

Journal of Indonesian Medical Laboratory and Science

pISSN 2775-0108 | eISSN 2774-2504

ANGKA LEMPENG TOTAL, MOST PROBABLE NUMBER, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI COLIFORM PADA SUSU SAPI SEGAR DI KABUPATEN BANYUWANGI

Eka Yunita Wulandari¹

¹Teknologi Laboratorium Medik, STIKES Banyuwangi, Jawa Timur, Indonesia e-Mail: ekayunita@stikesbanyuwangi.ac.id

Abstract

Coliform bacteria are often found in Fresh cows milk due to their contamination to the environment, cattle feed and drinking, unsterilized equipment, and unaseptic milking processes. Banyuwangi is an area with several cattle farms and common consumption of raw cow milk. This study aimed to determine the total plate count (TPC), most probable number (MPN), and identification of coliform bacteria in raw cow milk in Kabupaten Banyuwangi. Analytical descriptive research was conducted on 30 samples of raw cow milk from 5 cattle farms in Kabupaten Banyuwangi between April and June 2021. The results showed that 7 (23.3%) samples in this study met the TPC requirement but 23 (76.7%) samples exceeded the TPC by SNI. In addition, 10 (33.3%) samples met the MPN requirements but 20 (66.7%) samples exceeded the MPN by SNI. It was concluded that most of fresh cows milk in Kabupaten Banyuwangi have not been eligible to consume due to high TPC, MPN and coliform contamination. Common coliform bacteria found in Fresh cows milk in Kabupaten Banyuwangi were Escherichia coli, Enterobacter sp., and Klebsiella sp., respectively. Further study was needed to identify coliform species and analyze other parameters of fresh cows milk in Kabupaten Banyuwangi according to SNI.

Keywords: Coliform, Most Probable Number, Raw Cow Milk, Total Plate Count

Abstrak

Kandungan bakteri coliform dalam susu sapi segar dapat diakibatkan oleh kontaminasi bakteri tersebut terhadap lingkungan, pakan dan minum sapi perah, peralatan yang tidak steril, serta proses pemerahan yang tidak aseptis. Banyuwangi merupakan daerah dengan beberapa peternakan sapi serta kebiasaan masyarakat mengonsumsi susu sapi segar. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan angka lempeng total (ALT), Most Probable Number (MPN), dan identifikasi bakteri coliform pada susu sapi segar di Kabupaten Banyuwangi. Penelitian deskriptif analitik dilakukan terhadap 30 sampel susu sapi segar dari 5 peternakan sapi di Kabupaten Banyuwangi antara bulan April dan Juni 2021. Hasil penelitian menunjukkan bahwa hanya 7 (23,3%) sampel dalam penelitian ini memenuhi syarat angka lempeng total SNI, sedangkan 23 (76,7%) sampel melebihi batas ALT maksimum SNI. Selain itu, 10 (33,3%) sampel memenuhi syarat MPN sedangkan 20 (66,7%) sampel melebihi batas MPN maksimum SNI. Dapat disimpulkan bahwa sebagian besar susu sapi segar di Kabupaten Banyuwangi masih belum aman dikonsumsi karena memiliki ALT, MPN, serta cemaran coliform yang tinggi. Bakteri coliform yang ditemukan pada susu sapi segar di Kabupaten Banyuwangi antara lain Escherichia coli, Enterobacter sp., dan Klebsiella sp. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk identifikasi spesies bakteri coliform serta menganalisis parameter pemeriksaan lainnya berdasarkan persyaratan SNI.

Kata Kunci: Angka Lempeng Total, Coliform, Most Probable Number, Susu Sapi Segar

PENDAHULUAN

Penyakit bawaan makanan (foodborne disease) masih menjadi ancaman di dunia global, baik di negara maju maupun negara berkembang, dengan perkiraan satu kasus gastroenteritis di antara enam orang di Amerika Serikat oleh Centers for Disease Control and Pervention (CDC) (Todd, 2020). Selain itu, WHO memperkirakan sebanyak 500 juta orang mengalami kondisi ini pada tahun 2010, dengan lebih dari 1 juta kematian di seluruh dunia (Nurmawati et al., 2019). Data Ditjen Pencegahan dan Pengendalian Penyakit Kemenkes RI menunjukkan bahwa terdapat 1.076.555 kasus diare di Provinsi Jawa Timur pada tahun 2020, mengindikasikan bahwa diare masih menjadi masalah serius di Indonesia (Kemenkes, 2021). Penyakit ini didefinisikan sebagai penyakit yang disebabkan oleh mikroba patogen atau produknya yang mencemari makanan dan minuman (Haskito et al., 2019). Sebagai salah satu produk ternak yang bergizi, susu dapat berkontribusi terhadap penyakit bawaan makanan karena potensi perkembangan mikroba di dalamnya jika kebersihan dan pengolahannya tidak dipantau secara hati-hati. Metode sterilisasi lanjutan seperti pasteurisasi merupakan salah satu upaya untuk mengatasi hal tersebut (Grace et al., 2020).

