

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Higenitas Peralatan Makan**

Tahapan dalam higiene sanitasi makanan adalah tahap dalam penyajian makanan yaitu penggunaan alat makan. Higiene dan sanitasi peralatan makan merupakan hal yang penting dilakukan oleh setiap orang yang melakukan proses produksi, penyimpanan, pengangkutan, serta peredaran makanan. Perlu diadakan pengawasan higiene dan sanitasi terhadap peralatan makan yang digunakan untuk mengolah atau menyajikan makanan untuk mendapatkan makanan yang baik serta memenuhi syarat kesehatan (Marisdayana dkk., 2017).

Faktor peralatan seperti alat makan merupakan salah satu faktor yang memegang peran penting dalam penularan penyakit, sebab alat makan yang tidak bersih dan mengandung mikroorganisme dapat menularkan penyakit melalui makanan, sehingga proses pencucian alat makan dengan penerapan metode pencucian yang tepat sangat penting dalam upaya penurunan jumlah angka kuman (Marisdayana dkk., 2017).

Teknik pencucian merupakan faktor yang mempengaruhi jumlah bakteri atau mikroorganisme pada peralatan makan, teknik pencucian yang salah dapat meningkatkan resiko tercemarnya makanan oleh bakteri atau mikroorganisme. Akibat yang ditimbulkan jika konsumen tidak memiliki daya tahan tubuh yang cukup adalah dapat menyebabkan keracunan. Peralatan yang kontak langsung dengan makanan yang siap disajikan sesudah pencucian tidak boleh mengandung angka kuman atau 0 koloni/cm<sup>2</sup>.

Menurut Menteri Kesehatan RI (2011), tempat pencucian peralatan dan bahan makan yang baik dan benar meliputi :

1. Tersedia tempat pencucian peralatan jika memungkinkan terpisah dari tempat pencucian bahan pangan.
2. Pencucian peralatan harus menggunakan bahan pembersih atau detergen.
3. Pencucian bahan makanan yang tidak dimasak atau dimakan mentah harus dicuci dengan menggunakan larutan Kalium Permanganat (KMnO<sub>4</sub>) dengan konsentrasi 0,02% selama 2 menit atau dicelupkan ke dalam air mendidih (suhu 80°C-100°C) selama 1-5 detik.
4. Peralatan dan bahan makanan yang telah dibersihkan disimpan dalam tempat yang terlindung dari pencemaran serangga, tikus, dan hewan lainnya.

Persyaratan peralatan makan menurut Menteri Kesehatan RI, (2011) yaitu:

Penyimpanan peralatan harus memenuhi ketentuan :

1. Peralatan yang kontak dengan makanan.
  - a. Peralatan masak dan peralatan makan harus terbuat dari bahan tara pangan (*food grade*) yaitu peralatan yang aman dan tidak berbahaya bagi kesehatan.
  - b. Lapisan permukaan peralatan tidak larut dalam suasana asam/basa atau garam yang lazim terdapat dalam makanan dan tidak mengeluarkan bahan berbahaya dan logam berat beracun seperti :

- 1) Timah Hitam (Pb)
- 2) Arsenikum (As)
- 3) Tembaga (Cu)
- 4) Seng (Zn)
- 5) Cadmium (Cd)

- 6) Antimon (Stibium)
  - 7) dan lain-lain
- c. Talenan terbuat dari bahan selain kayu, kuat dan tidak melepas bahan beracun.
  - d. Perlengkapan pengolahan seperti kompor, tabung gas, lampu, kipas angin harus bersih, kuat dan berfungsi dengan baik, tidak menjadi sumber pencemaran dan tidak menyebabkan sumber bencana (kecelakaan).
- 2. Wadah penyimpanan makanan
    - a. Wadah yang digunakan harus mempunyai tutup yang dapat menutup sempurna dan dapat mengeluarkan udara panas dari makanan untuk mencegah pengembunan (kondensasi).
    - b. Terpisah untuk setiap jenis makanan, makanan jadi/masak serta makanan basah dan kering.
  - 3. Peralatan bersih yang siap pakai tidak boleh dipegang di bagian yang kontak langsung dengan makanan atau yang menempel di mulut.
  - 4. Kebersihan peralatan harus tidak ada kuman *Eschericia coli* dan kuman lainnya.
  - 5. Keadaan peralatan harus utuh, tidak cacat, tidak retak, tidak gompal dan mudah dibersihkan.

