maupun RAK mengalami peningkatan nilai IB. ΔE_{ab} RAS menunjukkan kestabilan hingga menit ke-240 sedangkan RAK menunjukkan peningkatan pada sejak menit ke-30. Nilai ΔE_{ab} MBS untuk menit ke 30 mencapai $6,95 \pm 0,12$ sehingga menunjukkan bahwa terjadi perbedaan warna apabila dilakukan pengamatan lebih jeli.

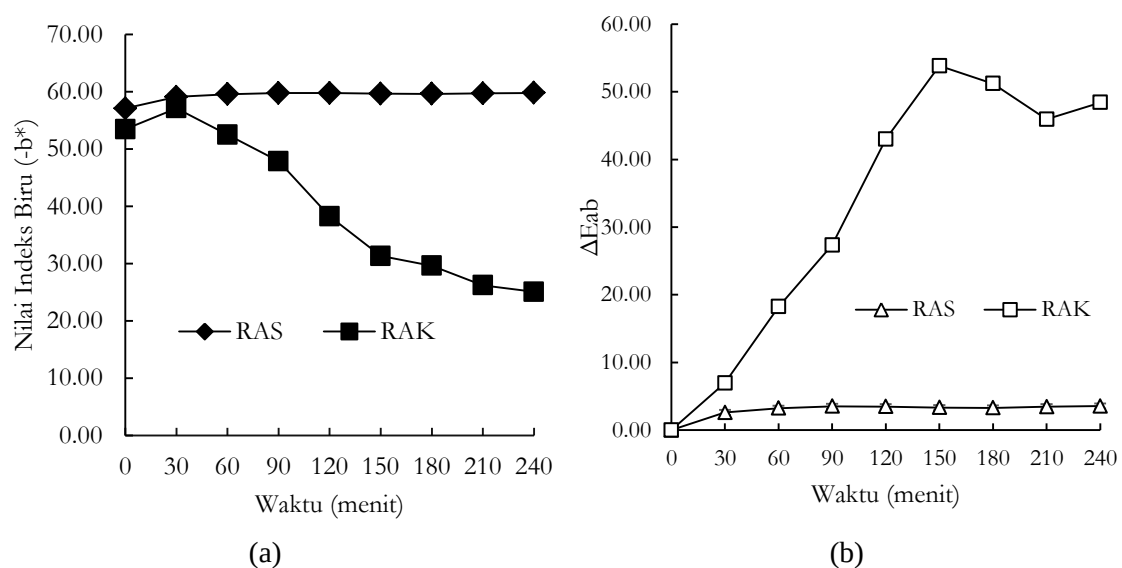
Nilai ΔE_{ab} RAS konsisten berada di antara $2,59 \pm 0,12 - 3,53 \pm 0,08$. Pengamatan pada RAK juga mengalami penggumpalan namun masih terdapat warna biru yang tersisa.



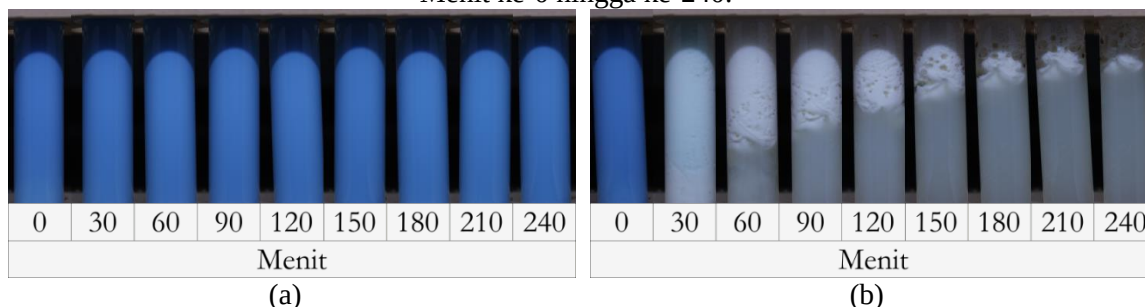
Gambar 3. Perubahan Nilai IB (a) dan ΔE_{ab} (b) Perlakuan MBS dan MBK Selama Inkubasi dari Menit ke-0 hingga ke-240.



Gambar 4. Perubahan Warna Perlakuan RAS (a) dan RAK (b) Selama Inkubasi dari menit ke-0 hingga ke-240.

