

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Kualitas Makanan

Kualitas makanan ditentukan oleh kondisi bahan makanan, cara penyimpanan bahan makanan, cara pengolahan makanan, cara pengangkutan makanan, cara penyimpanan makanan, dan cara menyajikan makanan. Kualitas makanan tersebut harus tetap dijaga kualitasnya agar konsumen terhindar dari penyakit *water and food borne disease* (Mukono, 2004).

Makanan yang sehat harus memenuhi persyaratan minimal seperti yang ditetapkan oleh Menteri Kesehatan. Persyaratan agar makanan sehat dikonsumsi oleh masyarakat adalah bahan makanan yang akan diolah terutama yang mengandung protein hewani, seperti daging, susu, ikan/udang dan telur harus dalam keadaan baik dan segar. Dengan demikian agar makanan yang akan diolah memenuhi syarat, maka bahan tersebut harus tidak berubah bentuk, warna dan rasa (Mukono, 2004).

Makanan yang sudah terolah dapat dibagi menjadi makanan yang dikemas dan makanan yang tidak dikemas. Makanan yang dikemas harus memenuhi persyaratan sebagai berikut: mempunyai label dan harus bermerek, sudah terdaftar dan bernomor pendaftaran, kemasan tidak rusak, ada tanda kedaluwarsa dan dalam keadaan belum kedaluwarsa, serta kemasan yang dipakai harus hanya sekali penggunaan (Mukono, 2004).

Makanan jadi, memerlukan persyaratan yang cukup ketat pula agar sehat dikonsumsi oleh konsumen. Makanan jadi harus memenuhi persyaratan sebagai berikut (Mukono, 2004):

1. Makanan tidak rusak, busuk atau basi yang ditandai dengan perubahan dari rasa, bau, berlendir, berubah warna, berjamur, berubah aroma, atau adanya pengotoran lainnya.
2. Memenuhi persyaratan bakteriologi berdasarkan ketentuan yang berlaku.
3. Harus bebas dari kuman *E.coli* pada makanan tersebut.
4. Angka kuman *E.coli* pada minuman harus 0/100ml contoh minuman.
5. Adanya residu bahan pestisida dan jumlah kandungan logam berat tidak boleh melebihi ambang batas yang diperkenalkan menurut ketentuan yang berlaku.

Dalam pengujian mutu suatu bahan pangan diperlukan berbagai uji yang mencakup uji fisik, uji kimia, uji mikrobiologi, dan uji organoleptik. Uji mikrobiologi merupakan salah satu uji yang penting, karena selain dapat menduga daya tahan simpan suatu makanan, juga dapat digunakan sebagai indikator sanitasi makanan atau indikator keamanan makanan. Pengujian mikrobiologi diantaranya meliputi uji kuantitatif untuk menentukan mutu dan daya tahan suatu makanan, uji kualitatif bakteri patogen untuk menentukan tingkat keamanannya, dan uji bakteri indikator untuk mengetahui tingkat sanitasi makanan tersebut (Arifah, 2010).

B. Susu Kedelai

Susu kedelai merupakan minuman bergizi tinggi dan sejak abad ke-2 SM sudah dibuat di Cina. Susu kedelai berkembang dari Cina ke Jepang dan setelah perang Dunia II berkembang ke negara-negara Asean. Susu kedelai adalah produk seperti susu sapi, tetapi dibuat dari ekstrak kedelai (Santoso, 2009).

Susu kedelai merupakan minuman olahan kedelai yang telah lama populer sebagai pengganti susu sapi segar. Susu kedelai tergolong jenis susu imitasi karena bahan bakunya yang berasal dari bahan nabati. Namun, kandungan

nutrisinya yang tinggi sangat baik bagi tubuh terutama dalam hal asupan protein (Sari, 2007). Susu kedelai adalah hasil ekstraksi dari kedelai. Susu kedelai dibuat dari kedelai yang dimasak bersama gula pasir, daun pandan atau jahe (Murdiati dan Amaliah, 2013).

C. Kandungan Gizi dan Manfaat Susu Kedelai

Susu kedelai memiliki kadar protein dan komposisi asam amino yang hampir sama dengan susu sapi dan tidak mengandung kolesterol, karena itu susu kedelai dapat digunakan sebagai pengganti susu sapi, demikian keunggulan susu kedelai dibuat (Martindah dan Hasim, 2009).