Menurut Permenkes RI No. 1096/MENKES/PER/VI/2011 tentang persyaratan higiene sanitasi jasa boga adalah syarat peralatan makan yang digunakan khususnya para pedagang makanan tidak boleh mengandung koloni bakteri atau 0 koloni/cm<sup>2</sup> permukaan dan harus tidak ada kuman *Eschericia coli* dan kuman lainnya.

Berdasarkan Undang-undang Pangan No.18 tahun 2012, keamanan pangan adalah kondisi dan upaya yang diperlukan untuk mencegah pangan dari kemungkinan cemaran biologis, kimia dan benda lain yang dapat mengganggu, merugikan dan membahayakan kesehatan manusia. Keamanan makanan sangat erat kaitannya dengan bahaya biologi, fisik, dan kimia.

Bahaya biologis atau mikrobiologis terdiri dari parasit, virus dan bakteri patogen yang dapat tumbuh dan berkembang di dalam bahan pangan sehingga menyebabkan infeksi dan keracunan pada manusia. Pada beberapa bakteri dapat menyebabkan toksin pada saat mengkonsumsi yang berakibat intoksikasi dimana toksin sudah terbentuk di dalam makanan atau bahan pangan meskipun bakteri sudah tidak terdapat dalam makanan (Arisman, 2009).

Bahaya kimia umumnya disebabkan oleh adanya bahan kimia yang dapat menimbulkan terjadinya intoksikasi. Terdapat pada cemaran logam berat yang berasal dari industri, residu pestisida, dan antibiotik. Kontaminan kimiawi adalah berbagai macam bahan atau unsur kimia yang menimbulkan pencemaran atau kontaminasi pada bahan makanan. Berbagai jenis bahan dan unsur kimia berbahaya dapat berada dalam makanan melalui beberapa cara, antara lain: pertama yaitu terlarutnya lapisan alat pengolah, karena digunakan untuk mengolah makanan yang dapat melarutkan zat kimia dalam pelapis. Kedua logam yang terakumulasi pada produk perairan. Ketiga sisa antibiotik, pupuk, insektisida, pestisida atau herbisida pada tanaman atau hewan keempat bahan pembersih atau sanitiser kimia pada peralatan pengolah makanan yang tidak bersih pembilasannya.

Bahaya fisik terdiri dari serpihan kayu, batu, logam, rambut dan kuku yang kemungkinan berasal dari bahan baku yang tercemar dari pekerja penjamah makanan. Bahaya fisik dapat sebagai pembawa bakteri patogen dan mengganggu nilai keamanan pangan (Slamet, 2014).

## **B. Higiene Penjamah Makanan**

Berdasarkan (Depkes, 2000:1), Higiene adalah upaya untuk mengendalikan faktor makanan, orang, tempat dan perlengkapannya yang dapat atau mungkin dapat menimbulkan penyakit atau gangguan kesehatan. Apabila ditinjau dari kesehatan lingkungan pengertian higiene adalah usaha kesehatan yang mempelajari pengaruh kondisi lingkungan terhadap kesehatan manusia, upaya mencegah timbulnya penyakit karena pengaruh faktor lingkungan (Fathonah, 2005:1).

Higiene perorangan adalah sikap bersih perilaku penjamah atau penyelenggara makanan agar makanan tidak tercemar. Berkaitan dengan hal tersebut, higiene perorangan yang terlibat dalam pengolahan makanan perlu diperhatikan untuk menjamin keamanan makanan dan mencegah terjadinya penularan penyakit melalui makanan. Purnawijayanti (2001:41) mengemukakan 25% dari semua penyebaran penyakit melalui makanan disebabkan penjamah makanan yang terinfeksi dan higiene perorangan yang buruk.

Dalam Kepmenkes RI No. 1098 tahun 2003 penjamah makanan adalah orang yang secara langsung berhubungan dengan makanan dan peralatan mulai dari tahap persiapan, pembersihan, pengolahan, pengangkutan sampai dengan penyajian. Penjamah makanan yang menangani bahan makanan sering menyebabkan kontaminasi mikrobiologis. Mikroorganisme yang hidup di dalam

maupun pada tubuh manusia dapat menyebabkan penyakit yang ditularkan melalui makanan, yang terdapat pada kulit, hidung, mulut, saluran pencernaan, rambut, kuku dan tangan. Selain itu, penjamah makanan juga dapat bertindak sebagai carrier (pembawa) penyakit infeksi seperti, demam typhoid, hepatitis A, dan diare (Fathonah, 2005:10).