Konsumsi susu sapi segar masih menjadi tren khas di masyarakat, karena pola pikir konvensional yang mempercayai bahwa hanya dengan minum susu segar rasa dan manfaat terbaik akan didapatkan, proses sterilisasi merusak kualitas nutrisi, konsumsi susu segar merupakan upaya bijak untuk mempertahankan peternakan sapi perah lokal, dan sebagai kebiasaan untuk menjaga kesehatan tubuh (Adetunji et al., 2020). Aspek kesehatan susu sapi segar ditunjang oleh keberadaan bakteri *indigenous* dengan potensi probiotik, peran terhadap pertahanan tubuh dengan cara mencegah kolonisasi bakteri patogen, dan perannya yang menjanjikan dalam bidang industri susu (Nero & De Carvalho, 2019). Sudah banyak penelitian yang menemukan bakteri *coliform* dalam susu sapi segar akibat area kandang, pakan dan minum sapi, instrumen pemerahan, dan teknik pemerahan yang tidak memenuhi standar *hygiene* dan sanitasi (Salman & Hamad, 2011). Oleh karena itu, bakteri coliform seringkali digunakan menjadi indikator kebersihan produk makanan dan minuman dan

kontaminasi bakteri lainnya akibat sterilisasi yang kurang baik (Tominaga & Ishii, 2020). Bakteri coliform merupakan bakteri basil gram negatif, tidak membentuk spora, dan mampu memfermentasi laktosa (lactose fermenter) ditandai dengan produksi gas dan asam pada inkubasi dengan suhu 35oC. Kelompok bakteri ini terdiri dari genus Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, dan Citrobacter (Sengupta & Saha, 2013).

Pemerintah Indonesia menetapkan ketentuan mutu susu sapi segar yang harus dipenuhi untuk menjadikannya layak konsumsi. Hal ini dilakukan demi menjaga kesehatan masyarakat sebagai konsumen susu sapi segar. Salah satu ketentuannya diatur dalam SNI 3141.1:2011 yang menyatakan bahwa susu sapi segar yang layak konsumsi tidak boleh memiliki angka lempeng total melebihi 1x10⁶ CFU/ml (Badan Standarisasi Nasional, 2011). Banyak penelitian yang telah menunjukkan temuan bahwa susu sapi segar yang diperjualbelikan di beberapa daerah di Indonesia tidak memenuhi syarat mutu SNI. Santoso et al melaporkan bahwa angka lempeng total terendah pada sampel susu sapi segar dari 13 pedagang pengecer di Kota Semarang sebesar 3,5x10⁷ CFU/ml, dan indeks MPN coliform sebesar 40 - 2400 per ml yaitu melebihi batas maksimum angka lempeng total dan MPN coliform yang diatur oleh SNI sebesar 1x106 CFU/ml dan 2x10¹ MPN/ml. (Santoso et al., 2012). Suhailah dalam penelitiannya tahun 2018 juga menemukan bakteri coliform pada sampel susu sapi segar dari peternakan wilayut Sukodono Sidoarjo, sehingga mengindikasikan bahwa susu sapi segar yang diperjualbelikan masih belum memenuhi syarat SNI (Suhailah & Santoso, 2018).

Banyuwangi merupakan daerah dengan keberadaan beberapa peternakan sapi aktif serta konsumsi susu sapi segar yang masih umum dilakukan di masyarakat. Belum banyak penelitian yang dilakukan mengenai uji mikrobiologis susu sapi segar di Kabupaten Banyuwangi, serta belum ditemukan penelitian mengenai bakteri coliform pada susu sapi di Kabupaten Banyuwangi. Didasari oleh latar belakang di atas, penulis bertujuan untuk menganalisis angka lempeng total, indeks dan identifikasi bakteri *coliform* pada susu sapi segar di Kabupaten Banyuwangi.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif analitik dengan menggunakan 30 sampel susu sapi segar yang dikumpulkan dari 5 peternakan sapi yang berbeda di Kabupaten Banyuwangi antara bulan April dan Juni 2021. Pengambilan sampel dilakukan dengan metode random sampling. Angka lempeng total ditentukan melalui pengenceran berseri dengan larutan PZ dan media Nutrient Agar (Merck, Darmstadt, Germany). Sebanyak 5 tabung dan cawan petri steril disiapkan dan ke dalam semua tabung tersebut diisi dengan 9 mL larutan PZ. Sebanyak 1 mL sampel dipipet ke tabung pertama, sehingga total volume menjadi 10 mL dan terbentuk pengenceran 1:10 (10⁻¹). Larutan dihomogenkan dan 1 mL larutan dipindahkan secara aseptik dari tabung pertama ke tabung kedua, terbentuk pengenceran 1:100 (10⁻²). Langkah ini diulang secara berurutan sampai terbentuk pengenceran 1:100.000 (10⁻⁵). Sebanyak 1 mL sampel pada masing-masing tabung dengan pengenceran tertentu dipipet ke dalam masing-masing cawan petri steril sebelum dilakukan pemindahan media NA secara aseptik menggunakan metode tuang (pour plate) (Aria Suzanni et al., 2021).