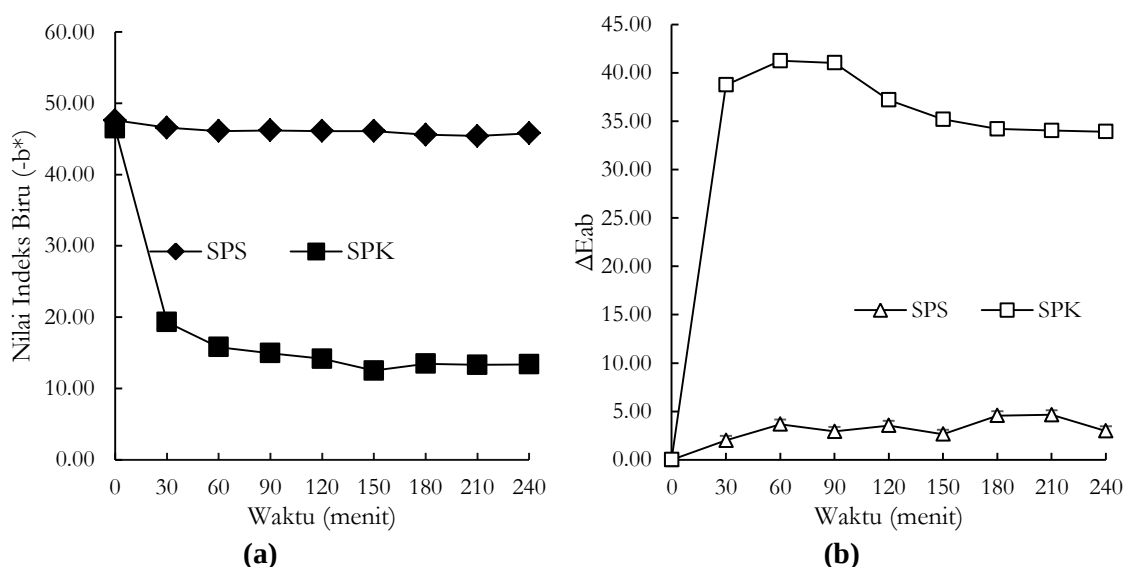


Gambar 5. Perubahan Nilai IB (a) dan ΔE_{ab} (b) Perlakuan RAS dan RAK Selama Inkubasi dari Menit ke-0 hingga ke-240.



Gambar 6. Perubahan Warna Perlakuan SPS (a) dan SPK (b) Selama Inkubasi dari Menit ke-0 hingga ke-240.

SP memberikan respon serupa dengan kedua perlakuan sebelumnya. Kestabilan warna biru ditunjukkan pada Gambar 6(a) untuk SPS, sedangkan perubahan warna ditunjukkan pada Gambar 6(b) yang dimulai pada menit ke-30. Perbedaan warna ini secara pengamatan manual sangat berbeda dengan menit ke-0 sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa kualitas susu tergolong buruk (*poor*). Kestabilan dan reduksi warna biru dikonfirmasi melalui grafik IB pada Gambar 7(a). Nilai IB SPS berkisar antara 45.40 ± 0.00 – 47.60 ± 0.00 . Reduksi ditunjukkan dengan penurunan IB pada SPK pada menit ke-30 menjadi 19.30 ± 0.00 dari 46.47 ± 0.06 . Perbedaan warna yang tampak pada SPK juga dikonfirmasi melalui nilai ΔE_{ab} 38.74 ± 0.07 pada menit ke-30 (Gambar 7(b)). Nilai SPS konsisten berkisar antara 2.00 ± 0.09 – 4.66 ± 0.06 . Pengumpulan juga terobservasi pada SPK.

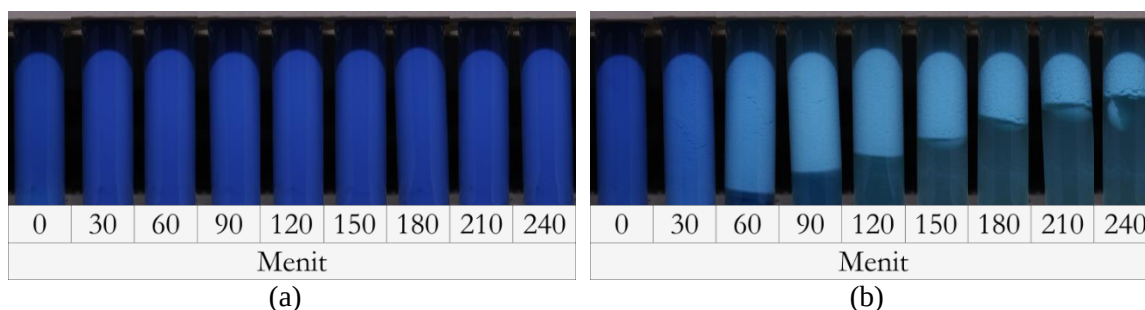


Gambar 7. Perubahan Nilai IB (a) dan ΔE_{ab} (b) Perlakuan SPS dan SPK Selama Inkubasi dari Menit ke-0 hingga ke-240.