Makanan yang berada di rumah makan, restoran atau dipinggiran jalan akan menjadi media tempat penularan penyakit patogen apabila tidak diolah dan ditangani dengan baik karena dalam penanganan makanan dapat memasukkan dan menyebarkan mikroorganisme patogen. Penularan penyakit tersebut dapat terjadi secara langsung maupun tidak langsung. Kebersihan penjamah makanan dalam istilah populernya disebut higiene perorangan, merupakan kunci kebersihan dalam pengolahan makanan yang aman dan sehat. Dengan demikian, penjamah makanan harus mengikuti prosedur yang memadai untuk mencegah kontaminasi pada makanan yang ditanganinya. Prosedur yang penting bagi pekerja pengolahan makanan adalah pencucian tangan, kebersihan dan kesehatan diri (Purnawijayanti, 2001:41).

### **C. Bakteri *Escherichia coli***

#### **1. Klasifikasi bakteri**

Klasifikasi bakteri *Escherichia coli* menurut Kuswiyanto, (2014), yaitu

Kingdom : *Bacteria*  
Phylum : *Protobacteria*  
Kelas : *Gammaproteobacteria*  
Ordo : *Enterobacteriales*  
Famili : *Enterobacteriaceae*

Genus : *Escherichia*

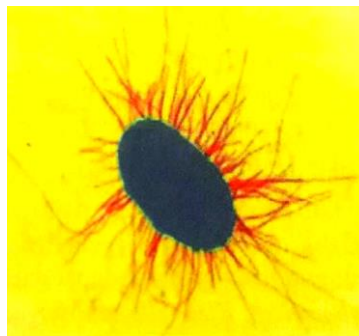
Spesies : *Escherichia coli*



Gambar 1. Bakteri *Escherichia coli* (Sumber: *Bakteriologi 2: Buku Ajar Analisis Kesehatan, 2014*)

## 2. Morfologi

*Escherichia coli* adalah bakteri gram negatif berbentuk batang pendek, berukuran 0,4-0,7 x 1,4 mikron, tidak memiliki spora, bergerak aktif dengan flagel peritrik dan beberapa strain memiliki kapsul.



Gambar 2. *Escherichia coli* Beserta Flagel Peritrik (Sumber: *Bakteriologi 2: Buku Ajar Analisis Kesehatan, 2014*)

*Escherichia coli* tumbuh baik pada media dengan pH 7,2. Bakteri ini dapat tumbuh pada suhu 10-40°C dengan suhu optimal 37,5°C. *Escherichia coli* mengurai glukosa menjadi asam dan gas, memfermentasi laktosa dan manitol,

tergolong indol-positif, membentuk koloni yang khusus pada media selektif, beberapa jenis dapat menghemolisis, dan tumbuh pada suasana aerob dan anaerob (Kuswiyanto, 2014).

### **3. Struktur antigen**

*Escherichia coli* mempunyai 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 fisiknya, antigen K data dibedakan menjadi 3 tipe yaitu, L, A dan B (Radji, 2009).

### **4. Faktor virulensi**

#### **a. Antigen Permukaan**

*Escherichia coli* memiliki sedikitnya 2 jenis tipe fimbria, yaitu sebagai tipe manosa sensitif (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. Contohnya, CFA I dan II melekat pada *Escherichia coli* enteropatogenik pada sel epitel usus. Enteropatogenik berarti dapat menimbulkan penyakit pada saluran intestin.

Antigen kapsul KI sering ditemukan pada *Escherichia coli* yang diisolasi dari penderita bakteremia dan bayi penderita meningitis. Antigen KI berperan menghalangi proses fagositosis sel bakteri oleh leukosit.

#### **b. Enterotoksin**

Bakteri ini memiliki 2 jenis toksin (enterotoksin) yaitu yang termolabil (LT) dan termotabil (ST). Produksi kedua jenis toksin ini diatur oleh plasmid. Plasmid dapat pindah dari satu sel bakteri ke sel bakteri lainnya. *Escherichia coli*



memiliki dua jenis plasmid, yaitu plasmid yang menjadi pembentukan toksin LT dan ST dan plasmid yang menjadi pembentukan toksin ST saja (Radji, 2009).

