

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Tahu

##### 1. Sejarah tahu

Tahu merupakan produk makanan berbahan baku kedelai yang sudah dikenal sejak lama di Indonesia. Berbeda dengan tempe yang merupakan makanan asli Indonesia, tahu merupakan produk makanan asal Tiongkok. Sebagaimana produk tempe, tahu juga banyak digemari oleh masyarakat Indonesia karena memiliki cita rasa yang nikmat, bergizi tinggi dan harganya juga terjangkau (Manurung et al., 2014).



Gambar 1 Tahu

Sumber : Dokumentasi pribadi

Tahu mempunyai sejarah panjang di Tiongkok, tempat asalnya sejak 3.000 tahun lalu. Jadi tahu lebih tua daripada tempe dilihat dari masa mulai produksinya. Teknologi pembuatan tahu secara cepat menyebar ke Jepang, Korea, dan Asia Tenggara. Tetapi, kapan tahu mulai hadir di Nusantara tidak dapat ditentukan waktunya dengan tepat. Namun, orang Kediri mengklaim sebagai kota pertama di Nusantara yang mengenal tahu, yang dibawa tentara Kubilai Khan pada tahun 1292. Kata tahu sendiri berasal dari bahasa Tionghoa, yakni: *tao-hu* atau *teu-hu*.

Suku kata *tao/teu* berarti kacang kedelai, sedangkan *hu* berarti hancur menjadi bubur. Dengan demikian secara harfiah, tahu adalah makanan yang bahan bakunya kedelai yang dihancurkan menjadi bubur (Manurung et al., 2014). Pada abad ke-19, orang-orang Jawa dilanda krisis gizi yang luar biasa akibat penerapan sistem *cultuurstelsel* (Tanam Paksa). Hasil bumi dikuras untuk kepentingan kolonial sampai mereka sendiri kesulitan untuk makan. Saat itulah tahu muncul sebagai pangan alternatif. Tahu bersama tempe, menjadi penyelamat orang-orang Jawa dari masa krisis asupan gizi (Manurung et al., 2014).

## 2. Kandungan gizi dan manfaat tahu

Sebagai hasil olahan kacang kedelai, tahu merupakan makanan andalan untuk perbaikan gizi karena tahu mempunyai mutu protein nabati terbaik karena mempunyai komposisi asam amino paling lengkap dan diyakini memiliki daya cerna yang tinggi (sebesar 85% -98%). Kandungan gizi dalam tahu, memang masih kalah dibandingkan lauk pauk hewani, seperti telur, daging dan ikan. Namun, dengan harga yang lebih murah, masyarakat cenderung lebih memilih mengkonsumsi tahu sebagai bahan makanan pengganti protein hewani untuk memenuhi kebutuhan gizi (Manurung et al., 2014)

Tahu terdapat berbagai macam kandungan gizi, seperti protein, lemak, karbohidrat, kalori dan mineral, fosfor, vitamin B-kompleks seperti thiamin, riboflavin, vitamin E, vitamin B12, kalium dan kalsium (yang bermanfaat mendukung terbentuknya kerangka tulang). Dan paling penting, dengan kandungan sekitar 80% asam lemak tak jenuh tahu tidak banyak mengandung kolesterol, sehingga sangat aman bagi kesehatan jantung. Bahkan karena kandungan hidrat arang dan kalorinya yang rendah, tahu merupakan salah satu

menu diet rendah kalori. Tahu juga memiliki kandungan isoflavon yang mengandung hormon estrogen. Selain mencegah kanker payudara, isoflavon juga memperlambat proses penuaan pada perempuan. Isoflavon bukan hanya terkandung dalam tahu melainkan juga pada semua makanan berbahan dasar kedelai seperti tempe, susu kedelai, kecap, dan sejenisnya (Manurung et al., 2014).

### 3. Syarat kualitas tahu

Menurut Manurung et al. (2014), ada beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam menjaga kualitas tahu yaitu air, protein, abu, serat kasar, logam berbahaya, zat pewarna, bau dan rasa, lendir dan jamur, bahan pengawet, dan bakteri *Escherichia coli*. Dalam hal ini untuk sampel tahu segar, menurut peraturan terbaru dari BPOM (BPOM, 2019), batas mikroba *Escherichia coli* yang dapat diterima yang menunjukkan bahwa proses pengolahan pangan telah memenuhi cara produksi pangan olahan yang baik adalah sebagai berikut :