Indeks MPN ditentukan melalui tiga tahap, yaitu tahap pendahuluan (presumptive test), tahap konfirmasi (confirmed test), dan tahap kelengkapan (completed test). Pada tahap pendahuluan, sampel susu yang telah diencerkan ditambahkan ke dalam media Lactose Broth (LB) (Merck, Darmstadt, Jerman) dalam tabung dan tabung durham dimasukkan secara terbalik ke dalamnya. Sampel diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C; produksi gas dan kekeruhan setelah masa inkubasi dicatat sebagai hasil positif. Hasil positif pada tahap pendahuluan ditindaklanjuti dengan tahap konfirmasi dimana sampel yang telah diencerkan ditambahkan ke dalam media Brilliant Green Lactose Broth (BGLB) (Merck, Darmstadt, Jerman) dalam tabung dan tabung durham secara terbalik dimasukkan ke dalamnya. Sampel diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C; produksi gas dan kekeruhan setelah masa inkubasi dicatat sebagai hasil positif. Jumlah tabung yang memberikan hasil positif dicatat dan total bakteri koliform diinterpretasikan dengan membandingkan hasil yang diperoleh dalam penelitian

ini dengan tabel MPN standar (Kumalasari et al., 2018).

Pada tahap kelengkapan, media BGLB yang berisi sampel yang menunjukkan hasil positif diinokulasikan pada media Eosin Methylene Blue (EMB) (Merck, Darmstadt, Jerman) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C. Koloni yang tumbuh pada EMB diwarnai dengan pewarnaan Gram. Temuan bakteri gram negatif pada pengamatan mikroskopis menandakan keberadaan positif bakteri coliform dalam sampel.

Identifikasi bakteri coliform pada penelitian ini dilakukan melalui uji biokimia menggunakan beberapa media yang terdiri dari Triple Sugar Iron Agar (TSIA) (HiMedia, Mumbai, India), Simmon's Citrate (SC) (HiMedia, Mumbai, India), Methyl Red-Voges Proskauer (MRVP) (HiMedia, Mumbai, India), Buffered Peptone Water (BPW) (Merck, Darmstadt, Jerman). Beberapa reagen juga digunakan untuk membantu identifikasi genus bakteri coliform dalam penelitian ini, seperti reagen Indol KOVAC (HiMedia, Mumbai, India), KOH 40% (Arkitos Chemicals, Surabaya Indonesia), Methyl Red 1% w/v (Merck, Darmstadt, Jerman), Alpha Naphtol 5% b/v (Merck, Darmstadt, Jerman). Tahap identifikasi diawali dengan inokulasi koloni yang ditumbuhkan pada media EMB ke TSIA, MRVP, SC, dan BPW dilanjutkan dengan inkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C. Setelah masa inkubasi, dicatat hasil pada media TSIA dan SC, ditambahkan Methyl Red 1% b/v ke dalam media MR, Alpha Naphtol 5% b/v dan KOH 40% b/v ditambahkan ke media VP, sedangkan pereaksi Indole KOVAC ditambahkan ke BPW sebagai uji Indol (Sari et al., 2019). Hasil perhitungan angka lempeng total, indeks MPN, dan identifikasi bakteri coliform pada penelitian ini dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam tabel.

HASIL

Di antara 30 sampel susu sapi segar dalam penelitian ini, 16 (53,3%) sampel menunjukkan angka lempeng total yang tinggi dan dilaporkan sebagai Terlalu Banyak Untuk Dihitung (TBUD) (Tabel 1). Beberapa referensi menyebutkan bahwa TBUD digunakan untuk menyatakan kontaminasi bakteri > 300 CFU/petri (Sutton, 2011). Pertumbuhan koloni pada pemeriksaan ALT dapat dilihat pada

Gambar 1.