Toksin LT (termolabil) yang menyebabkan penderita mengalami diare, akibat cara kerjanya yang bersifat merangsang enzim adenilat siklase pada mukosa usus halus. Toksin ST (termostabil) berperan dalam merangsang aktifnya enzim guanilat siklase yang berperan dalam pembentukan guanosin monofosfat siklik yang berakibat terjadinya gangguan klorida ( $\text{Cl}^-$ ) dan natrium ( $\text{Na}^+$ ) serta dapat menurunkan motilitas usus halus (Radji, 2016).

#### c. Hemolisin

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

## 5. Reproduksi

Reproduksi bakteri dapat berlangsung secara aseksual maupun seksual. Reproduksi secara seksual dilakukan melalui pembelahan yang ditandai dengan peleburan material kromosom dari dua kuman sehingga lahir sel-sel bakteri dengan sifat yang berasal dari kedua sel induknya. Reproduksi semacam ini hanya terjadi antara kuman sejenis atau satu famili. Cara seksual dapat dilakukan dengan cara:

#### a. Pembelahan

Umumnya bakteri berkembang biak secara antitosis dengan membelah diri menjadi dua (*binary division*). Waktu antara pembelahan tersebut berbeda-beda untuk setiap jenis bakteri, variasi antara 20 menit dan 15 jam.

b. Pembentukan tunas atau cabang

Bakteri membentuk tunas, dan tunas tersebut akan lepas dan membentuk bakteri baru. Reproduksi dengan pembentukan cabang diketahui dengan pembentukan tunas yang tumbuh menjadi cabang dan akhirnya melepaskan diri.

c. Pembentukan filamen

Pada proses pembentukan filamen, sel mengeluarkan serabut panjang filamen yang tidak bercabang. Bahkan kromosom kemudian masuk ke dalam filamen. Filamen tersebut kemudian terputus-putus menjadi beberapa bagian. Setiap bagiannya membentuk bakteri baru (Kuswiyanto, 2014).



Gambar 3. Pembelahan Bakteri *Escherichia coli* (Sumber: *Bakteriologi 2: Buku Ajar Analis Kesehatan, 2014*)

## 6. Patogenis dan tanda klinis

Menurut Kuswiyanto, (2014), galur atau strain bakteri *Escherichia coli* dapat menyebabkan wabah diare atau muntaber, terutama pada anak-anak. Bakteri penyebab penyakit yang cukup bahaya ini diklasifikasikan berdasarkan

karakteristik sifat-sifat virulensinya. Setiap kelompok dapat menyebabkan penyakit diare melalui mekanisme yang berbeda-beda.

a. *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC)

Bakteri ini merupakan penyebab diare terpenting pada bayi, terutama di negara berkembang. Mekanismenya adalah dengan cara melekatkan dirinya pada sel mukosa usus kecil dan membentuk *filamentous actin pedestal* sehingga menyebabkan diare cair yang dapat sembuh dengan sendirinya atau berlanjut menjadi kronis. Dapat disembuhkan dengan memberikan antibiotik.

b. *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC)

Bakteri ini merupakan penyebab diare umum diare pada bayi di Negara berkembang seperti Indonesia. Berbeda dengan EPEC, *Escherichia coli* jenis ini memproduksi beberapa eksotoksin yang tahan maupun tidak tahan panas di bawah kontrol genetik plasmid. Eksotoksin yang dihasilkan bekerja dengan merangsang sel epitel usus untuk menyekresi banyak cairan sehingga terjadi diare.

c. *Enterohaemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) dan galur yang memproduksi verotoksin (VTEC)

Salah satu strain bakteri EHEC adalah *Escherichia coli* O157 dengan serotip *Escherichia coli* O157:H7, yang merupakan bakteri patogen dan dapat menyebabkan *hemorrhagic colitis* dan *hemolytic uremic syndrome* (HUS).

VTEC menyebabkan sejumlah kejadian luar biasa (KLB) diare dan colitis hemoragik. Penyakit ini bersifat akut dan dapat sembuh secara spontan. Penyakit ini ditandai dengan nyeri pada abdomen dan diare disertai darah.

d. *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC)

Bakteri ini menyebabkan penyakit yang mirip dengan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Shigella sp.* Penyakit ini paling banyak terjadi pada anak-anak di negara berkembang. Bakteri ini memiliki kemampuan dalam menginvasi sel epitel mukosa usus.

e. *Enteroaggregative Escherichia coli* (EAEC)

Bakteri ini menyebabkan diare akut dan kronik pada penduduk di Negara berkembang. Penyakit ini ditandai dengan pola perlekatan yang khas pada sel usus manusia.