Tabel 1  
Standar *Escherichia coli* untuk Sampel Tahu Segar

Jenis sampel	Jenis mikroba	n	c	m	M	Metode analisis
Tahu segar	<i>Escherichia coli</i>	5	0	3	NA	SNI ISO 7251; SNI ISO 16649-3; SNI ISO 7218

#### Keterangan

n : jumlah sampel yang diambil secara acak dan indenpenden untuk dianalisis

m, M : batas mikroba

c : jumlah sampel yang masuk ke dalam tiap kategori batas mikroba (dapat diterima atau dapat diterima secara marjinal)

#### 4. Teknik pembuatan tahu secara umum

##### a. Bahan baku

Bahan baku tahu kedelai yaitu kedelai kuning. Biasanya bahan baku ini sering dianggap sepele sehingga produk tahu yang dihasilkan kurang memuaskan. Kedelai kuning adalah kedelai yang kulit bijinya berwarna kuning, putih, dan hijau. Apabila dipotong melintang memperlihatkan warna kuning pada irisan keping bijinya. Kedelai kuning inilah yang digunakan sebagai bahan baku tahu dan tempe. Untuk mendapatkan tahu yang berkualitas prima kita harus memperhatikan syarat mutu biji kedelai yang hendak kita gunakan sebagai bahan baku. Secara umum, biji kedelai yang berkualitas yakni yang bebas dari sisa tanaman (kulit polong, potongan batang), batu, kerikil, tanah, atau biji-bijian lain; tidak luka, bebas dari serangan hama penyakit; tidak memar, retak dan keriput (Manurung et al., 2014).

##### b. Bahan pembantu

Tahu kedelai dibuat dengan cara mengendapkan protein dari kedelai dengan menggunakan bahan penggumpal. Bahan penggumpal yang digunakan biasanya batu tahu atau sisoko ( $\text{CaSO}_4$ ). Batu tahu ini berasal dari gips yang mengandung kalsium sulfat yang sudah dibakar dan ditumbuk halus menjadi tepung. Batu tahu ini digunakan dengan mencampurkan bubuk kedelai yang sudah disaring (Manurung et al., 2014).

Bisa juga menggunakan asam cuka (90%) atau biang ataupun sari jeruk. Bila menggunakan bahan-bahan itu, maka harus mengetahui dosis yang tepat, bila tidak tepat maka kemungkinan akan gagal proses pembuatan tahu. Misalnya, penggunaan asam cuka dengan dosis yang tidak pas kemungkinan besar rasa tahu

menjadi masam. Begitu pula dengan penggunaan biang (sisa cairan setelah tahap pengendapan protein atau sisa cairan dari pemisahan gumpalan tahu yang dibiarkan semalam) juga memiliki resiko gagal cukup tinggi. Misalnya jika biang ini mengandung bakteri pengurai protein cukup tinggi tahu akan busuk. Tetapi, bila kita menggunakan sari jeruk beban biaya produksi akan meningkat pesat (Manurung et al., 2014).

c. Proses pembuatan

Menurut Manurung et al. (2014), tahu diproduksi dengan memanfaatkan sifat protein, yaitu akan menggumpal bila bereaksi dengan asam. Adapun langkah-langkah proses produksi tahu adalah sebagai berikut:

- 1) Penyortiran. Penyortiran kedelai dilakukan untuk meng-hilangkan kotoran-kotoran seperti batuan-batuan kecil, daun- daun atau batang tanaman yang terbawa pada kedelai, atau kedelai yang cacat, sehingga hanya kedelai yang memiliki kualitas bagus saja yang digunakan untuk proses pembuatan tahu.
- 2) Perendaman. Setelah didapatkan kedelai disortasi, kemudian direndam dengan menggunakan air bersih selama kurang lebih 8 jam. Pada saat perendaman hindari terkena oleh bahan kimia seperti sabun, air yang mengandung kaporit, terkena garam, atau minyak.
- 3) Pencucian. Setelah direndam, kedelai yang sudah mengembang dan lunak kemudian dicuci bersih dengan menggunakan air sumur, sebaiknya dicuci pada air yang mengalir agar lendirnya terbawa sehingga kedelai lebih bersih. Pencucian bertujuan untuk menghilangkan lendir dan sifat asam.
- 4) Penggilingan. Kedelai yang telah dicuci kemudian digiling dengan menggunakan mesin dan sambil ditambahkan air sedikit demi sedikit hingga

dihasilkan bubur kedelai yang berwarna putih. Bubur kedelai ini siap untuk direbus. Dengan menggunakan ember, bubur kedelai tersebut dituangkan ke dalam bak perebusan.