Komposisi gizi susu kedelai hampir sama dengan susu sapi oleh karena itu, susu kedelai dapat digunakan sebagai pengganti susu sapi (Murdiati dan Amaliah, 2013). Komposisi gizi di dalam susu kedelai dan susu sapi dapat dilihat pada Tabel 1 berikut:

Tabel 1
Komposisi Gizi Susu Kedelai Cair dan Susu Sapi (dalam 100gram)

Komponen	Susu Kedelai	Susu Sapi
Kalori (Kkal)	41,00	61,00
Protein (gram)	3,50	3,20
Lemak (gram)	2,50	3,50
Karbohidrat (gram)	5,00	4,30
Kalsium (mg)	50,00	143,00
Fosfor (gram)	45,00	60,00
Besi (gram)	0,70	1,70
Vitamin A (SI)	200,00	130,00
Vitamin B ₁ (mg)	0,08	0,03
Vitamin C (mg)	2,00	1,00
Ar (gram)	87,00	88,33

Sumber: (Santoso, 2009)

D. Proses Pembuatan Susu Kedelai

Pada prinsipnya terdapat dua bentuk susu kedelai, yaitu susu kedelai cair dan susu kedelai bubuk. Bentuk cair jauh lebih banyak dibuat dan diperdagangkan. Susu kedelai dapat disajikan dalam bentuk murni, artinya tanpa penambahan gula dan cita rasa baru. Dapat juga ditambah gula atau flavor (cita rasa) seperti moka, pandan, vanili, coklat, strawberi dan lain-lain. Jumlah gula yang ditambahkan sekitar 5-7% dari berat susu (Santoso, 2009).

Pembuatan susu kedelai dapat menggunakan teknologi dengan peralatan yang sederhana maupun modern dengan peralatan yang canggih. Secara tradisional, susu kedelai biasanya dibuat dengan cara menggiling biji kedelai yang telah direndam dalam air kemudian disaring untuk mendapatkan filtratnya. Pada teknologi yang modern, susu kedelai disajikan dalam bentuk bubuk melalui metode pengeringan semprot (spray drying) sehingga dapat meningkatkan masa simpan produk (Sari, 2007).

Susu kedelai cair dapat dibuat dengan menggunakan teknologi dan peralatan sederhana yang tidak memerlukan ketrampilan tinggi, maupun dengan teknologi modern dalam pabrik. Dewasa ini banyak cara yang dapat digunakan untuk membuat susu kedelai cair dengan hasil yang baik. Beberapa metode yang umum digunakan dalam pembuatan susu kedelai untuk minuman manusia antara lain metode Illinois, metode Pusbangtepa-IPB, dan metode sederhana. Metode sederhana dapat digunakan untuk skala yang lebih kecil dan peralatan yang lebih sederhana, yang cocok bagi skala rumah tangga dan industri kecil. Disamping dalam bentuk cair, susu kedelai dapat juga dibuat dalam bentuk bubuk (powder), yang pada umumnya dilakukan dengan cara pengeringan semprot (spray drying) (Santoso, 2009).

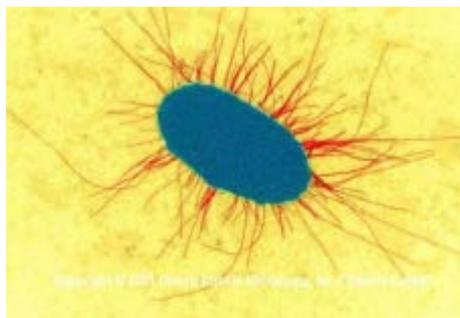
E. Escherichia coli

Escherichia coli adalah kuman oportunistik yang banyak ditemukan di dalam usus besar manusia sebagai flora normal. Sifatnya unik karena dapat menyebabkan infeksi primer pada usus misalnya diare pada anak dan travelers diarrhea, seperti juga kemampuannya menimbulkan infeksi pada jaringan tubuh lain diluar usus (Syahrurachman *et al.*, 2010).

Escherichia coli atau biasa disingkat *E. coli*, adalah bakteri yang umum ditemukan di bawah usus organisme berdarah panas (endotermik). Kebanyakan strain *E.coli* tidak berbahaya, tetapi beberapa serotype dari bakteri ini dapat menyebabkan keracunan makanan yang serius pada manusia dan diare akibat kontaminasi makanan (Radji, 2009).

1. Morfologi

Escherichia coli termasuk ke dalam family *Enterobacteriaceae*. Bakteri ini merupakan bakteri gram negatif memiliki flagel dan memiliki simpai (Radji, 2009). Dengan bentuk batang pendek yang memiliki panjang sekitar 2 μm , diameter 0,7 μm , lebar 0,4-0,7 μm dan bersifat anaerob fakultatif. *E. coli* membentuk koloni yang bundar, cembung, dan halus dengan tepi yang nyata (Jawetz, Melnick, dan Adelberg, 2010).



Gambar 1. *Escherichia Coli* (Jawetz, Melnick dan Adelberg, 2010)

Bakteri *E. coli* merupakan bakteri Gram negatif bersifat motil dengan flagel peritrika, mempunyai kapsul dan bersifat anaerob fakultatif. Bakteri *E. coli* dapat menfermentasi karbohidrat dan menghasilkan gas dari glukosa. Bakteri *E.coli* tumbuh dengan baik di hampir semua media perbenihan, dapat meragi laktosa dan bersifat mikroaerofilik (Radji, 2009).