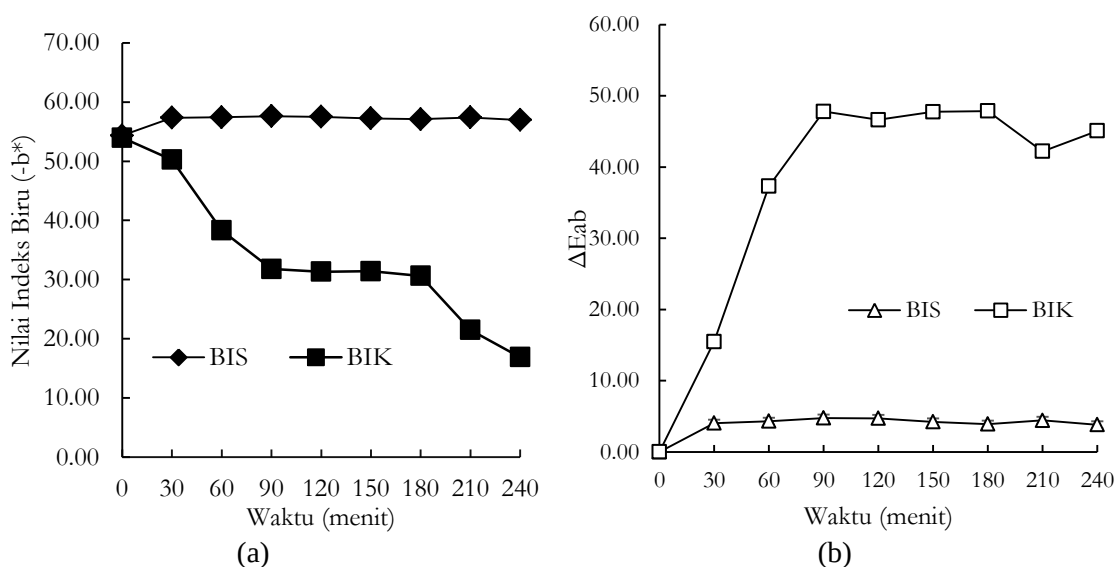
Obat ikan BI menunjukkan respon perubahan warna terhadap susu terkontaminasi dan mirip dengan RAK. BIS, menggunakan susu steril, menunjukkan kestabilan warna biru selama inkubasi 240 menit (Gambar 8(a)). Perubahan warna pada BIK ditunjukkan sejak menit ke-30. Selama inkubasi hingga menit ke-240 masih terdapat sisa-sisa warna biru (Gambar b(b)), hal ini juga ditunjukkan oleh perlakuan RAK sebelumnya. Kestabilan dan perubahan warna biru dikonfirmasi melalui grafik IB pada Gambar 9(a). Nilai IB untuk BIS konsisten berada pada

54,33±0,06 – 57,60±0,00, sedangkan BIK mengalami penurunan pada menit ke-30 dari 53,97±0,06 menjadi 50,27±0,06. Pada Gambar 9(b) nilai ΔE_{ab} pada menit ke-30 untuk BIK yaitu 15,48±0,10, hal ini mengindikasikan memang terdapat perbedaan warna antara menit ke-0 dengan ke-30. Nilai BIS berkisar antara 3,82±0,10 – 4,77±0,08. Penggumpalan teramati pada perlakuan BIK sejak menit ke-60.

Kenampakan obat ikan YR secara umum lebih muda dibandingkan perlakuan-perlakuan sebelumnya. Susu steril yang dikenakan YR (YRS) menunjukkan kestabilan warna. YRK menunjukkan reduksi warna biru sejak menit ke-30 (Gambar 10(a)). Kestabilan dan reduksi warna dikonfirmasi melalui perubahan nilai IB dan ΔE_{ab} . Nilai IB YRS konsisten berkisar antara 28,80±0,00 – 29,77±0,06. Nilai IB YRK mengalami penurunan pada menit ke-30 menjadi 16,40 ±0,00 dari 25,97 ±0,06 pada menit ke-0. Nilai ΔE_{ab} YRS konsisten berkisar antara 0,57±0,11 – 1,32±0,08. Nilai ΔE_{ab} YRK meningkat menjadi 11,82 ±0,06 pada menit ke-30 yang menunjukkan bahwa warna tersebut berbeda dengan warna pada menit ke-0. YRK menunjukkan penggumpalan selama inkubasi berlangsung.