Sejumlah kecil bakteri *Escherichia coli* juga dapat menyebabkan sakit perut ringan sampai berat dengan beberapa mekanisme infeksi yang berbeda. Bakteri *Escherichia coli* strain O157:H7 sering juga disebut sebagai bakteri *Enterohaemorrhagic Escherichia coli* (EHEC). Timbulnya gejala diare, kram perut, demam, serta muntah darah perlu diwaspadai sebagai gejala penyakit yang disebabkan bakteri yang sangat virulen.

Gejalanya bisa terjadi 2-4 hari, bahkan dapat mencapai 8 hari setelah *Escherichia coli* strain O157:H7 menginfeksi sel tubuh manusia. Kebanyakan orang dapat sembuh sendirinya dalam 5-10 hari. Pemberian obat anti diare seperti loperamide dan antibiotik juga sebaiknya dihindari karena dapat meningkatkan produksi toksin dan dapat meningkatkan penyerapan pada kedua organ tersebut. Jadi, tindakan yang bisa dilakukan adalah berusaha memulihkan keseimbangan elektrolit tubuh (Kuswiyanto, 2015).

## **7. Dampak *Escherichia coli***

Penyakit yang sering ditimbulkan oleh *Escherichia 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 sering kali 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 *Escherichia coli* adalah gangguan sistem pencernaan, gangguan pada ginjal, serangan jantung, dan tekanan darah tinggi. Selain diare, *Escherichia coli* juga dapat menyebabkan beberapa penyakit yang bisa juga disebabkan beberapa bakteri lain seperti infeksi saluran kemih, sepsis dan meningitis (Jawetz dkk., 2010).

#### **D. Angka Kuman**

Perhitungan angka kuman dapat dilakukan dengan membiakan kuman yang akan dihitung pada media agar. Pada penghitungan angka kuman ini tidak dibedakan macam koloni. Tiap koloni berasal darisatu bakteri, sehingga tiap koloni dianggap satu bakteri.

Ada beberapa cara yang dapat digunakan untuk mengukur atau menghitung jumlah jasat renik, yaitu:

1. Perhitungan jumlah sel, antara lain: hitungan mikroskopik, hitung cawan, dan MPN (*Most Probable Number*).
2. Perhitungan massa sel secara langsung, antara lain: cara volumetrik, cara gravimetrik, turbidimetri (kekeruhan).

3. Perhitungan massa sel secara tidak langsung, antara lain: analisis komponen sel (protein, AND, ATP, dan sebagainya), analisis produk katabolisme, analisis konsumsi nutrient (Waluyo, 2016).

Perhitungan massa sel secara langsung maupun perhitungan massa sel secara tidak langsung jarang digunakan dalam menguji jumlah mikroba pada bahan, tetapi juga sering digunakan untuk mengukur pertumbuhan sel selama proses fermentasi. Dalam perhitungan massa sel secara langsung, jumlah mikroorganisme dapat dihitung jika medium pertumbuhan tidak akan mengganggu pengukuran (Waluyo, 2016).

Metode volumetrik dan gravimetrik, pengukuran volume dan berat sel dilakukan terlebih dahulu dengan menyaring mikroorganisme tersebut, oleh karena itu bila substrat tumbuhnya banyak mengandung padatan, misalnya bahan pangan, sel mikroorganisme tidak dapat diukur dengan menggunakan metode volumetrik maupun turbidimetri. Perhitungan massa sel secara tidak langsung sering digunakan dalam mengamati pertumbuhan sel selama proses fermentasi, dimana komponen substrat atau bahan yang difermentasi dapat diamati dan diukur (Waluyo, 2016).