E. coli merupakan bakteri yang dapat bertahan hidup di medium sederhana dan memfermentasi laktosa menghasilkan asam dan gas, kandungan G+C DNA ialah 50–51 mol%. Pergerakan bakteri ini motil, tidak motil, dan peritrikus. Ada yang bersifat aerobik dan anaerobik fakultatif. *Escherichia coli* merupakan penghuni normal usus, dan seringkali menyebabkan infeksi (Pelczar dan Chan, 2005).

Kecepatan berkembang biak bakteri ini berada pada interval 20 menit jika faktor media, derajat keasaman, dan suhu sesuai. Selain tersebar di banyak tempat dan kondisi, bakteri ini tahan terhadap suhu, bahkan pada suhu ekstrim sekalipun. Suhu yang baik untuk pertumbuhan bakteri ini adalah antara 8⁰C–46⁰C, tetapi suhu optimalnya adalah 35⁰C. Oleh karena itu, bakteri tersebut dapat hidup dalam tubuh manusia dan vertebrata lainnya (Dwidjoseputro, 1982).

Escherichia coli merupakan bagian dari mikrobiota normal saluran pencernaan. *Escherichia coli* dapat berpindah karena adanya kegiatan seperti dari tangan ke mulut atau dengan pemindahan pasif lewat minuman. *E. coli* dalam usus besar bersifat patogen jika melebihi jumlah normalnya. Strain tertentu dapat menyebabkan peradangan selaput perut dan usus (gastroenteritis). Bakteri ini menjadi patogen berbahaya apabila hidup di luar usus seperti pada saluran kemih,

yang dapat mengakibatkan peradangan selaput lendir (sistitis) (Pelczar dan Chan, 2005).

2. Struktur Antigen

Escherichia coli memiliki antigen O, H dan K. Saat ini telah ditemukan sekitar 150 tipe antigen O, 90 tipe antigen K dan 50 tipe antigen H. Berdasarkan sifat-sifat fisiknya, antigen K dibedakan menjadi tiga tipe, yaitu I, A, dan B (Radji, 2009).

Faktor Virulensi:

a. Antigen Permukaan

Escherichia coli sedikitnya memiliki dua jenis tipe fimbria, yaitu tipe manosa sensitive (pili) dan tipe manosa resisten (*Colonization Factor Antigen*, CFA I dan II). Kedua tipe fimbria ini penting sebagai faktor kolonisasi, yaitu untuk pelekatan sel bakteri pada sel hospes. Enteropatogenik berarti dapat menimbulkan penyakit pada saluran intestine. Antigen KI berperan menghalangi proses fagositosis sel bakteri oleh leukosit (Radji, 2009).

b. Enterotoksin

Enterotoksin yang berhasil diisolasi dari *E.coli* adalah Toksin LT (termolabil) dan Toksin ST (termostabil). Produksi kedua jenis toksin tersebut diatur oleh plasmid. Plasmid dapat pindah dari satu sel bakteri ke sel bakteri yang lain. Bakteri *E.coli* memiliki dua jenis plasmid, yaitu plasmid yang menyandi pembentukan toksin LT dan ST dan plasmid yang menyandi pembentukan toksin ST saja (Radji, 2009).

c. Hemolisin

Pembentukan hemolisin diatur oleh plasmid. Hemolisin merupakan protein yang bersifat toksik terhadap sel pada biakan jaringan. Peranan hemolisin pada proses infeksi *E. coli* belum diketahui dengan jelas. Akan tetapi, galur *E. coli* hemolitik ternyata lebih patogen daripada galur yang nonhemolitik (Radji, 2009).

3. Patogenesis

Hampir semua hewan berdarah panas dapat dikoloniasi oleh *E. coli* hanya dalam beberapa jam atau beberapa hari setelah dilahirkan. Kolonisasi pada bayi dapat terjadi oleh bakteri yang ada didalam makanan atau air atau kontak langsung melalui pengasuh bayi. Kolonisasi *E. coli* dalam saluran cerna manusia biasanya setelah 40 hari dilahirkan. *Escherichia coli* dapat melekat pada usus besar dan dapat bertahan selama beberapa bulan bahkan beberapa tahun. Perubahan populasi bakteri *E. coli* terjadi dalam periode yang lama, hal ini dapat terjadi setelah infeksi usus atau setelah penggunaan kemoterapi atau antimikroba yang dapat membunuh florainormal (Radji, 2009).

Lebih dari 700 serotipe antigenik *E. coli* telah dikenal berdasarkan perbedaan struktur antigen O (antigen somatic), H (antigen flagel), dan K (antigen kapsul, selubung). Sebagai contoh, *E. coli* serotype O157 : H7 menunjukkan bahwa serotype bakteri ini dibedakan berdasarkan jenis antigen O157 antigen H7 (Radji, 2009).

Sebagai besar penyakit yang disebabkan oleh infeksi *E. coli* ditularkan melalui makan yang tidak dimasak dan daging yang terkontaminasi. Penularan penyakit dapat terjadi melalui kontak langsung dan biasanya terjadi ditempat yang memiliki sanitasi dan lingkungan yang kurang bersih (Radji, 2009).