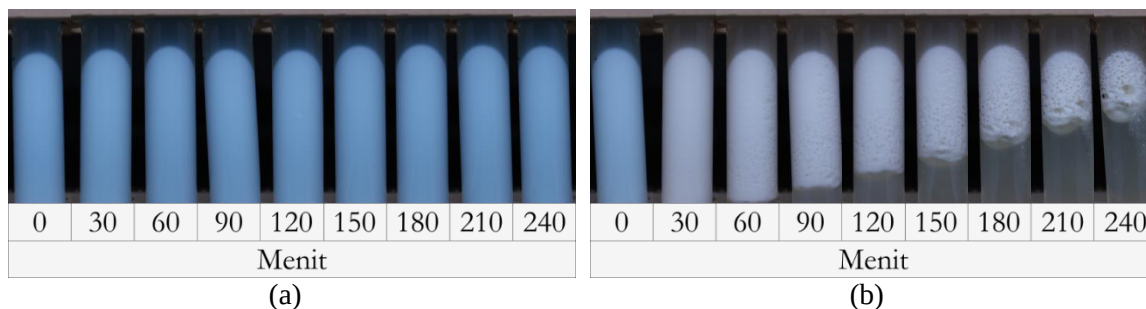
Gambar 8. Perubahan Warna Perlakuan BIS (a) dan BIK (b) Selama Inkubasi dari Menit ke-0 hingga ke-240.



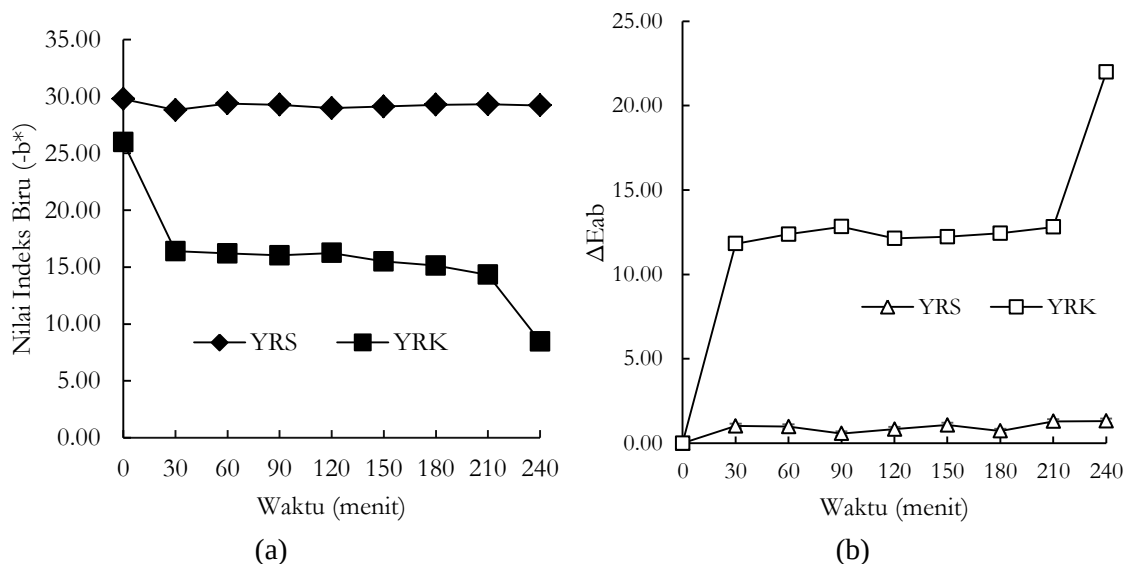
Gambar 9. Perubahan Nilai IB (a) dan ΔE_{ab} (b) Perlakuan BIS dan BIK Selama Inkubasi dari Menit ke-0 hingga ke-240.

SS dan SPK, merupakan susu steril dan susu terkontaminasi yang tidak ditambahkan dengan MB dan obat ikan. Kedua perlakuan ini digunakan sebagai pembanding perlakuan-perlakuan sebelumnya. Secara pengamatan manual, SS dan SK tidak terjadi perubahan warna (Gambar

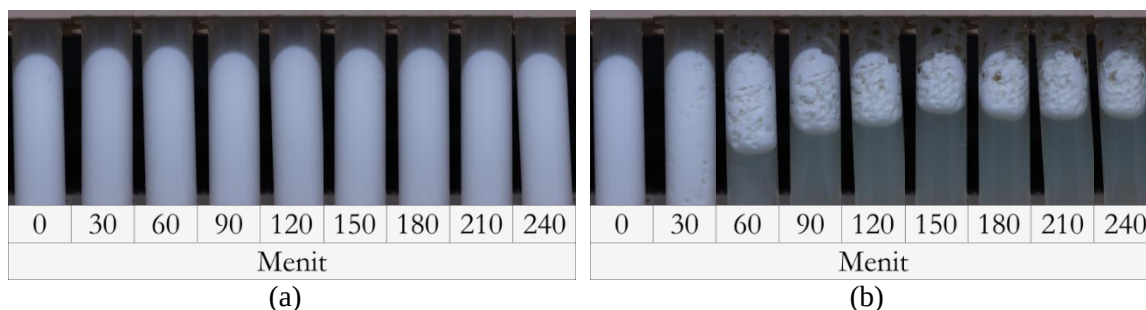
12). Pengukuran nilai IB dan ΔE_{ab} menunjukkan adanya perubahan nilai menurun dan meningkat untuk SK (Gambar 13). Nilai IB untuk SS stabil pada $16,30 \pm 0,00$ – $16,70 \pm 0,00$, sedangkan SK mengalami penurunan sejak menit ke-30 menjadi $15,97 \pm 0,06$ dari $17,43 \pm 0,06$. Nilai ΔE_{ab} SS menunjukkan kestabilan antara $0,36 \pm 0,10$ – $1,48 \pm 0,06$, sedangkan SK mengalami peningkatan antara $1,62 \pm 0,08$ - $22,07 \pm 1,33$.