Tabel 1. Hasil Perhitungan Angka Lempeng Total

10-1	Sampel		Koloni d	Angka lempeng total			
2 TBUD TBUD 51 0 0 5,1 x 10 ⁴ 3 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 4 TBUD 73 11 1 0 7,3 x 10 ³ 5 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 6 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 7 TBUD 173 104 28 25 2,9 x 10 ⁶ 8 TBUD TBUD 153 63 17 7,8 x 10 ⁵ 9 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 10 283 229 165 135 93 1.1 x 10 ⁷ 11 28 0 0 0 28 12 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 13 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 15		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	(CFU/ml)
3 TBUD TB	1	TBUD	69	13	3	1	$6,9 \times 10^3$
4 TBUD 73 11 1 0 7,3 x 10³ 5 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 6 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 7 TBUD 173 104 28 25 2,9 x 106 8 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 9 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 10 283 229 165 135 93 1.1 x 107 11 28 0 0 0 0 28 12 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 13 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 14 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 15 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 16 TB	2	TBUD	TBUD	51	0	0	5,1 x 10 ⁴
5 TBUD TB	3	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD
6 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 7 TBUD 173 104 28 25 2,9 x 106 8 TBUD TBUD 153 63 17 7,8 x 105 9 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 10 283 229 165 135 93 1.1 x 107 11 28 0 0 0 0 28 12 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 13 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 14 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 15 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 16 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 18 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD	4	TBUD	73	11	1	0	$7,3 \times 10^3$
7 TBUD 173 104 28 25 2,9 x 106 8 TBUD TBUD 153 63 17 7,8 x 105 9 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 10 283 229 165 135 93 1.1 x 107 11 28 0 0 0 0 28 12 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 13 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 14 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 15 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 16 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 17 279 196 73 23 3 9.2 x 104 18 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 19 <t< td=""><td>5</td><td>TBUD</td><td>TBUD</td><td>TBUD</td><td>TBUD</td><td>TBUD</td><td>TBUD</td></t<>	5	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD
8 TBUD TBUD 153 63 17 7,8 x 10 ⁵ 9 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 10 283 229 165 135 93 1.1 x 10 ⁷ 11 28 0 0 0 0 28 12 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 13 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 14 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 15 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 16 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 17 279 196 73 23 3 9.2 x 10 ⁴ 18 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 19 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 20	6	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD
9 TBUD TB	7	TBUD	173	104	28	25	2,9 x 10 ⁶
10 283 229 165 135 93 1.1 x 107 11 28 0 0 0 0 28 12 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 13 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 14 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 15 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 16 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 17 279 196 73 23 3 9.2 x 104 18 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 19 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 20 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 21 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD	8	TBUD	TBUD	153	63	17	7,8 x 10 ⁵
11 28 0 0 0 0 28 12 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 13 TBUD TBUD TBUD TBUD 114 1,1 x 10 ⁷ 14 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 15 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 16 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 17 279 196 73 23 3 9.2 x 10 ⁴ 18 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 19 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 20 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 21 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 22 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD	9	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD
12 TBUD T	10	283	229	165	135	93	1.1 x 10 ⁷
13 TBUD T	11	28	0	0	0	0	28
14 TBUD T	12	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD
15 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 16 TBUD TBUD TBUD TBUD 267 2,7 x 107 17 279 196 73 23 3 9.2 x 104 18 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 19 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 20 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 21 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 22 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 24 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 25 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 26 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 27 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD	13	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	114	1,1 x 10 ⁷
16 TBUD TBUD TBUD TBUD 267 2,7 x 10 ⁷ 17 279 196 73 23 3 9.2 x 10 ⁴ 18 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 19 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 20 TBUD TBUD BUD TBUD TBUD TBUD 21 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 22 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 23 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 24 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 25 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 26 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 28 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD	14	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD
17 279 196 73 23 3 9.2 x 10 ⁴ 18 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 19 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 20 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 21 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 22 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 23 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 24 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 25 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 26 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 28 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 29 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD	15	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD
18 TBUD T	16	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	267	$2,7 \times 10^7$
19 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 20 TBUD TBUD 86 75 59 6,7 x 10 ⁶ 21 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 22 TBUD TBUD TBUD 141 1,4 x 10 ⁷ 23 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 24 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 25 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 26 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 27 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 28 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 29 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD	17	279	196	73	23	3	9.2 x 10 ⁴
20 TBUD TBUD 86 75 59 6,7 x 10 ⁶ 21 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 22 TBUD TBUD TBUD 141 1,4 x 10 ⁷ 23 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 24 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 25 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 26 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 27 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 28 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 29 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD	18	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD
21 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 22 TBUD TBUD TBUD TBUD 141 1,4 x 10 ⁷ 23 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 24 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 25 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 26 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 27 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 28 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 29 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD	19	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD
22 TBUD TBUD TBUD TBUD 141 1,4 x 10 ⁷ 23 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 24 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 25 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 26 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 27 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 28 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 29 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD	20	TBUD	TBUD	86	75	59	6,7 x 10 ⁶
TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD	21	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD
24TBUDTBUDTBUDTBUDTBUD25TBUDTBUDTBUD73107,3 x 10526TBUDTBUDTBUDTBUDTBUD27TBUDTBUDTBUDTBUDTBUD28TBUDTBUDTBUDTBUDTBUD29TBUDTBUDTBUDTBUDTBUD	22	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	141	1,4 x 10 ⁷
25 TBUD TBUD TBUD 73 10 7,3 x 10 ⁵ 26 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 27 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 28 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 29 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD	23	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD
26TBUDTBUDTBUDTBUDTBUD27TBUDTBUDTBUDTBUDTBUD28TBUDTBUDTBUDTBUDTBUD29TBUDTBUDTBUDTBUDTBUD	24	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD
27TBUDTBUDTBUDTBUDTBUD28TBUDTBUDTBUDTBUDTBUD29TBUDTBUDTBUDTBUDTBUD	25	TBUD	TBUD	TBUD	73	10	7,3 x 10 ⁵
28 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD 29 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD	26	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD
29 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD	27	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD
	28	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD
30 TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD TBUD	29	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD
	30	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD



Gambar 1. Pertumbuhan koloni pada pemeriksaan ALT

Hasil uji MPN pada penelitian ini menunjukkan bahwa 9 (30%) dari 30 sampel memiliki indeks MPN tertinggi >1.100 per ml sampel. Namun, 10 (33%) dari 30 sampel memiliki Indeks MPN 0 per ml sampel terendah, yang menunjukkan tidak adanya bakteri *coliform* dalam sampel ini (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil Perhitungan Indeks MPN