4. Kelompok galur *E. coli*

Escherichia coli merupakan bakteri indikator kualitas air minum karena keberadaannya di dalam air mengindikasikan bahwa air tersebut terkontaminasi oleh feses, yang kemungkinan juga mengandung mikroorganisme enteric patogen lainnya (Zakki, 2015).

Berdasarkan sifat virulensi, *E.coli* dikelompokkan menjadi *E.coli* yang menyebabkan infeksi intestine dan *E.coli* yang menyebabkan infeksi ekstraintestin (Radji, 2009). Beberapa galur *E.coli* menyebabkan infeksi intestine digolongkan sebagai berikut, yaitu:

a. E-Coli Enteropatogenik (EPEC)

Penyebab penting diare pada bayi, khususnya di Negara berkembang. EPEC melekat pada sel mukosa yang kecil. Faktor yang diperantarai secara kromosom menimbulkan pelekatan yang kuat. Akibat dari infeksi EPEC adalah diare cair yang biasanya sembuh sendiri tetapi dapat juga kronik. EPEC sedikit fimbria, ST dan LT toksin, tetapi EPEC menggunakan adhesin yang dikenal sebagai intimin untuk mengikat inang sel usus. Sel EPEC invasive (jika memasuki sel inang) dan menyebabkan radang (Radji, 2009).

b. E-Coli Enterotoksigenik (ETEC)

Penyebab yang sering dari “diare wisatawan” dan sangat penting menyebabkan diare pada bayi di Negara berkembang. Faktor kolonisasi ETEC yang spesifik untuk menimbulkan pelekatan ETEC pada sel epitel usus kecil. Beberapa strain ETEC menghasilkan eksotosin tidak tahan panas. Profilaksis antimikroba dapat efektif tetapi bisa menimbulkan peningkatan resistensi antibiotic pada bakteri, mungkin sebaiknya tidak dianjurkan secara umum. Ketika timbul diare, pemberian antibiotic dapat secara efektif mempersingkat lamanya

penyakit. ETEC menggunakan fimbrial adhesi (penonjolan dari dinding sel bakteri) untuk mengikat sel-sel enterosit di usus halus. ETEC dapat memproduksi dua proteinous enterotoksin: dua protein yang lebih besar, LT enterotoksin sama pada struktur dan fungsi toksin kolera hanya lebih kecil, ST enterotoksin menyebabkan akumulasi cAMP pada sel target dan elektrolit dan cairan sekresi berikutnya ke lumen usus. ETEC strains tidak invasive dan tidak tinggal pada lumen usus (Radji, 2009).

c. E-Coli Enterohemoragik (EHEC)

Menghasilkan verotoksin, dinamai sesuai efek sitotoksinya pada sel Vero, suatu sel hijau dari monyet hijau Afrika. Terdapat sedikitnya dua bentuk antigenic dari toksin. EHEC berhubungan dengan kolitis hemoragik, bentuk diare yang berat dan dengan sindroma uremia hemolitik, suatu penyakit akibat gagal ginjal akut, anemia hemolitik mikroangiopatik, dan trombositopenia. Banyak kasus EHEC dapat dicegah dengan memasak daging sampai matang. Diare ini ditemukan pada manusia, sapi, dan kambing (Radji, 2009).

d. E-Coli Enteroinvansif (EIEC)

Menyebabkan penyakit yang sangat mirip dengan shigellosis. Penyakit terjadi sangat mirip dengan shigellosis. Penyakit sering terjadi pada anak-anak di negara berkembang dan para wisatawan yang menuju ke negara tersebut. EIEC melakukan fermentasi laktosa dengan lambat dan tidak bergerak. EIEC menimbulkan penyakit melalui invasinya ke sel epitel mukosa usus. Diare ini ditemukan hanya pada manusia (Radji, 2009).

e. E-Coli Enteroagregatif (EAEC)

Menyebabkan diare akut dan kronik pada masyarakat di negara berkembang. Bakteri ini ditandai dengan pola khas pelekatannya pada sel manusia. EAEC diperkirakan memproduksi EAST (entero aggregative ST toksin), yang merupakan suatu enterotoksin yang tidak tahan panas. EAEC memproduksi hemolisin dan ST enterotoksin yang sama dengan ETEC (Zakki, 2015).

Galur *E.coli* menyebabkan infeksi ekstraintestine digolongkan sebagai berikut, yaitu:

a. *Escherichia coli Uropatogenetik (UPEC)*

UPEC menyebabkan kira-kira 90% infeksi saluran kandung kemih mulai dari sistitis sampai pielonefritis. Bakteri berkolonisasi berasal dari tinja atau daerah perineum saluran urine yang masuk kedalam kandung kemih. UPEC biasanya menyebabkan infeksi sistitis tanpa gejala serius pada wanita yang saluran intestinya telah terinfeksi UPEC sebelumnya. Bakteri yang terdapat pada daerah periureteral tersebut pada akhirnya masuk kedalam kandung kemih ketika melakukan hubungan seksual. Dengan bantuan adhesin, UPEC dapat berkolonisasi pada kandung kemih penderita (Radji, 2009).