Gambar 10. Perubahan Warna Perlakuan YKS (a) dan YKK (b) Selama Inkubasi dari Menit ke-0 hingga ke-240.



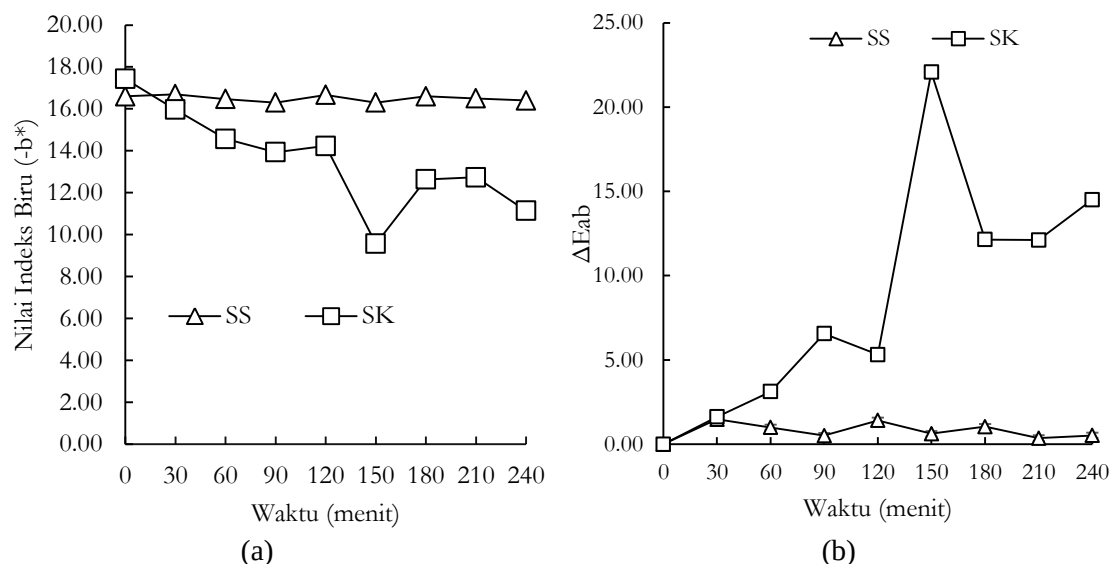
Gambar 11. Perubahan Nilai IB (a) dan ΔE_{ab} (b) Perlakuan YRS dan YRK Selama Inkubasi dari Menit ke-0 hingga ke-240.



Gambar 12. Perubahan Warna Perlakuan SS (a) dan SK (b) Selama Inkubasi dari Menit ke-0 hingga ke-240.

Secara umum seluruh perlakuan susu terkontaminasi (MBK, RAK, SPK, BIK dan YRK) memberikan respon perubahan warna biru atau tereduksi. Reduksi ini ditunjukkan melalui

pemudaran warna biru menjadi warna putih susu atau menjadi biru yang lebih muda dibandingkan waktu pengamatan sebelumnya. Pemudaran warna biru terjadi pada menit ke-30. Reaksi yang dihasilkan sesuai harapan yaitu berkualitas buruk (*poor*). Reduksi warna tersebut menunjukkan adanya aktivitas mikroba di dalamnya. Perlakuan susu steril tidak mengalami perubahan warna secara pengamatan manual. Kestabilan ini menunjukkan bahwa susu tersebut steril dan tidak terdapat pencemar yang berasal dari MB dan obat ikan.



Gambar 13. Perubahan Nilai IB (a) dan ΔE_{ab} (b) Perlakuan SS dan SK Selama Inkubasi dari Menit ke-0 hingga ke-240.