- 5) Perebusan. Perebusan dilakukan dengan menggunakan bak terbuat dari semen yang di dalamnya dilapisi bahan stainless dengan diameter 1 m dan tinggi kurang lebih 1,2 m. Bak perebusan menggunakan bahan bakar kayu, sekam, atau sisa-sisa gergajian. Penggunaan bahan bakar tersebut lebih efisien dan lebih cepat dibandingkan dengan menggunakan gas. Perebusan dilakukan selama kurang lebih 1 jam, selama perebusan lakukan pengadukan terus menerus.
- 6) Penyaringan dan Penggumpalan. Setelah mendidih, larutan bubur kedelai tersebut disaring dengan menggunakan kain kasa yang sangat halus, hasil endapannya ditampung dalam sebuah bak semen yang bagian dalamnya dilapisi bahan stainless. Lakukan pemerasan atau pengepresan sehingga sari kedelai dapat terpisahkan dengan optimal, kemudian pisahkan ampasnya. Sari kedelai yang telah tertampung kemudian tambahkan air, larutkan 3 ml asam cuka untuk 1 liter sari kedelai, sedikit demi sedikit sambil diaduk perlahan-lahan. Asam cuka kadar 70-90% berfungsi membantu dalam penggumpalan sari kedelai.
- 7) Pencetakan. Setelah sari kedelai mengalami pengendapan dan menggumpal, langkah selanjutnya adalah melakukan pencetakan. Pencetakan dapat dilakukan dengan menggunakan cetakan yang terbuat dari kayu berukuran luasnya 40 x 40 cm<sup>2</sup> tingginya kurang lebih 10 cm, pada tiap sisi cetakan dibuat lubang untuk pengeluaran air. Siapkan papan cetakan kosong dan

bagian atas dilapisi kain halus dan tipis. Kemudian, sari kedelai dituangkan ke cetakan yang sudah dilapisi kain tipis tersebut, susun cetakan 2-5 unit, kemudian bagian atas nya ditutup dengan papan kayu, cetakan paling atas di beri pemberat dengan menggunakan ember yang diisi air.

- 8) Pemotongan. Setelah sari kedelai dipres kurang lebih 15 menit, sehingga kadar airnya rendah maka dihasilkan tahu dalam bentuk lembaran sesuai dengan ukuran cetakannya. Tahu yang masih dalam lembaran tersebut pindahkan bersama papan cetakannya dan susun dengan rapi dalam ruang pemotongan. Pemotongan harus dilakukan segera, sehingga tahu tidak menjadi lembek dan basi. Tahu yang masih lembaran, berwarna putih tersebut dipotong-potong dengan menggunakan pisau stainless yang tajam.
- 9) Pengukusan Tahu. Tahu yang telah dipotong-potong kemudian dikukus dengan menggunakan panci. Jika kita menghendaki tahu berwarna kuning, maka dapat dilakukan perebusan tahu yang sudah dipotong-potong dengan menambahkan bahan kunyit yang ditumbuk. Tahu tersebut akan berwarna kuning dan memiliki cita rasa khas lebih nikmat. Selain itu, tahu potongan yang masih mentah tersebut juga dapat digoreng dengan ditambahkan bumbu, kemudian direndam dalam air.
- 10) Pengemasan. Tahu yang telah dikukus kurang lebih 15-20 menit kemudian dikemas dengan menggunakan plastik yang ditambah air agar tahu dapat bertahan kurang lebih 3-4 hari. Jika kita ingin memasarkan produk tahu ke supermarket dengan segmen pasar menengah ke atas, maka produk kita harus memiliki tampilan yang menarik selain cita rasanya enak.

## **B. Cemaran Mikroba *Escherichia coli* pada Tahu**

### **1. Cemaran bakteri pada pangan**

Kontaminasi makanan yang menimbulkan penyakit yang berbahaya bagi kesehatan merupakan perhatian utama dari industri pangan. Penyebab utama dari kontaminasi ini adalah bakteri. Istilah umum untuk bakteri adalah "kuman" (Jenie, 2014).

Bakteri adalah suatu organisme (makhluk hidup) yang ukurannya sangat kecil sehingga hanya dapat dilihat di bawah mikroskop. Bakteri ini termasuk dalam suatu kelompok umum makhluk hidup yang disebut mikroorganisme (makhluk hidup yang hanya dapat dilihat dengan bantuan mikroskop) (Jenie, 2014). Terdapat ribuan jenis bakteri yang berbeda. Kebanyakan bakteri ini tidak berbahaya dan sebagian benar-benar sangat berguna, misalnya *Lactobacillus* yang dapat memproduksi yoghurt. Akan tetapi, ditemui pula sejumlah kecil bakteri berbahaya terhadap kesehatan, yang mana dikenal sebagai bakteri patogen (penyebab penyakit) (Jenie, 2014).