Menurut Waluyo, (2016), adapun cara hitungan mikroskopik adalah sebagai berikut:

#### 1. Metode petroff-Hauser

Dalam metode ini, hitungan mikroskopik dilakukan dengan kotak-kotak skala, dimana dalam setiap ukuran skala seluas satu mm<sup>2</sup> terdapat 25 buah kotak besar dengan luas 0,04 mm<sup>2</sup>, dan setiap kotak besar terdiri dari 16 kotak-kotak kecil. Tinggi sampel yang terletak diantara kaca benda dan kaca penutup adalah

0,02 mm<sup>2</sup>. Jumlah sel dalam beberapa kotak besar dapat dihitung, kemudian dihitung jumlah sel rata-rata dalam kotak besar. Jumlah sel per ml sampel dapat dihitung sebagai berikut:

Jumlah sel per ml sampel = jumlah sel perkotak besar x 25 kotak x 1/0,002 x 10<sup>3</sup>

Jumlah sel per ml sampel = jumlah sel perkotak besar x 25 x 50 x 10<sup>3</sup>

Jumlah sel per ml sampel = jumlah sel perkotak besar x 1,25 x 10<sup>6</sup>

Jika didapatkan jumlah mikroba yang mau dihitung 12 sel mikroba, maka jumlah sel per sampel adalah  $12 \times 1,25 \times 10^6 = 1,5 \times 10^7$  sel/ml. Hitungan mikroskopik merupakan metode yang cepat dan murah, tetapi mempunyai kelemahan sebagai berikut:

- a. Sel-sel mikroba yang telah mati tidak dapat dibedakan dari sel yang hidup, oleh karena itu keduanya terhitung.
- b. Sel-sel yang berukuran kecil sukar dilihat dibawah mikroskop, sehingga kalau tidak diteliti tidak terhitung.
- c. Untuk mempertinggi ketelitian, jumlah sel di dalam suspense harus cukup tinggi, minimal untuk bakteri 10<sup>6</sup> sel/ml. Hal ini disebabkan dalam setiap bidang pandang yang diamati harus terdapat sejumlah sel yang dapat dihitung.
- d. Tidak dapat digunakan untuk menghitung sel mikroba di dalam bahan yang banyak mengandung ekstrak makanan, karena hal tersebut akan mengganggu dalam perhitungan sel (Waluyo, 2016).

## 2. Metode *Breed*

Hitungan mikroskopik dengan metode *Breed* sering digunakan untuk menganalisis susu yang diperoleh dari sapi yang terkena mastitis, yakni susu suatu penyakit infeksi yang menyerang kelenjar susu sapi, cara ini merupakan

suatu cara cepat, yaitu dengan menghitung bakteri langsung dengan menggunakan mikroskop. Metode *Breed* memiliki kelamahan yaitu tidak dapat dilakukan terhadap susu yang dipasteurisasi karena secara mikroskopik tidak dapat dibedakan antara sel-sel bakteri yang masih hidup atau yang telah mati karena perlakuan pasteurisasi.

Metode *Breed* luas area pandang mikroskop yang akan digunakan harus dihitung terlebih dahulu. Hal ini dapat dilakukan dengan cara mengukur diameter area pandang dengan menggunakan mikrometer yang dapat dilihat melalui lensa minyak imersi. Objek yang mempunyai skala terkecil 0,01 mm. Area pandang mikroskop biasanya mempunyai ukuran diameter area pandang lebih dari 0,18 mm. Luas area pandang mikroskop dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Luas area pandang mikroskop} = \pi r^2 \text{ mm}^2 = \pi r^2 / 100 \text{ cm}^2$$

Dimana,  $r$  adalah jari-jari (mm) area pandang. Karena sampel susu disebarkan pada kaca benda seluas satu  $\text{cm}^2$  sebanyak 0,01 ml, maka:

$$\text{Jumlah susu per area pandang mikroskop} = \pi r^2 / 100 \times 0,01 \text{ ml}$$

$$\text{Jumlah bakteri per ml} = 10.000 / \pi r^2 \times \text{jumlah bakteri per area pandang}$$

Untuk mendapatkan satu ml sampel susu dapat diperoleh dari  $10.000 / \pi r^2$  disebut juga faktor mikroskopik (FM), dan dapat digunakan untuk mengubah jumlah bakteri per area pandang mikroskop menjadi jumlah bakteri per ml.