Beberapa penjelasan telah diusulkan dalam reduksi warna biru yang terjadi di dalam MBRT. Perubahan warna MB dalam MBRT merupakan kegiatan metabolisme mikroorganisme. Laju dekolorasi MB secara metabolisme oleh sel aktif berkorelasi dengan jumlah sel hidup (Nandy & Venkatesh, 2010). MB yang ada di susu terkontaminasi berubah menjadi bentuk tidak berwarna pada permukaan sel akibat aktivitas enzim *reductase* yang terdapat dalam membran sel (Bapat et al., 2006). Reaksi yang terjadi bukanlah degradasi MB melainkan perubahan bentuk MB menjadi tidak berwarna. Bentuk ini ditunjukkan dengan MB menjadi tidak bermuatan, lipofilik, dan memasuki sel secara difusi melalui membran plasma dan terasing di dalam sel (May et al., 2003). Ketika keberadaan oksigen meningkat maka MB yang tereduksi akan teroksidasi melalui sistem transport electron pada mitokondria sehingga warna biru MB akan muncul kembali (Nandy & Venkatesh, 2010). Menurut (Jenitta et al., 2014) penurunan MBRT paralel dengan penurunan *Oxygen Reduction Potential* (ORP). Menurut (Eltarahony et al., 2021) melalui kultur campuran khamir (*Rhodotula sp.*) dan bakteri (*Raoultella planticola* dan *Staphylococcus xylosus*), dikonfirmasi peningkatan aktivitas enzim interseluler *NADH-reductase*, *DCIP-reductase*, *azoreductase*, *laccase*, *nitrate reductase*, *LiP*, *MnP*, dan *tyrosinase* dalam mendegradasi MB. RAK dan BIK terjadi penggumpalan namun warna biru tidak tereduksi sempurna hingga akhir pengamatan. Diduga RAK dan BIK mengandung senyawa berwarna biru lain yang tidak dapat didegradasi oleh mikroba pencemar susu.

Penggumpalan hanya terjadi pada susu terkontaminasi (MBK, RAK, SPK, BIK dan YRK) diduga merupakan aktivitas mikroorganisme. Penggumpalan umumnya terjadi pada pengujian MBRT. Terdapat 4 jenis penggumpalan yang dapat terjadi selama MBRT, yaitu gumpalan padat/cairan homogen, gumpalan kental heterogen, gumpalan gas heterogen dan gumpalan gas kental heterogen (Pérez-Lomas et al., 2020).

Karakteristik penggumpalan yang terjadi pada pengujian MBRT yaitu tidak homogen. Gumpalan yang dihasilkan tidak kental. Gelembung udara terobservasi diantara gumpalan-gumpalan yang terbentuk. Warna gumpalan tidak menguning. Ciri-ciri tersebut sesuai dengan deksripsi tipe gumpalan gas heterogen (Pérez-Lomas *et al.*, 2020). Dugaan penyebab gumpalan yaitu keberadaan bakteri koliform dimana susu diperoleh dan disimpan pada kondisi kurang bersih atau tersimpan dalam suhu refrigrasi terlalu lama(Pérez-Lomas *et al.*, 2020).

Pengamatan dengan pengukuran digunakan bertujuan untuk mengkonfirmasi terjadi perbedaan warna. Perbedaan hasil pengamatan manual dengan pengukuran terjadi ketika hasil pengukuran bertolak belakang dengan hasil pengamatan manual. Contoh perbedaan nilai ini yaitu pada perlakuan steril (MBS, RAS, SPS, BIS, YRS dan SS) dimana secara pengamatan manual tidak terdapat perbedaan warna namun nilai IB dan ΔE_{ab} menunjukkan jarak perbedaan warna. Perbedaan ini umum terjadi apabila membandingkan hasil pengamatan instrumen dengan pengamatan manual karena secara umum pengamatan instrumen lebih sensitif dibandingkan pengamatan manusia. Menurut (Sharma, 2018) nilai $\Delta E_{ab} = 1$ didefinisikan sebagai just-noticeable difference (JND). Nilai ini merupakan ambang batas bagi pengamat terlatih yang menyadari terdapat perbedaan diantara 2 warna. Dalam setiap proses apapun, menghasilkan warna dengan toleransi nilai ΔE_{ab} kurang dari 2 secara konsisten dapat dianggap mustahil. Penilai atau pengamat warna secara umum menilai nilai ΔE_{ab} 3-6 masih dapat dianggap dapat diterima untuk menyimpulkan kedua warna dinyatakan sama.

Metode pengukuran warna dalam penelitian ini menggunakan pendekatan *image processing* atau *computer vision*. Menurut (Wu & Sun, 2013) sebagian dari seluruh keunggulan metode ini antara lain cepat, presisi, objektif, efisien, konsisten, non-destruktif biaya murah dan tidak ada perlakuan terhadap sampel; dan kemampuan menganalisa setiap pixel pada permukaan produk pangan, menganalisa warna dari aneka ragam bentuk baik serupa maupun tidak serupa, menganalisa warna yang tidak homogen dan memilih lokasi ekstraksi warna yang diinginkan. Kesulitan yang dihadapi dalam menggunakan metode ini yaitu (Wu & Sun, 2013) (1) kesulitan dalam memisahkan latar belakang gambar dengan obyek yang diamati dan obyek yang tumpang tindih, (2) kebutuhan kalibrasi dan pengaturan kamera yang teliti, serta pencahayaan yang baik dan konsisten dan terkendali, (3) variasi spektrum serta intensitas cahaya yang dihasilkan setiap bohlam lampu.