Sampol	Jumlah tabung dengan hasil positif			Indeks MPN	Sampel	Jumlal h	Indeks		
Sampel	0,1 ml	0,01 ml	0,001 ml			0,1 ml	0,01 ml	0,001 ml	MPN
1	3	3	1	460	16	3	3	3	>1.100
2	3	1	2	120	17	3	3	3	>1.100
3	2	2	1	28	18	3	3	3	>1.100
4	3	3	2	1.100	19	3	3	3	>1.100
5	3	3	1	460	20	3	3	3	>1.100
6	3	3	0	240	21	0	0	0	0
7	3	3	1	460	22	0	0	0	0
8	3	3	2	1.100	23	0	0	0	0
9	3	3	3	>1.100	24	0	0	0	0
10	3	3	3	>1.100	25	0	0	0	0
11	3	2	3	290	26	0	1	0	3
12	3	3	3	>1.100	27	0	0	1	3
13	0	0	0	0	28	0	0	0	0
14	0	0	0	0	29	0	0	0	0
15	3	3	3	>1.100	30	0	0	0	0

Uji biokimia menggunakan media TSIA, Indol, MR, VP, SC hanya dilakukan pada 20 (67%) sampel dengan hasil MPN positif untuk mengidentifikasi lebih lanjut genus dari bakteri *coliform* yang mengontaminasi sampel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *E. coli* merupakan bakteri terbanyak yang

ditemukan pada penelitian ini, yaitu pada 11 (36,7%) sampel. Hal ini ditandai dengan warna hijau metalik pada media EMB, warna kuning pada dasar dan lereng TSIA, produksi H_2S negatif tetapi produksi gas positif pada TSIA, indol positif, MR negatif, VP positif dan hasil positif pada media SC.

Bakteri *Enterobacter sp.* ditemukan pada 5 (17%) sampel yang ditandai dengan warna kuning pada dasar dan lereng TSIA, produksi H₂S negatif tetapi produksi gas positif pada TSIA, Indol positif, MR negatif, VP negatif, dan hasil positif pada media SC. Bakteri *coliform* yang paling sedikit ditemukan pada penelitian ini adalah *Klebsiella sp.* yaitu pada 4 (13,3%) sampel; hal ini ditandai dengan warna merah pada dasar dan lereng TSIA, produksi H₂S negatif dan produksi gas pada TSIA, indol positif, MR dan VP negatif, dan hasil positif pada media SC.

Tabel 3. Hasil Identifikasi Bakteri Coliform

		TSIA	. 11as	it luell	LIIINasi	Danti	-11 (JUIOII	11	
Campal		اماما	мр	VD	SC	Daletani				
Sampel	Dasar	Lereng	H₂S	Gas	Indol	MR	VP	3C	Bakteri	
1	Α	Α	-	+	+	-	-	+	Enterobacter sp.	
2	K	K	-	-	+	-	-	+	Klebsiella sp.	
3	Α	K	-	+	+	-	-	-	E. coli	
4	Α	Α	-	+	+	-	+	+	Enterobacter sp.	
5	Α	Α	-	+	+	-	+	-	E. coli	
6	Α	K	-	+	+	-	-	-	E. coli	
7	Α	K	-	+	+	-	-	-	E. coli	
8	Α	K	-	+	+	-	-	-	E. coli	
9	Α	Α	-	+	+	-	-	+	Enterobacter sp.	
10	Α	Α	-	+	+	-	+	+	Enterobacter sp.	
11	K	K	-	-	+	-	+	+	Klebsiella sp.	
12	Α	K	-	+	+	-	-	-	E. coli	
13				Tidak	dilakuka	an uji l	oiokim	nia		
14				Tidak	dilakuka	an uji l	oiokim	nia		
15	K	K	-	-	+	-	+	+	Klebsiella sp.	
16	Α	K	-	+	+	-	-	-	E. coli	
17	K	K	-	+	-	-	+	+	Klebsiella sp.	
18	Α	K	-	+	+	-	-	-	E. coli	
19	Α	K	-	+	-	+	+	-	E. coli	
20	Α	Α	+	+	+	+	+	-	E. coli	
21				Tidak	dilakuka	an uji l	oiokim	nia		
22				Tidak	dilakuka	an uji l	biokim	nia		
23				Tidak	dilakuka	an uji l	oiokim	nia		
24				Tidak	dilakuka	an uji l	biokim	nia		
25					dilakuka					
26	Α	K	-	+	+	-	-	-	E. coli	
27	Α	Α	-	+	-	+	+	+	Enterobacter sp.	
28				Tidak	dilakuka	an uji l	oiokim	nia	1	
29					dilakuka					
30					dilakuka					

DISKUSI

Mengacu pada SNI 3141.1:2011, batas angka lempeng total maksimum yang diperbolehkan pada susu sapi segar adalah 1x10°CFU/ml yang menunjukkan total cemaran bakteri pada sampel. Hanya 7 (23,3%) sampel dalam penelitian ini yang memenuhi syarat. Selain itu, sebagian besar (56,7%) sampel dalam penelitian ini menunjukkan hasil Terlalu Banyak Untuk Dihitung (TBUD) pada pemeriksaan angka lempeng total (Tabel 1) yang menunjukkan kualitas sampel yang kurang baik sehingga tidak layak untuk dikonsumsi. Hal ini sesuai dengan penelitian oleh (Pramesthi & Hari, 2015) yang menunjukkan bahwa susu segar di Peternakan Mulyorejo Semarang memiliki rata - rata angka lempeng total sebesar 3,15x10°CFU/mL sehingga belum memenuhi standar mutu SNI.