UPEC biasanya menghasilkan siderofor yang dianggap penting selama proses kolonisasi. Bakteri ini juga menghasilkan hemolisin yang bersifat sitotoksin terhadap membrane sel hospes. Aktivitas hemolisisn tidak hanya sebatas kemampuan melisis sel darah merah, tetapi α -hemolisin *Escherichia coli* dapat melisis limfosit, sedangkan β - hemolisisn dapat menghambat aktivitas fagositosis dan kemotaksin neutrophil (Radji, 2009).

b. *Escherichia coli Meningitis Neonatus (NMEC)*

NMEC dapat menyebabkan meningitis pada bayi baru lahir. Galur ini dapat menginfeksi 1 dalam 200-4000 bayi. Perjalanan infeksi biasanya terjadi setelah *E.coli* masuk ke dalam pembuluh darah melalui nasofaring atau saluran gastrointestinal dan kemudian masuk ke dalam sel-sel otak. Antigen kapsul K1 dianggap sebagai faktor virulensi utama yang menyebabkan meningitis pada bayi. Antigen K1 dapat menghambat fagositosis, reaksi komplemen, dan respon reaksi imunitas hospes. Selain itu siderofor dan endotoksin juga berperan penting dalam patogenesis NMEC (Radji, 2009).

5. Dampak *E.coli*

Penyakit yang sering ditimbulkan oleh *E.Coli* adalah diare. Gejala diare atau mencret adalah tinja yang encer dengan frekuensi empat kali atau lebih dalam sehari, yang kadang disertai: muntah, badan lesu atau lemah, panas, tidak nafsu makan, ditemukan darah dan lendir dalam kotoran.

Diare bisa menyebabkan kehilangan cairan dan elektrolit (misalnya natrium dan kalium), sehingga bayi menjadi rewel atau terjadi gangguan irama jantung maupun perdarahan otak. Diare seringkali disertai oleh dehidrasi (kekurangan cairan). Dehidrasi ringan hanya menyebabkan bibir kering. Dehidrasi sedang menyebabkan kulit keriput, mata dan ubun-ubun menjadi cekung (pada bayi yang berumur kurang dari 18 bulan). Dehidrasi berat bisa berakibat fatal, biasanya menyebabkan syok. Akibat dari bakteri *E.Coli* adalah gangguan sistem pencernaan, gangguan pada ginjal, serangan jantung, dan tekanan darah tinggi. Selain diare, *E.Coli* juga dapat menyebabkan beberapa penyakit yang bisa juga disebabkan beberapa bakteri lain seperti infeksi saluran kemih, sepsis dan meningitis (Jawetz, Melnick dan Adelberg, 2010).

6. Uji *E.coli*

Berbagai cara pengujian *E.coli* telah dikembangkan, tetapi analisis konvensional yang masih banyak dipraktekkan adalah dengan 4 tahap analisis yang memerlukan waktu 5-7 hari. Empat tahap analisis tersebut adalah uji pendugaan dengan metode MPN (Most Probable Number), uji penguat pada medium selektif, uji lengkap dengan medium lactose broth, serta uji identifikasi dengan melakukan reaksi IMVIC (indol, methyl red, Vogues Praskauer, dan citrate). Jadi untuk dapat menyimpulkan *E.coli* berada pada air atau makanan diperlukan seluruh tahapan pengujian di atas. Apabila dikehendaki untuk mengetahui serotipe dari *E.coli* yang diperoleh untuk memastikan apakah *E.coli* tersebut patogen atau bukan maka dapat dilakukan uji serologi (Arifah, 2010).

Uji serologi digunakan sebagai uji konfirmasi isolat *E. coli*. Salah satu uji serologi yang dapat digunakan adalah dengan uji antisera. Prinsip dari uji anti-sera adalah ketika suatu kultur bakteri dicampur dengan antiserum spesifik yang diarahkan terhadap komponen permukaan bakteri, sel-sel akan terikat bersama melalui ikatan antigen-antibodi untuk membentuk agregat (aglutinasi). Reaksi tersebut biasanya terlihat dengan mata telanjang sebagai gumpalan dalam suspensi. Hal tersebut dilakukan dengan mencampurkan antisera tertentu dengan kultur *E.coli* yang memiliki antigen O dan H yang sesuai (Statens Serum Institut, 2008).