Jumlah bakteri per area pandang mikroskop dihitung dari rata-rata pengamatan area pandang. Jumlah area pandang harus diamati tergantung dari jumlah rata-rata bakteri per area pandang, dan ditentukan sebagai berikut (Waluyo, 2016):



Tabel 1  
Jumlah Rata-Rata Bakteri Per Area Pandang

Jumlah rata-rata bakteri per area pandang	Jumlah area pandang yang harus diamati
< 0,5	50
0,5-1	25
1-10	10
10-30	5
>30	Dilaporkan sebagai TBUD (terlalu banyak untuk dihitung)

### 3. Metode hitung cawan

Pada uji angka lempeng total, metode yang sering digunakan, yaitu hitung cawan. Prinsip dari metode hitung cawan adalah sel mikroba yang masih hidup ditumbuhkan pada medium agar, kemudian sel mikroba tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dan kemudian dihitung tanpa menggunakan mikroskop (Radji, 2016).

Metode ini merupakan cara paling sensitif untuk menentukan jumlah jasad renik dengan alasan:

- Hanya sel mikroba yang hidup yang dapat dihitung.
- Beberapa jasad renik dapat dihitung sekaligus.
- Dapat digunakan untuk isolasi dan identifikasi mikroba, karena koloni yang terbentuk berasal dari mikroba yang mempunyai penampakan spesifik.

Kelebihan dari penggunaan metode hitung cawan yaitu sensitif untuk menghitung jumlah mikroba dikarenakan 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 (Waluyo, 2016).

Sedangkan kekurangan dari penggunaan metode hitung cawan meliputi (Cappuccino dan Sherman, 2009):

1. Hasil perhitungan tidak menunjukkan jumlah sel mikroba yang sebenarnya, karena beberapa sel yang berdekatan mungkin membentuk satu koloni.
2. Medium dan kondisi inkubasi yang berbeda mungkin menghasilkan nilai yang berbeda pula.
3. Mikroba yang ditumbuhkan harus dapat tumbuh pada medium padat dan membentuk koloni yang kompak dan jelas, tidak menyebar.
4. Memerlukan persiapan dan waktu inkubasi beberapa hari sehingga pertumbuhan koloni dapat dihitung.
5. Memerlukan inkubasi selama 24 jam sebelum koloni-koloni terbentuk pada permukaan agar.
6. Menggunakan peralatan gelas yang lebih banyak untuk melakukan teknik ini serta prosedur yang lebih banyak dapat menimbulkan kesalahan penghitungan akibat kesalahan pada pengenceran.

Metode hitung cawan dapat dibedakan atas dua cara, yaitu metode tuang (*pour plate*) dan metode permukaan (*surface/spread plate*).

#### 1. Metode sebar (*spread plate*)

Metode ini biasanya digunakan untuk memisahkan mikroorganisme yang terkandung dalam volume sampel kecil, sehingga menghasilkan pembentukan koloni diskrit yang didistribusikan secara merata di seluruh permukaan. Selain itu, dapat mempermudah menghitung jumlah koloni yang tumbuh (Sanders, 2012).

## 2. Metode tuang (*pour plate*)

Metode ini sering digunakan untuk menghitung jumlah mikroorganisme dalam sampel campuran, yang ditambahkan ke media agar cair sebelum media memadat. Proses ini menghasilkan koloni yang tersebar merata di seluruh medium padat (Sanders, 2012).

Laporan dari hasil menghitung dengan cara hitungan cawan menggunakan standar yang disebut dengan *Standard Plate Counts* sebagai berikut:

- a. Cawan yang dipilih dan hitung adalah yang mengandung jumlah koloni antara 30-300.
- b. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan satu kumpulan koloni yang besar dimana jumlah koloninya diragukan dapat dihitung sebagai satu koloni.
- c. Satu deretan rantai koloni yang terlihat sebagai suatu garis tebal dihitung sebagai satu koloni.

## 4. Metode MPN (*Most Probable Number*)

Metode hitung cawan menggunakan medium padat, tetapi pada metode MPN dengan menggunakan medium cair di dalam tabung reaksi. Perhitungan MPN berdasarkan pada jumlah tabung tabung reaksi yang positif, yakni yang ditumbuhi oleh mikroba setelah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu. Pengamatan tabung positif yang dapat dilihat dengan timbulnya kekeruhan atau terbentuknya gas di dalam tabung Durham yang diletakkan pada posisi terbalik, yaitu jasad renik yang membentuk gas. Setiap pengenceran pada umumnya

dengan menggunakan tiga atau lima seri tabung. Lebih banyak tabung yang digunakan menunjukkan ketelitian yang lebih tinggi, tetapi tabung reaksi yang digunakan lebih banyak (Waluyo, 2016).