Coliform dengan batas maksimum 2x10¹ koloni/mL yang dianalisis dengan metode MPN merupakan salah satu baku mutu mikrobiologis susu sapi segar yang dipersyaratkan oleh SNI 7388: 2009. Penelitian ini menemukan bahwa hanya 10 (33%) sampel dalam penelitian ini yang memenuhi kriteria SNI tersebut dan bakteri *coliform* ditemukan pada 20 (67%) sampel dalam penelitian ini. Temuan ini sejalan dengan studi oleh (Kusumaningsih & Ariyanti, 2013) yang menunjukkan bahwa sebanyak 33 dari 34 (97,06%) susu sapi segar di sentra peternakan sapi perah di Cibungbulang, Bogor melebihi batas maksimum MPN SNI.

Penelitian ini menemukan kontaminasi *E. coli* terbanyak pada susu sapi segar, yaitu pada 11 (36,7%) sampel. Temuan ini sesuai dengan penelitian (Pradika et al., 2019) yang menemukan *E. coli* pada 31,3% sampel susu sapi segar di salah satu peternakan sapi di Kabupaten Banyuwangi. Selain berperan penting sebagai flora normal di usus hewan normal, *E. coli* adalah agen penyebab paling umum untuk penyakit bawaan makanan. Konsumsi produk susu segar merupakan salah satu kondisi yang ideal untuk penularan bakteri ini karena sifatnya yang labil terhadap panas, selain itu kontaminasi bakteri ini juga didukung oleh beberapa faktor virulensi seperti *Shiga-like toxin* yang memicu diare berdarah, gen Intimin yang memediasi perlekatan sel-sel usus inang, dan fimbriae untuk memfasilitasi kolonisasi bakteri yang cepat

(Abebe et al., 2020).

Penelitian ini menemukan kontaminasi *Enterobacter sp.* pada 5 (17%) sampel, sesuai dengan penelitian (Mokadem et al., 2020) yang menemukan *Enterobacter sp.* pada 15% sampel susu sapi segar, dengan spesies yang paling banyak teridentifikasi adalah *Enterobacter aerogenes*. Studi lain oleh (Younis et al., 2017) di Mesir menemukan *E. aerogenes*, *E. agglomerans* dan *E. cloacae* di antara 100 susu segar yang dikumpulkan dari sapi yang terinfeksi mastitis subklinis. Habitat alami *Enterobacter sp.* adalah tanah dan air, sehingga memungkinkan bakteri untuk saling berinteraksi dengan atau menginfeksi tanaman. Selain itu, *Enterobacter sp.* dikenal karena perannya sebagai flora normal usus, meskipun memiliki kemampuan yang besar untuk menyebabkan wabah rumah sakit di antara pasien rawat inap dengan keadaan *immunocompromised. E. aerogenes* dan *E. cloacae* adalah dua spesies dari genus *Enterobacter* yang dilaporkan sebagai spesies yang paling umum. ditemukan dalam sampel klinis (Davin-Regli et al., 2019).

Klebsiella sp. merupakan bakteri yang paling sedikit ditemukan pada penelitian ini, yaitu hanya pada 4 (13,3%) sampel susu, sesuai dengan penelitian (Yang et al., 2021) yang mendeteksi Klebsiella sp pada 9,78% sampel susu di Provinsi Jiangsu dan Shandong, China. Di antara spesies Klebsiella, K. pneumoniae adalah bakteri yang paling umum dan berkorelasi positif dengan mastitis klinis susu. Selain K. pneumoniae, K. oxytoca juga dikenal karena patogenisitasnya yang menyebabkan mastitis klinis pada sapi yang ditandai dengan produksi susu yang sangat berkurang. Meskipun patogenesisnya masih belum diketahui dengan pastii, beberapa faktor virulensi seperti magA (penentu kemampuan bakteri untuk membentuk filamen mukosa), uge, gen (mengkodekan kapsul dan struktur dinding antigenik) dan gen rmpA (penentu sifat mukoid) diduga berperan dalam patogenisitas bakteri (Massé et al., 2020).

Bakteri coliform dalam jumlah yang tinggi di dalam makanan atau minuman berpotensi menyebabkan masalah pencernaan, yaitu gastroenteritis atau diare akibat toksin yang dihasilkannya (Muthaz et al., 2017) (Saputri & Efendy, 2020).

Data Dinas Kesehatan Banyuwangi menunjukkan bahwa terjadi peningkatan jumlah kasus diare dari tahun 2018 yakni sebanyak 32.098 kasus menjadi 33.041

kasus pada tahun 2019. Meski belum diketahui penyebab tingginya kasus diare tersebut, konsumsi susu sapi segar yang terkontaminasi bakteri *coliform* merupakan hal yang mungkin menjadi penyebab, mengingat Kabupaten Banyuwangi memiliki beberapa peternakan sapi perah dengan tingkat jual beli susu sapi segar yang tinggi.