Seperti manusia, bakteri adalah makhluk hidup, dan mempunyai kondisi optimum untuk pertumbuhannya. Bakteri dibentuk dari satu unit yang disebut sel, dan berkembang biak dengan membelah diri menjadi dua (*binary fission*) (Jenie, 2014). Mayoritas bakteri memiliki waktu generasi berkisar satu sampai tiga jam, *Escherichia coli* memiliki waktu generasi yang cukup singkat berkisar 15-20 menit. Waktu generasi ini sangat bergantung pada cukup tidaknya nutrisi di dalam media pertumbuhan, serta kondisi fisik pertumbuhan mikroorganisme (Padoli, 2016). Kondisi ideal untuk pertumbuhan bakteri adalah: lingkungan yang basah, lembab; suplai makanan yang sesuai; suhu optimum untuk organisme tertentu; waktu



yang cukup; pH yang mendukung; oksigen (untuk kebanyakan bakteri) (Jenie, 2014).

Dalam suatu lingkungan yang tidak mendukung, salah satu cara bakteri dapat bertahan hidup adalah dengan membentuk spora. Satu set bakteri baru akan diproduksi di dalam sel induk. Selanjutnya, dibentuk suatu lapisan luar pelindung. Sel yang dorman (inaktif) tersebut dapat pecah ke luar dan menjadi aktif bila kondisi mendukung. Spora-spora ini sangat tahan, bahkan terhadap panas dan dengan demikian pemasakan tidak sampai mematikan spora. Tidak semua bakteri mampu membentuk spora. Sebagian besar bakteri yang berbahaya terhadap kesehatan mampu membentuk spora (Jenie, 2014).

Bakteri patogen (penyebab penyakit) menimbulkan penyakit melalui dua cara, yaitu infeksi, dan intoksikasi. Keracunan makanan melalui infeksi disebabkan oleh bakteri hidup di dalam makanan, artinya bakteri harus tertelan masuk ke dalam tubuh dalam keadaan hidup, seperti pada *Salmonella sp.* dan *Eschericia coli* (Jenie, 2014).

Keracunan makan melalui intoksikasi disebabkan oleh senyawa-senyawa, beracun (toksin) yang dihasilkan sebagai produk sampingan selama pertumbuhan bakteri. Dengan demikian, sel bakterinya sendiri tidak perlu ikut tertelan, melainkan cukup toksinnya saja, seperti pada *Staphylococcus aureus*, spesies *Streptococci*, dan *Clostridium botulinum* (Jenie, 2014).

Untuk memenuhi kondisi ideal, mikroorganisme dalam makanan tumbuh dan menghasilkan racun. Dengan menelan makanan yang terkontaminasi, racun diserap melalui lapisan epitel usus, dan menyebabkan kerusakan jaringan lokal. Dalam beberapa kasus, racun dapat mencapai organ seperti ginjal atau hati, sistem

saraf pusat atau sistem saraf tepi, di mana racun dapat menyebabkan beberapa kerusakan. Gejala klinis yang paling umum dari *foodborne disease* adalah diare, muntah, kram perut, sakit kepala, mual, nyeri, demam, muntah, diare dengan lendir dan darah (disentri), dan tenesmus rektal (Hernández-Cortez et al., 2017).

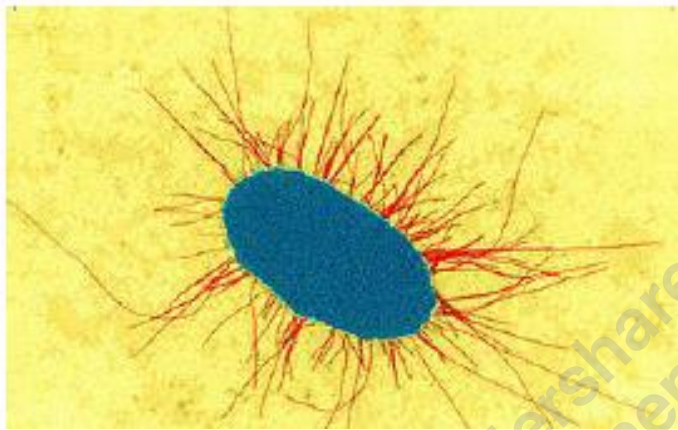
Bakteri yang tumbuh di dalam bahan pangan juga dapat mengubah komposisi bahan pangan. Cara perusakannya adalah dengan cara menghidrolisis atau mendegradasi makromolekul-makromolekul yang menyusun bahan tersebut menjadi fraksi-fraksi yang lebih kecil. Dalam hal ini, protein dapat dipecah menjadi gugusan peptida, senyawa amida dan gas amoniak sehingga menghasilkan bau busuk. Beberapa mikroba tersebut dapat menghasilkan lendir, gas, busa, warna yang menyimpang, asam, toksin dan lain-lainnya. Jika makanan mengalami kontaminasi secara spontan dari udara, maka di dalam makanan tersebut akan terdapat pertumbuhan campuran beberapa jenis mikroba (Koeswardhani, 2014).