## **E. Media Identifikasi Bakteri *Escherichia coli***

### **1. *Chromocult Coliform Agar***

Media *chromocult coliform agar* sangat spesifik untuk identifikasi *Escherichia coli*. Menurut ISO 9308-1 (2014) *Chromocult Coliform Agar* adalah media kultur kromogenik selektif dan diferensial untuk analisis mikrobiologis sampel air. Dalam 24 jam media ini memungkinkan deteksi, diferensiasi dan penghitungan simultan bakteri *Escherichia coli* dan *coliform* (Chairani dan Harianto, 2019).

Medium CCA mengandung *Salmon-GAL* dan *X-Glucuronide*. Kelompok bakteri dari famili *Enterobacteriaceae* dapat dibedakan berdasarkan kenampakan koloni yang tumbuh. Bakteri yang memiliki gen pengkode sintesis enzim  $\beta$ -galaktosidase dapat menggunakan substrat *Salmon-GAL* untuk tumbuh dan berkembang membentuk koloni. Kelompok bakteri tersebut adalah genus *Enterobacter sp.*, *Citrobacter sp.*, dan *Klebsiella sp.* Bakteri dari kelompok positif  $\beta$ -galaktosidase memberikan kenampakan yang berbeda dari genus lainnya yaitu pertumbuhan koloninya merah salmon. Sedangkan genus yang tidak mampu menggunakan substrat *Salmon-Gal* tetapi mampu mengekspresikan  $\beta$ -glukoronidase dapat menggunakan substrat *X-Glucuronide* akan memberikan kenampakan koloni biru terang. Untuk kelompok yang positif  $\beta$ -galaktosidase dan  $\beta$ -glukoronidase akan memberikan kenampakan koloni biru gelap atau violet, yaitu *Escherichia coli* (Zega dan Hasruddin, 2018).

Formulasi CCA mengandung *sodium heptadecylsulfate* (mis. Tergitol® 7) sebagai penghambat bakteri Gram-positif tanpa efek negatif pada pertumbuhan bakteri *coliform* yang ditargetkan yaitu *Escherichia coli*. Agar *Chromocult* sebagai alternatif untuk agar *MacConkey* untuk identifikasi dan penghitungan *Enterobacteriaceae* tanpa perlu melakukan tes biokimia lebih lanjut untuk konfirmasi identitas. *Chromocult* agar memungkinkan penentuan cepat *Enterobacteriaceae* feses dan memiliki keunggulan dibandingkan media *MacConkey* (Chairani dan Harianto, 2019).

## **2. Media SIM**

### **a. Uji Sulfur (Hidrogen Sulfida)**

Prinsip dari uji ini adalah mikroorganisme dapat membentuk hydrogen sulfida ( $H_2S$ ) dengan menggunakan dua jalur fermentasi utama sebagai berikut :

#### **1) Jalur I :**

Gas  $H_2S$  dapat dihasilkan dari reduksi (hidrogenasi) sulfur organik dalam asam amino sistein. Asam amino ini akan kehilangan atom sulfurnya dengan adanya enzim sistein desulfurase, kemudian direduksi dengan penambahan hydrogen dari air untuk membentuk gas hydrogen sulfida.

#### **2) Jalur II :**

Gas  $H_2S$  dapat dihasilkan dari reduksi senyawa anorganik seperti tiosulfat, sulfat, atau sulfit. Media yang digunakan mengandung natrium tiosulfat yang dapat direduksi oleh beberapa mikroorganisme menjadi sulfit yang disertai dengan pelepasan hydrogen sulfide ( $H_2S$ ) (Cappuccino dan Sherman, 2009).

### **b. Uji indol**

Prinsip dari uji ini adalah kemampuan dalam menghidrolisis triptofan menjadi produk-produk metabolik dimediasi oleh enzim triptofanase yang disertai dengan produksi indol dideteksi dengan penambahan pereaksi Kovac yang ditandai dengan terbentuknya lapisan berwarna merah ceri (Cappuccino dan Sherman, 2009).

c. Uji Motilitas

Motilitas dikenali apabila pertumbuhan biakan (kekeruhan) organisme berflagelum tidak hanya tampak pada garis inokulasi. Pertumbuhan organisme nonmotil terbatas pada garis inokulasi (Cappuccino dan Sherman, 2009).