Kandungan bakteri coliform pada susu sapi segar dapat disebabkan oleh peralatan kebersihan peralatan pemerahan, wadah penampung susu, proses pemerahan, dan tangan pemerah susu yang tidak bersih atau higienis. Tidak adanya proses sterilisasi setelah pemerahan juga menjadi faktor yang memudahkan kontaminasi bakteri (Asfidoajani & Sichani, 2018).

Penulis menyarankan agar peternak lebih memperhatikan *hygine* dan kesehatan hewan, lingkungan ternak, dan metode sterilisasi yang digunakan. Masyarakat sebagai konsumen utama susu sapi segar perlu meningkatkan wawasan mengenai bahaya mengonsumsi susu sapi segar yang terkontaminasi. Hal ini tidak lepas dari peran pemerintah untuk sosialisasi syarat mutu susu sapi segar yang perlu dipenuhi peternak agar dapat dihasilkan susu sapi yang layak dikonsumsi oleh masyarakat.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa hanya 7 (23,3%) sampel dalam penelitian ini memenuhi syarat angka lempeng total SNI, sedangkan 23 (76,7%) melebihi batas angka lempeng total maksimum SNI. Selain itu, 10 (33,3%) sampel memenuhi syarat MPN sedangkan 20 (66,7%) sampel melebihi batas MPN maksimum susu sapi segar SNI. Dapat disimpulkan bahwa sebagian besar susu sapi segar di Kabupaten Banyuwangi masih belum aman dikonsumsi karena masih melebihi batas maksimum ALT dan MPN yang dipersyaratkan SNI, serta karena masih mengandung bakteri coliform dengan spesies yang terbanyak ditemukan berturut - turut adalah *E. coli, Enterobacter sp.*, dan *Klebsiella sp.* Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk identifikasi spesies bakteri *coliform* serta melakukan parameter pemeriksaan lainnya

sebagai bentuk uji kualitas susu sapi segar di Kabupaten Banyuwangi berdasarkan persyaratan mutu SNI.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Banyuwangi atas sarana dan prasarana yang mendukung pelaksanaan penelitian ini.

KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis menyatakan bahwa tidak ada konflik kepentingan dalam penelitian ini.

REFRENSI

- Abebe, E., Gugsa, G., & Ahmed, M. (2020). Review on Major Food-Borne Zoonotic Bacterial Pathogens. Journal of Tropical Medicine, 2020, 1-19. https://doi.org/10.1155/2020/4674235.
- Adetunji, S. A., Ramirez, G., Ficht, A. R., Perez, L., Foster, M. J., & Arenas-Gamboa, A. M. (2020). Building the Evidence Base for the Prevention of Raw Milk-Acquired Brucellosis: A Systematic Review. Frontiers in Public Health, 8, 76. https://doi.org/10.3389/FPUBH.2020.00076.
- Aria Suzanni, M., Iqbal, M., & Irhamni. (2021). Uji Cemaran Mikroba Pada Susu Kedelai Produksi Rumah Tangga Yang Beredar Di Banda Aceh Dengan Metode TPC. Jurnal Pendidikan Dan Pengabdian Vokasi, 2(1), 111-114.
- Asfidoajani, F. A., & Sichani, M. M. (2018). Comparison of Coliform Contamination and Endotoxin Levels in Raw Cow's Milk. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences, 20(5). https://doi.org/10.5812/zjrms.59333.
- Badan Standarisasi Nasional. (2011). Susu Segar-Bagian 1: Sapi (Badan Standarisasi Nasional, Ed.).
- Davin-Regli, A., Lavigne, J.-P., & Pagès, J.-M. (2019). Enterobacter spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. Clinical Microbiology Reviews, 32(4). https://doi.org/10.1128/CMR.00002-19.
- Grace, D., Wu, F., & Havelaar, A. H. (2020). MILK Symposium review: Foodborne diseases from milk and milk products in developing countries—Review of causes and health and economic implications *. Journal of Dairy Science,