Kondisi pengambilan gambar juga dapat mempengaruhi hasil ekstraksi nilai CIE Lab. Warna dihasilkan dari cahaya yang jatuh dan pantulan cahaya dari benda-beda sekitar. Sehingga apabila kondisi pencahayaan berubah maka hasil CIE Lab yang terekstrak dari gambar akan berubah atau disebut dengan *consistency illumination* (Wu & Sun, 2013). Pengambilan gambar menggunakan peralatan kamera digital dan pencahayaan di dalam lightbox yang terkendali, namun ada kemungkinan faktor pencahayaan lain seperti lampu ruangan dan jendela serta pantulan dari obyek sekitar yang mempengaruhi warna ketika gambar diperoleh.

SS dan SK merupakan perlakuan tanpa penambahan MB dan obat ikan. Hasil pengukuran IB menunjukkan bahwa kedua perlakuan ini terukur memiliki warna biru. Hasil pengambilan gambar diperoleh bawah gambar yang diperoleh tidak sepenuhnya putih namun lebih gelap. Pengaturan kamera digital didasarkan kondisi exposure normal pada susu steril tanpa penambahan MB dan obat ikan. Sistem exposure pada kamera digital melibatkan tingkat abu-abu (*gray level*) atau tingkat kecerahan, terutama kamera yang menggunakan sistem warna RGB (Battiatio *et al.*, 2018), sehingga dimungkinkan bahwa warna gelap tersebut dihasilkan dari setting exposure pada kamera digital. Setting kamera digital yang digunakan menggunakan metode *spot metering* dan exposure normal atau *middle gray tone* pada susu. *Middle gray tone* berkorepondensi terhadap 18% pantulan warna abu-abu (Holm, 1996).

4. Kesimpulan

Warna biru yang dihasilkan pada susu akibat penambahan RA, SP, BI dan YR dapat direduksi oleh mikroba di dalam susu yang terkontaminasi. Di antara keempat obat ikan tersebut, SP dan YR berperilaku yang mirip dengan MB dikarenakan warna biru dapat tereduksi secara keseluruhan. RA dan BI meskipun warna biru tereduksi, yang dibuktikan dengan perubahan warna melalui pengamatan dan pengukuran, sebagian warna biru tidak dapat tereduksi hingga akhir pengamatan. SP dan YR memiliki potensi sebagai substitusi MB *reagent grade* berdasarkan perilakunya yang mirip dengan MB. Penelitian ini tidak menyarankan mengganti reagen yang khusus digunakan dalam analisis. Penelitian ini menunjukkan bahwa bahan-bahan komersil dapat digunakan sebagai alternatif apabila kondisi tidak memungkinkan memperoleh bahan-bahan kualitas reagen. Pengguna yang diharapkan dapat menggunakan metode ini antara lain perorangan, pengusaha, serta lembaga pendidikan yang belum memiliki akses memperoleh bahan kualitas reagen karena keterbatasan lokasi dan biaya.

5. Daftar Pustaka

- Ak, B., & Kaki, B. (2016). Color Distribution of The Gingiva Created by Color Schema Maker Software. *Eastern Journal Of Medicine*, 21(2), 69–74. <https://doi.org/10.5505/ejm.2016.32032>
- Alias, N., Mustapha, Z., Zakaria, A. J., Taib, W. R. W., Ahmad, A., Hussin, N., Zakaria, Z., Noor, S. N. M., & Yusoff, N. A. M. (2020). Microbiological Quality Evaluation of Goat Milk Supplemented with Different Napier Treatments. *Bioscience Research*, 17(3), 1599–1609.
- Anwer, S. S., Zaki, S. M., Rasul, S. A., Hassan, R. J., Ahmad, I. J., & Qader, A. J. (2018). Detection of Kids milk Quality using Methylene Blue Reduction test. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 3(4), 1450–1456. <https://doi.org/10.22161/ijeab/3.4.41>
- Bapat, P., Nandy, S. K., Wangikar, P., & Venkatesh, K. V. (2006). Quantification of metabolically active biomass using Methylene Blue dye Reduction Test (MBRT): Measurement of CFU in about 200 s. *Journal of Microbiological Methods*, 65(1), 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.06.010>
- Battiatto, S., Messina, G., & Castorina, A. (2018). Exposure Correction for Imaging Devices: An Overview. In R. Lukac (Ed.), *Single-Sensor Imaging* (1st ed., p. 28). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315219363>
- Susu Segar: SNI 3141.1:2011, (2011).
- Cuomo, F., Quiquero, M., Trivisonno, M. C., Angelicola, M., Messina, M. C., & Marconi, E. (2023). Mitigation of Maillard reaction in spaghetti by optimization of the drying conditions. *LWT*, 184, 114990. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114990>
- Eltarahony, M., El-Fakharany, E., Abu-Serie, M., ElKady, M., & Ibrahim, A. (2021). Statistical modeling of methylene blue degradation by yeast-bacteria consortium; optimization via agro-industrial waste, immobilization and application in real effluents. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 234. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01730-z>
- Hermawati, A. H., Hariyanto, H., & Husna, A. Z. (2021). Uji Reduksi Methylene Blue pada Susu Segar di Kelompok Peternak Sapi Perah Dusun Pabyongan Kabupaten Tulungagung. *Borneo Journal of Medical Laboratory Technology*, 4(1), 255–260. <https://doi.org/10.33084/bjmlt.v4i1.2954>
- Holm, J. (1996). The Photographic Sensitivity of Electronic Still Cameras. *Journal of The Society of Photographic Science and Technology of Japan*, 59(1), 117–131.