F. Angka Lempeng Total

Angka Lempeng Total (ALT) menunjukkan jumlah mikroba dalam suatu produk. Di beberapa negara dinyatakan sebagai *Aerobic Plate Count* (APC) atau

Standard Plate Count (SPC) atau *Aerobic Microbial Count (AMC)* (SNI 7388, 2009). Menurut SNI 7388 tahun 2009, yang dimaksud dengan ALT adalah jumlah mikroba aerob mesofilik yang ditemukan dalam per gram atau per milliliter contoh yang ditentukan melalui metode standar. Angka Lempeng Total adalah pengujian yang dilakukan untuk menghitung angka bakteri aerob mesofil yang terdapat dalam suatu sampel (Radji, 2009). Metode kuantitatif digunakan untuk mengetahui jumlah mikroba yang ada pada suatu sampel, umumnya dikenal dengan Angka Lempeng Total (ALT). Uji ALT dapat dilakukan dengan metode cara tuang (*pour plate*) pada media padat dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 35-45⁰C dengan posisi dibalik (Dewi, 2016).

Cara yang digunakan antara lain dengan cara tuang, cara tetes dan cara sebar. Prinsip pengujian ini yaitu pertumbuhan koloni bakteri aerob mesofil setelah cuplikan diinokulasikan pada media lempeng agar dengan cara tuang dan diinkubasi pada suhu yang sesuai (Dewi, 2016) .

Prinsip dari metode hitung cawan adalah bila sel mikroba yang masih hidup ditumbuhkan pada medium agar, maka sel mikroba tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dan kemudian dihitung tanpa menggunakan mikroskop (Waluyo, 2016).

Kelebihan Penggunaan Metode ALT Metode hitung cawan merupakan cara yang paling sensitif untuk menghitung jumlah mikroba karena alasan-alasan sebagai berikut (Waluyo, 2016): hanya sel yang masih hidup yang dihitung, beberapa jenis mikroba dapat dihitung sekaligus, serta dapat digunakan untuk isolasi dan identifikasi mikroba karena koloni yang terbentuk mungkin berasal dari mikroba yang mempunyai penampakan spesifik.

Kekurangan penggunaan metode ALT selain keuntungan-keuntungan tersebut, metode hitung cawan juga mempunyai kelemahan-kelemahan sebagai berikut (Waluyo, 2016 ; Cappuccino dan Sherman, 2009):

- a. Hasil perhitungan tidak menunjukkan jumlah sel mikroba yang sebenarnya, karena beberapa sel yang berdekatan mungkin membentuk satu koloni.
- b. Medium dan kondisi inkubasi yang berbeda mungkin menghasilkan nilai yang berbeda pula.
- c. Mikroba yang ditumbuhkan harus dapat tumbuh pada medium padat dan membentuk koloni yang kompak dan jelas, tidak menyebar.
- d. Memerlukan persiapan dan waktu inkubasi beberapa hari sehingga pertumbuhan koloni dapat dihitung.
- e. Memerlukan inkubasi selama satu malam sebelum koloni-koloni terbentuk pada permukaan agar.
- f. Menggunakan peralatan gelas yang lebih banyak untuk melakukan teknik ini.
- g. prosedur yang lebih banyak dapat menimbulkan kesalahan penghitungan akibat kesalahan pada pengenceran atau pemindahan kelempek (Cappuccino dan Sherman, 2009).

1. Jenis-jenis metode angka lempeng

Total Bahan yang diperkirakan mengandung lebih dari 300 sel mikroba per mL atau per gram atau per cm (jika pengambilan sampel dilakukan pada permukaan), memerlukan perlakuan pengenceran sebelumnya ditumbuhkan pada medium agar di dalam cawan petri. Setelah inkubasi, akan terbentuk koloni pada cawan tersebut dalam jumlah yang dapat dihitung, dimana jumlah yang terbaik adalah diantara 30 sampai 300 koloni. Pengenceran biasanya dilakukan secara

desimal, yaitu 1:10, 1:100, 1:1000 dan seterusnya. Larutan yang digunakan untuk pengenceran dapat berupa larutan buffer fosfat, 0.85% NaCl atau larutan ringer (Waluyo, 2016).

Metode ini dibedakan atas dua cara, yaitu metode tuang (*pour plate*) dan metode permukaan (*surface/spread plate*) (Waluyo, 2016).

a. Metode tuang (*Pour Plate*)

Dari pengenceran yang dikehendaki, sebanyak 1 mL atau 0,1 mL larutan tersebut dipipet ke dalam cawan petri 1 mL menggunakan pipet 1 mL atau 1,0 mL. Sebaiknya waktu antara dimulainya pengenceran sampai menuangkan ke dalam cawan petri tidak boleh lebih lama dari 30 menit (Waluyo, 2016).

Kemudian ke dalam cawan tersebut dimasukkan agar cair steril yang telah didinginkan sampai 50⁰C sebanyak kira-kira 15 mL. Selama penuangan medium, tutup cawan tidak boleh dibuka terlalu lebar untuk menghindari kontaminasi dari luar. Segera setelah penuangan, cawan petri digerakkan di atas meja secara hati-hati untuk menyebarkan sel-sel mikroba secara merata, yaitu dengan gerakan melingkar atau gerakan angka delapan, setelah agar memadat. Cawan-cawan tersebut dapat diinkubasikan di dalam inkubator dengan posisi terbalik (Waluyo, 2016).