- 103(11), 9715-9729. https://doi.org/10.3168/JDS.2020-18323.
- Haskito, A. E. P., Sari, C., & Dameanti, F. N. A. E. P. (2019). Gambaran pengetahuan siswa SMAN 8 Malang tentang foodborne disease. ARSHI Veterinary Letters, 3(1), 15-16. https://doi.org/10.29244/avl.3.1.15-16.
- Kemenkes. (2021). Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2020. Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kumalasari, E., Prihandiwati, E., & Rhodiana. (2018). Analisis Kuantitatif Bakteri Coliform Pada Depot Air Minum Isi Ulang Yang Berada Di Wilayah Kayutangi Kota Banjarmasin. Jurnal Ilmiah Ibnu Sina, 3(1), 134-144.
- Kusumaningsih, A., & Ariyanti, T. (2013). Cemaran Bakteri Patogenik pada Susu Sapi Segar dan Resistensinya terhadap Antibiotika. Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati, Vol. 12(1)(April), Pp. 9-17.
- Massé, J., Dufour, S., & Archambault, M. (2020). Characterization of Klebsiella isolates obtained from clinical mastitis cases in dairy cattle. Journal of Dairy Science, 103(4), 3392-3400. https://doi.org/10.3168/jds.2019-17324.
- Mokadem, E., Leboudy, A., & Amer, A. (2020). Occurrence of Enterobacteriacae in Dairy Farm Milk. Alexandria Journal of Veterinary Sciences, 64(2), 66. https://doi.org/10.5455/ajvs.254389.
- Muthaz, B. D. A., Karimuna, S. R., & Ardiansyah, R. T. (2017). Studi Kualitas Air Minum Di Desa Balo Kecamatan Kabaena Timur Kabupaten Bombana Tahun 2016. Jurnal Ilmiah Mahasiswa Kesehatan Masyarakat, 2(5), 1-9.
- Nero, L. A., & De Carvalho, A. F. (2019). Challenges for Production and Consumption of Raw Milk and Raw Milk Products. In L. A. Nero & A. F. De Carvalho (Eds.), Raw Milk: Balance Between Hazards and Benefits (pp. 351-362). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810530-6.00016-X.
- Nurmawati, S., Prodjosoewojo, S., Chairunnisa, N. H., Djauhari, H., & Alisjahbana, B. (2019). Faktor Risiko Penyebab Foodborne Disease pada Siswa SD. Jurnal Sistem Kesehatan, 4(4), 180-184.
- Pradika, A. Y., Chusniati, S., Purnama, M. T. E., Effendi, M. H., Yudhana, A., & Wibawati, P. A. (2019). Uji Total Escherichia coli pada Susu Sapi Segar di Koperasi Peternak Sapi Perah (KPSP) Karyo Ngremboko Kecamatan Purwoharjo Kabupaten Banyuwangi. Jurnal Medik Veteriner, 2(1), 1. https://doi.org/10.20473/jmv.vol2.iss1.2019.1-6.
- Pramesthi, R., & Hari, T. (2015). Total bakteri dan ph susu segar sapi perah friesian holstein di unit pelaksana teknis daerah dan pembibitan ternak unggul mulyorejo tengaran- semarang. Animal Agriculture Journal, 4(1), 69-74.
- Salman, A., & Hamad, I. (2011). Enumeration and identification of coliform bacteria from raw milk in Khartoum State, Sudan. Journal of Cell and Animal Biology, 5(7), 121-128. https://doi.org/10.3923/ijds.2011.66.71.

- Santoso, L., Rukmi, I., & Lestari, O. (2012). Jumlah Total Bakteri Dan Coliform Dalam Air Susu Sapi Segar Pada Pedagang Pengecer di Kota Semarang. Jurnal Kesehatan Masyarakat, 1, 402-412.
- Saputri, E. T., & Efendy, M. (2020). Kepadatan Bakteri Coliform Sebagai Indikator Pencemaran Biologis Di Perairan Pesisir Sepuluh Kabupaten Bangkalan. Juvenil:Jurnal Ilmiah Kelautan Dan Perikanan, 1(2), 243-249. https://doi.org/10.21107/juvenil.v1i2.7579.
- Sari, D. P., Rahmawati, & Rusmiyanto, E. (2019). Deteksi dan Identifikasi Genera Bakteri Coliform Hasil Isolasi dari Minuman Lidah Buaya. Jurnal Labora Medika, 3(1), 29-35.
- Sengupta, C., & Saha, R. (2013). Understanding coliforms a short review. International Journal of Advanced Research, 1(4), 16-25.
- Suhailah, L., & Santoso, T. (2018). Analisa Cemaran Bakteri Coliform Pada Susu Sapi Murni dengan Variasi Lama Penyimpanan Dalam Suhu Freezer dan Suhu Kulkas di Desa Wilayut Sukodono Sidoarjo. Jurnal Sains, 8(5), 44-49.
- Sutton, S. (2011). Accuracy of Plate Counts. Journal of Validation Technology, 17(3), 42-46.
- Todd, E. (2020). Food-Borne Disease Prevention and Risk Assessment. International Journal of Environmental Research and Public Health, 17(14), 1-13. https://doi.org/10.3390/IJERPH17145129
- Tominaga, T., & Ishii, M. (2020). Detection of microorganisms with lateral flow test strips. Methods in Microbiology, 47, 351-394. https://doi.org/10.1016/BS.MIM.2019.11.007.
- Yang, Y., Peng, Y., Jiang, J., Gong, Z., Zhu, H., Wang, K., Zhou, Q., Tian, Y., Qin, A., Yang, Z., & Shang, S. (2021). Isolation and characterization of multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae from raw cow milk in Jiangsu and Shandong provinces, China. Transboundary and Emerging Diseases, 68(3), 1033-1039. https://doi.org/10.1111/tbed.13787.
- Younis, G., Awad, A., & Ashraf, N. (2017). Molecular and Phenotypic Characterization of Antimicrobial Resistance in Gram Negative Bacteria Recovered from Subclinical Mastitis. Advances in Animal and Veterinary Sciences, 5(5), 196-204. https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2017/5.5.196.204.