- <https://doi.org/10.11454/photogrst1964.59.117>
- Jenitta, M. B., Sherly, J., & Mohan, K. (2014). Studies on Microbial Quantity and Dissolved Oxygen Content of Raw Chilled Milk Samples Based on Methylene Blue Reduction Test and Oxidation Reduction Potential. *International Journal of Engineering and Technical Research*, 2(9).
- Mariah, M. A. A., Rovina, K., Vonnice, J. M., & Erna, K. H. (2023). Characterization of activated carbon from waste tea (*Camellia sinensis*) using chemical activation for removal of methylene blue and cadmium ions. *South African Journal of Chemical Engineering*, 44, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2023.01.007>
- May, J. M., Qu, Z., & Whitesell, R. R. (2003). Generation of oxidant stress in cultured endothelial cells by methylene blue: protective effects of glucose and ascorbic acid. *Biochemical Pharmacology*, 66(5), 777–784. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00408-8](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00408-8)
- Misran, E., Bani, O., Situmeang, E. M., & Purba, A. S. (2018). Removal efficiency of methylene blue using activated carbon from waste banana stem: Study on pH influence. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 122, 012085. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/122/1/012085>
- Nandy, S. K., & Venkatesh, K. (2014). Study of CFU for individual microorganisms in mixed cultures with a known ratio using MBRT. *AMB Express*, 4(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0038-7>
- Nandy, S. K., & Venkatesh, K. V. (2010). Application of methylene blue dye reduction test (MBRT) to determine growth and death rates of microorganisms. *African Journal of Microbiology Research*, 4, 061–070. <https://doi.org/10.5897/AJMR.9000097>
- Pérez-Lomas, M., Cuaran-Guerrero, M. J., Yépez-Vásquez, L., Pineda-Flores, H., Núñez-Pérez, J., Espin-Valladares, R., Recalde-Posso, E., Trujillo-Toledo, L. E., & Pais-Chanfrau, J. M. (2020). The extended methylene blue reduction test and milk quality. *Foods and Raw Materials*, 8(1), 140–148. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-1-140-148>
- Pertanian, P. D. dan S. I. (2022). *Outlook Komoditas Peternakan Susu* (A. A. Susanti & R. K. Putra W (eds.); 1st ed.). Kementerian Pertanian Republik Indonesia.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 664–698. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>
- Sharma, A. (2018). *Understanding Color Management*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119223702>
- Sipos, A. J., & Urakawa, H. (2016). Differential responses of nitrifying archaea and bacteria to methylene blue toxicity. *Letters in Applied Microbiology*, 62(2), 199–206. <https://doi.org/10.1111/lam.12534>
- Sitanggang, F. A., Machfoedz, M. M., & Falah, M. A. F. (2023). Comparison of Color Quality Measurement Using Chromameter and Image Processing for Dehydrated Strawberry Products. In *Proceedings of the 2nd International Conference for Smart Agriculture, Food, and Environment (ICSAFE 2021)* (pp. 4–17). Atlantis Press International BV. https://doi.org/10.2991/978-94-6463-090-9_2
- Wu, D., & Sun, D.-W. (2013). Colour measurements by computer vision for food quality control – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 29(1), 5–20. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.08.004>
- Zehra, Z., & Bashir, M. N. (2019). Color Fastness Grading System for Textile Industry Using CIEL*a*b Color Space. *2019 4th MEC International Conference on Big Data and Smart City (ICBDSC)*, 1–5. <https://doi.org/10.1109/ICBDSC.2019.8645600>