Inkubasi dilakukan pada suhu dan waktu tertentu sesuai dengan jenis mikroba yang akan dihitung. Medium agar yang digunakan juga disesuaikan dengan jenis mikroba yang akan ditumbuhkan. Selama inkubasi, sel-sel yang masih hidup akan tumbuh dan membentuk koloni yang dapat terlihat langsung oleh mata (Waluyo, 2016).

Setelah berakhir masa inkubasi, koloni yang terbentuk dihitung. Setiap koloni dapat dianggap berasal dari satu sel yang membelah menjadi banyak sel, meskipun juga mungkin berasal dari lebih satu sel yang letaknya berdekatan. Perhitungan jumlah koloni dapat dilakukan menggunakan “*Quebec Colony Counter*”. Ketelitian akan lebih tinggi jika dilakukan pemupukan secara duplo, yaitu dengan menggunakan dua cawan petri untuk setiap pengenceran (Waluyo, 2016).

b. Metode permukaan (*Surface/Spread plate*)

Pada pemupukan dengan metode permukaan, agar steril terlebih dahulu dituangkan ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan membeku. Setelah membeku dengan sempurna, kemudian sebanyak 0,1 mL contoh yang telah diencerkan dipipet pada permukaan agar tersebut. Sebuah batang gelas melengkung dicelupkan ke dalam alkohol 95% dan dipijarkan sehingga alkohol habis terbakar. Setelah dingin, batang gelas tersebut digunakan untuk meratakan contoh di atas medium agar dengan cara memutar cawan petri di atas meja. Selanjutnya inkubasi dilakukan seperti pada metode tuang. Tetapi harus diingat bahwa jumlah contoh yang ditumbuhkan hanya 0,1 mL, tidak boleh 1 mL, jadi harus dimasukkan ke dalam perhitungan pengenceran untuk mendapatkan “*Total Count*” (Waluyo, 2016).

Laporan dari hasil menghitung dengan metode Angka Lempeng Total menggunakan suatu standar yang disebut *Standard Plate Counts* (SPC) sebagai berikut (Waluyo, 2016):

1. Cawan yang dipilih dan dihitung adalah yang mengandung jumlah koloni antara 30-300.

2. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan satu kumpulan koloni yang besar dimana jumlah koloninya diragukan dapat dihitung sebagai satu koloni.

3. Satu deretan (rantai) koloni yang terlihat sebagai suatu garis tebal dihitung sebagai satu koloni. Kemudian dihitung dengan rumus:

Koloni per mL atau per gram =

$$\text{Jumlah koloni per cawan} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas petri dish, koloni demikian dinamakan spreader.

4. Perbandingan jumlah bakteri hasil pengenceran yang berturut-turut antara pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran sebelumnya, jika sama atau lebih kecil dari dua hasilnya dirata-rata. Tetapi jika lebih besar dari dua yang dipakai jumlah mikroba dari hasil pengenceran sebelumnya. Jika sudah dilakukan pengulangan dan hasil pemeriksaan antara yang pertama dan kedua tidak ada perbedaan yang signifikan maka hasilnya dirata-rata.

Dalam *Standard Plate Counts* (SPC) ditentukan cara pelaporan dan perhitungan koloni sebagai berikut (Waluyo, 2016):

a. Hasil yang dilaporkan hanya terdiri dari dua angka yakni angka pertama (satuan) dan angka kedua (desimal) jika angka sama dengan atau lebih besar daripada 5, harus dibulatkan satu angka lebih tinggi pada angka kedua. Sebagai contoh, didapatkan $1,7 \times 10^4$ unit koloni/gram atau $2,0 \times 10^4$ unit koloni/gram.

b. Jika pada semua pengenceran dihasilkan kurang dari 30 koloni per cawan petri, berarti pengenceran yang dilakukan terlalu tinggi. Karena itu, jumlah koloni pada

pengenceran yang terendah yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai kurang dari 30 dikalikan dengan besarnya pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan di dalam tanda kurung.

c. Jika pada semua pengenceran dihasilkan lebih dari 300 koloni pada cawan petri, berarti pengenceran yang dilakukan terlalu rendah. Karena itu, jumlah koloni pada pengenceran yang tertinggi yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai lebih dari 300 dikalikan dengan faktor pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan di dalam tanda kurung.

d. Jika jumlah cawan dari dua tingkat pengenceran dihasilkan koloni dengan jumlah antara hasil tertinggi dan terendah dari kedua pengenceran tersebut lebih kecil atau sama dengan dua, dilaporkan rata-rata dari kedua nilai tersebut dengan memperhitungkan faktor pengencerannya. Jika perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah lebih besar daripada 2, yang dilaporkan hanya hasil yang terkecil.

e. Jika digunakan dua cawan petri (duplo) per pengenceran, data yang diambil harus dari kedua cawan tersebut, tidak boleh dari satu. Oleh karena itu, harus dipilih tingkat pengenceran yang menghasilkan kedua cawan duplo dengan koloni antara 30 dan 300.