## 2. **Escherichia coli**

### a. Deskripsi

*Escherichia coli* merupakan bakteri berbentuk batang pendek (kokobasil), Gram negatif, ukuran  $0,4 \mu\text{m} - 0,7 \mu\text{m} \times 1,4 \mu\text{m}$ , dan beberapa strain mempunyai kapsul (Direktorat Standardisasi Produk Pangan, 2012). *Escherichia coli* tidak membentuk spora (Jenie, 2014). Terdapat strain *Escherichia coli* yang patogen dan non patogen. Habitat alamiah dari *Escherichia coli* adalah dalam saluran pencernaan manusia dan hewan berdarah hangat. Bakteri ini juga umumnya terdapat dalam produk hewani mentah dan alamiah terdapat dalam tanah dan air serta permukaan tanaman. (Jenie, 2014). *Escherichia coli* non patogen banyak

ditemukan di dalam usus besar manusia sebagai flora normal dan berperan dalam pencernaan pangan dengan menghasilkan vitamin K dari bahan yang belum dicerna dalam usus besar (Direktorat Standardisasi Produk Pangan, 2012). *Escherichia.coli*, sebagaimana bakteri lainnya dalam kelompok koliform, merupakan tergolong anaerob fakultatif (Nuraida, 2014).



Gambar 2 *Escherichia coli*

Sumber : (Salvo, 2012) dalam (Padoli, 2016)

b. Kajian keamanan

Strain patogen *Escherichia coli* dapat menyebabkan kasus diare berat pada semua kelompok usia melalui endotoksin yang dihasilkannya (Direktorat Standardisasi Produk Pangan, 2012).

Menurut Direktorat Standardisasi Produk Pangan, (2012), *Escherichia coli* yang dihubungkan dengan tipe penyakit usus (diare) pada manusia yaitu :

- 1) *Enteropathogenic E. coli* : menyebabkan diare, terutama pada bayi dan anak- anak di negara-negara sedang berkembang.
- 2) *Enterotoksigenik E.coli* menyebabkan *Secretory Diarrhea* seperti pada kolera. Strain bakteri ini mengeluarkan toksin LT (termolabil) atau ST

(termostabil). Toksin dikeluarkan saat bakteri melekat pada sel epitel mukosa usus.

- 3) *Enteroinvasive E. coli* menyebabkan penyakit diare seperti disentri yang disebabkan oleh *Shigella*.
- 4) *E. coli* serotipe O157 : H7 menyebabkan colitis hemoragik (diare berdarah).

*Eschericia coli* juga dapat menyebabkan infeksi saluran urin dan juga penyakit lain seperti pneumonia, meningitis dan traveler's diarrhea. Meskipun infeksi *Eschericia coli* dapat diobati dengan antibiotika namun dapat menyebabkan pasien syok bahkan mengarah pada kematian karena toksin yang dihasilkan lebih banyak pada saat bakteri mati (Direktorat Standardisasi Produk Pangan, 2012).

Pangan yang biasanya terkontaminasi *Eschericia coli* ialah daging yang setengah matang dan pangan cepat saji lain serta keju yang berasal dari susu yang tidak dipasteurisasi. Sanitasi yang baik, memasak daging sapi sampai suhu 65 °C, memanaskan kembali masakan dan menyimpan pangan di lemari es pada suhu 4 °C atau kurang; merupakan cara untuk mengontrol *E. Eschericia coli* (Direktorat Standardisasi Produk Pangan, 2012).

c. Indikasi

Menurut Jenie (2014), interpretasi adanya *Escherichia coli* pada batas tertentu sebagai indikasi polusi fekal dalam air telah diperluas pada produk makanan. Adanya organisme ini dalam jumlah besar dalam makanan olahan bukan berarti bahwa kontaminasi kotor terjadi karena makanan baru saja kontak

dengan kotoran. Akan tetapi, hal ini menunjukkan bahwa adanya praktik pengolahan yang buruk, seperti:

- 1) bahan mentah yang terkontaminasi;
- 2) pengolahan yang tidak cukup (penggunaan waktu dan suhu yang tidak tepat);
- 3) kontaminasi personalia;
- 4) pembersihan dan sanitasi peralatan atau permukaan-permukaan yang kontak dengan makanan yang tidak tepat.