G. Media *Chromocult Coliform* Agar

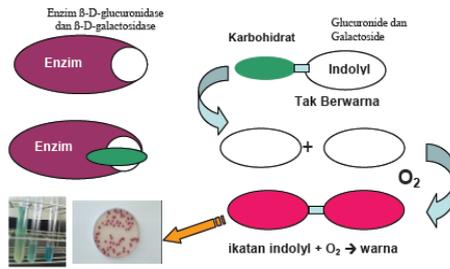
Banyak media yang dapat digunakan untuk mengisolasi *E. coli*, salah satunya dengan media *Chromocult Coliform* Agar (CCA). Media CCA digunakan untuk mempermudah membedakan pertumbuhan antara *E. coli* dan *Coliform* yang lain. Deteksi total *Coliform* dan *E. coli* menggunakan media CCA bergantung pada produksi warna koloni yang spesifik. Warna koloni yang dihasilkan untuk

Coliform adalah merah (reaksi Salmon-GAL), sedangkan untuk *E. coli* biasanya berwarna biru gelap sampai ungu [reaksi Salmon-GAL dan Xglukuronida] (Kusumawardani, 2016).

Substrate-enzim kromogenik adalah senyawa-senyawa yang bertindak sebagai substrat terhadap suatu enzim spesifik, dan berubah warna karena kerja dari enzim tersebut. Secara umum, berdasarkan reaksi kimianya, empat kelompok senyawa kromogenik dapat dikenali dan dideskripsikan oleh Manafi pada tahun 1998. Turunan indolil bersifat larut air dan tahan panas sehingga bisa digunakan di media agar. Turunan indolil yang sering digunakan antara lain: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl (X), 5-bromo-6-chloro-3-indolyl (magenta), atau 6-chloro-3-indolyl (salmon), dan semuanya terbukti tidak terdifusi di agar (Manafi, 2000).

Substrat kromogenik yang sering digunakan adalah ONPG (o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside); Salmon-GAL(6-bromo-3-indolyl- β -D-galactopyranoside); XGAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside); XGLUC atau BCIG (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-Dglucuronide); CPRG (chlorophenol red β -galactopyranoside); dan TTC (Tryphenyl Tetrazolium Chloride) (Manafi, 2000).

Reaksi umum dari enzim-substrat pada media kromogenik. Enzim spesifik yang dilepaskan oleh suatu mikroorganisme akan menggunakan karbohidrat dari kompleks karbohidrat-indolil yang ada di media sebagai sumber karbon. Dua gugus indolil yang lepas akan saling berikatan, dan dengan adanya oksigen akan membentuk warna tertentu, tergantung jenis indolil dari kromogen yang digunakan. Karena pembentukan warna memerlukan oksigen maka ketersediaan udara yang cukup di botol atau cawan petri menjadi sangat penting (Indriani, 2010).



Gambar 2 Skema umum reaksi enzim-substrat indolyl dalam media kromogenik menghasilkan warna tertentu pada koloni. Sumber : (Indriani, 2010)

Baik *coliform* maupun *E.coli* sampai saat ini masih sangat penting sebagai indikator kualitas air dan produk pangan secara umum sehingga akan sangat berguna apabila ada suatu media yang dapat mendeteksi keduanya sekaligus dalam waktu yang bersamaan. Beberapa percobaan telah dilakukan dan metode baru sudah diperkenalkan yaitu yang berdasar pada deteksi enzim β -*Dgalactosidase* (β -GAL) dan enzim β -*D-glucuronidase* (GUD) menggunakan substrat fluorogenik dan/atau khromogenik. Enzim β -*D-galactosidase* (β -GAL) yang dimiliki oleh 98% koliform. Enzim β -*D-glucuronidase* (GUD) yang dimiliki oleh 98% *E.coli* dan 99% *E.coli* memberikan reaksi indol positif. Akan tetapi ada 3-4% *E.coli* ternyata memiliki sifat MUG negatif dan GAL positif, misalnya *E.coli* O157 (Manafi, 2000).



Gambar 3. Skema Umum Reaksi Enzim-Substrat Indolyl dalam Media Kromogenik dengan Dua Macam Kromogen (Indriani, 2010)

Media yang digunakan untuk pengujian simultan *coliform* dan *E. coli* ada yang mengandung dua macam substrat kromogenik, ada pula yang mengandung kromogenik dan fluorogenik sekaligus. Untuk media yang mengandung substrat kromogenik lebih dari satu maka akan tampak dua atau lebih warna koloni yang berbeda untuk jenis bakteri yang berbeda. Contoh dari media tersebut adalah *Chromocult Coliform Agar* (Indriani, 2010).

Dalam suatu kultur bakteri campuran, warna yang tampak untuk akan ada empat macam, yaitu merah salmon untuk koliform (GAL positif), purple (GAL positif dan GUD positif) untuk *E.coli*, hijau torquise untuk bakteri dengan sifat GUD positif dan GAL negatif, serta koloni tak berwarna untuk *Enterobacteriaceae* lainnya (Indriani, 2010).