Semuanya ini menunjukkan bahwa patogen enterik (usus) lainnya mungkin telah masuk ke dalam produk makanan melalui rute yang sama (Jenie, 2014).

### **3. Sumber cemaran *Escherichia coli* pada tahu**

Menurut sejumlah literature (Darmajana et al., 2015; Mailia et al., 2015; Jenie, 2014; Nuraida, 2014), sumber cemaran mikroba pada tahu umumnya disebabkan oleh bahan baku, air, sanitasi lingkungan proses produksi dan pekerja yang belum mendapat perhatian serius. Higiene pekerja sangat penting dalam sanitasi industri pangan dan merupakan penyebab yang dominan terhadap terjadinya kontaminasi. Industri pangan, baik industri besar maupun kecil harus berupaya memotivasi pekerja untuk dapat melakukan praktik sanitasi yang baik. Tingkat kebersihan peralatan proses produksi kurang diperhatikan, yang mana terlihat dengan adanya sisa bahan yang tertinggal cukup lama. Sisa bahan tersebut dapat mengalami pembusukan dan akan mencemari bahan dan proses selanjutnya. Air untuk industri tahu juga merupakan salah satu factor yang perlu diperhatikan. Air yang digunakan harus merupakan air yang dapat diminum, yang memenuhi kualitas baku mutu lingkungan. Tanah dan air merupakan habitat bakteri

diantaranya *Escherichia coli*. Cemaran *Escherichia coli* dapat diperoleh melalui penggunaan air yang tercemar maupun proses pengolahan yang kurang baik. Proses pembuatan tahu yang melibatkan proses termal dimaksudkan untuk menghilangkan atau mengurangi aktivitas biologis yang tidak diinginkan. Namun tetap dapat ada beberapa bakteri yang dapat bertahan selama proses tersebut dan ada juga yang muncul melalui proses setelahnya.

Dalam proses higienitas pangan, bakteri-bakteri patogen ini harus dicegah perpindahannya, antara lain dari tubuh pengolah / pembuat, bahan baku, mesin atau lingkungan sekitar makanan yang sedang diolah; serta pertumbuhannya dalam jumlah yang besar, dengan melaksanakan tindakan pengawetan untuk menghambat laju tumbuh mikroba (Jenie, 2014).

Mencegah kontaminasi dapat berlangsung melalui berbagai cara selama pengolahan makanan, perlu diterapkan berbagai metode sanitasi dan higiene di industri pengolahan makanan. Sanitasi adalah usaha pencegahan penyakit dengan cara menghilangkan atau mengatur faktor-faktor lingkungan yang berkaitan dengan rantai perpindahan penyakit tersebut (Jenie, 2014).

Menurut Jenie (2014), sanitasi industri pangan meliputi kegiatan-kegiatan secara aseptik dalam:

- 1) persiapan, pengolahan dan pengemasan produk,
- 2) pembersihan dan sanitasi pabrik serta lingkungan pabrik, dan
- 3) higiene pekerja.

### **C. Teknik Sampling**

Mikroorganisme merupakan makhluk hidup yang memiliki sebaran atau distribusi yang bermacam-macam dalam pangan. Mikroba dalam pangan dapat

terdistribusi secara regular, acak, atau berkelompok (cluster) dan tidak selalu mengikuti sebaran normal. Agar hasil pengujian sampel memiliki arti dan dapat dipertanggungjawabkan validitasnya, maka sejumlah sampel diambil secara acak sehingga secara statistic dapat digunakan untuk mempredisi jumlah mikroba dalam lot/batch dengan tingkat keyakinan tertentu. Rencana pengambilan sampel terdiri atas unsure : mikroba atau golongan mikroba yang dianalisis; jumlah sampel yang diambil secara acak dan indenpenden untuk dianalisis (n); metode analisis; batas mikroba (m, M); jumlah sampel yang masuk ke dalam tiap kategori batas mikroba (dapat diterima atau dapat diterima secara marjinal) ( $\leq c$ ) (BPOM RI, 2019)

Sampel makanan yang diterima harus segera diuji begitu tiba di laboratorium. Sampel yang didinginkan dan mudah rusak harus dianalisa paling lambat 36 jam sesudah pengambilan sampel. Sampel beku harus disimpan dalam freezer sampai tiba waktunya untuk diuji, tetapi bila sampel diterima dalam keadaan dingin, jangan disimpan didalam freezer. Beberapa bakteri seperti vibrio banyak yang akan mati pada suhu sangat rendah (pembekuan). Untuk sampel yang tidak mudah rusak seperti makanan kaleng dapat disimpan pada suhu ruang. Namun demikian, sampel tidak boleh disimpan terlalu lama karena ada mikroba yang dapat mati selama penyimpanan (Suryono, Narwati, & Nurmayanti, 2019).

Sampel yang akan dikirim ke laboratorium harus diupayakan tidak tercemar dengan bahan atau mikroba lain terhadap sampel. Selama dalam pengiriman ke laboratorium maka sifat sampel harus dijamin tidak mengalami perubahan sejak sampel diambil, dikemas dan dikirim ke laboratorium. Bila sampel berada dalam keadaan beku, harus terlebih dahulu dilelehkan dan pelelehan sedapat mungkin

dilemari pendingin atau pada suhu kurang dari 45<sup>0</sup>C selama paling lama 15 menit. Bila menggunakan suhu tinggi sebaiknya sampel diaduk secara teratur. Untuk sampel beku yang mudah meleleh seperti es krim, maka dapat diuji tanpa dilelehkan terlebih dahulu. Untuk sampel padat seperti daging mentah, harus terlebih dahulu dicincang sebelum dihomogenkan. Bila hanya ada satu sampel ditujukan untuk berbagai pengujian, maka sampel untuk uji mikrobiologi dicuplik terlebih dahulu sebelum pengujian lainnya dilakukan (Suryono et al., 2019).

#### **D. Pengujian Cemaran Mikroba *Escherichia coli***

Menurut Peraturan Badan Pengawas Obat Dan Makanan Nomor 13 Tahun 2019 tentang Batas Maksimal Cemaran Mikroba dalam Pangan Olahan, pengujian terhadap bakteri *Escherichia coli* dapat dilakukan dengan mengikuti metode analisis berdasarkan sejumlah Standar Nasional Indonesia (SNI) yang diadaptasi dari ISO (*International Organization for Standardization*) (BPOM, 2019), yakni sebagai berikut :

##### **1. SNI ISO 7218:2012 Amd1 2017**

SNI ISO 7218:2012 Amd1 2017 tentang mikrobiologi bahan pangan dan pakan - persyaratan umum dan pedoman untuk pengujian mikrobiologi merupakan hasil adopsi identik dengan metode terjemahan dari ISO 7218:2007 Amd1 2013 (BSN, 2017). Dalam standar ini bagaimana semua alat dan peralatan harus dijaga kebersihan dan kondisinya. Sebelum digunakan, peralatan harus diverifikasi kesesuaiannya dengan tujuan kegiatan / pemeriksaan dan performanya dikalibrasi bila diperlukan. Alat dan peralatan perlu dijaga keakuratannya berdasarkan apa yang dinyatakan dalam standar tersebut (ISO, 2014)



## 2. SNI ISO 16649-3:2016

SNI ISO 16649-3:2016 hasil adaptasi dari ISO 16649-3: 2015 menetapkan metode horizontal untuk deteksi dan pengukuran *Escherichia coli*  $\beta$ -glukuronidase positif, melalui teknik kultur medium-cair dan penghitungan angka paling mungkin (MPN) setelah inkubasi pada  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ , lalu pada  $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$ . ISO 16649 ini berlaku untuk: produk yang ditujukan untuk konsumsi manusia dan makanan hewan, serta sampel lingkungan di bidang produksi pangan dan penanganan makanan. Metode ini cocok untuk penghitungan sel *Escherichia coli* yang mungkin mengalami stres akibat dehidrasi, pembekuan, dan paparan lingkungan garam (seperti laut) atau kerusakan oleh disinfektan (BSN, 2016; ISO, 2015). Mengingat sampel tahu yang diuji kandungan bakterinya di sini diperkirakan tidak mengalami kondisi tersebut, maka dalam penelitian ini SNI ISO ini tidak dipergunakan.

## 3. SNI ISO 7251:2012

Standar Nasional Indonesia (SNI) ISO 7251:2012 merupakan hasil adopsi identik dengan metode terjemahan dari ISO 7251:2005 (BSN, n.d.; BSN, 2012), yang mana memberikan pedoman umum untuk pendeteksian dan penghitungan *Escherichia coli* dengan menggunakan teknik kultur medium-cair dan penghitungan angka paling mungkin (*most probable number* / MPN) setelah inkubasi pada  $37^\circ\text{C}$ , kemudian pada  $44^\circ\text{C}$ . Standar internasional ini berlaku untuk produk yang ditujukan untuk konsumsi manusia dan pakan hewan, serta sampel lingkungan di bidang produksi pangan dan penanganan makanan (ISO, 2019)

Penghitungan dalam metode MPN didasarkan pada statistik probabilitas dan bahwa hasil secara langsung berkaitan dengan frekuensi kemunculan serangkaian hasil positif yang paling mungkin terjadi ketika sejumlah bakteri ada dalam sampel. Jumlah bakteri yang paling mungkin adalah fungsi logaritmik dari hasil ini dan perhitungan lebih lanjut diperlukan untuk mengubah hasil tersebut menjadi nilai MPN. Nilai MPN tabel (sebagaimana terlampir) adalah mewakili suatu range dan bukan nilai absolut (Oblinger & Koburger, 1975).

Pada standar ini, pengujian terhadap bakteri terbagi menjadi beberapa tahapan, yaitu :

a. Pendeteksian keberadaan *Escherichia coli* (*presumptive Escherichia coli*)

Grup bakteri koliform adalah anggota dari famili Enterobacteriaceae. Termasuk dalam famili ini adalah grup patogenik, seperti *Salmonella*, *Shigella* dan *Yersinia*. Kedua jenis koliform adalah *Enterobacter* (dahulu *Aerobact*) dan *Escherichia*, termasuk di dalamnya *Escherichia coli*. Grup koliform berbeda dari kebanyakan anggota lain dalam famili yang sama, yaitu mampu memfermentasi laktosa dengan memproduksi asam dan gas dalam waktu 48 jam (Jenie, 2014). Hal inilah yang digunakan sebagai dasar untuk uji presumtif.

Dalam pengujian ini, sejumlah tabung media pengayaan presumtif cair dengan konsentrasi ganda diinokulasi dengan sejumlah tertentu suspensi awal. Sejumlah tabung media pengayaan presumtif cair dengan konsentrasi tunggal diinokulasi dengan sejumlah tertentu suspensi awal. Selanjutnya pada kondisi yang sama, sejumlah tabung lain yang berisi media dengan konsentrasi tunggal diinokulasi dengan sejumlah tertentu pengenceran desimal dari suspensi awal. Semua tabung berisi media konsentrasi ganda dan tunggal diinkubasikan pada

suhu 37 °C. Pembentukan gas dalam tabung diperiksa setelah 24 jam dan 48 jam (BSN, 2012).

Pengujian presumtif ini dapat dilakukan dengan sejumlah media, diantaranya:

1) *Mac Conkey Broth* (MCB)

*Mac Conkey Broth* telah lama digunakan sebagai media dugaan untuk mendeteksi organisme *coli-aerogenes*. Dalam media aslinya, lakmus digunakan sebagai indikator produksi asam, tetapi dalam publikasi selanjutnya, MacConkey menyarankan warna merah netral sebagai alternatif yang lebih memuaskan. Namun penelitian lebih lanjut kemudian menunjukkan bahwa beberapa sampel dengan indikator merah netral memberikan efek penghambatan terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*. Bromokresol ungu kurang menghambat, dan perubahan warna dari ungu menjadi kuning memberikan indikasi pembentukan. Penambahan 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide (MUG) BR0071 ke dalam media ini akan meningkatkan deteksi *Escherichia coli*. Pada penanamannya, media akan memberikan hasil pertumbuhan keruh dengan produksi asam dan gas untuk *Escherichia coli* dan pertumbuhan bakteri bukan koliform hanya akan menunjukkan pertumbuhan keruh, tanpa produksi asam atau gas (Oxoid, 2021).

2) *Lactose broth*

Kaldu laktosa direkomendasikan untuk digunakan dalam identifikasi dugaan organisme koliform dalam susu, air, dan makanan seperti yang ditentukan oleh *American Public Health Association*. Bukti dugaan

organisme koliform ini harus dikonfirmasi dengan tes lebih lanjut (Oxoid, 2021).

3) *Lauryl sulfate broth / lauryl tryptose broth (LTB)*

*Lauryl Tryptose Broth* menyediakan media selektif yang digunakan untuk mendeteksi organisme koliform dalam air, produk susu dan makanan lainnya. APHA dan merekomendasikan penggunaan *Lauryl Tryptose Broth* untuk uji dugaan MPN dari coliform dalam makanan (Oxoid, 2021). Menurut standar SNI ISO yang diacu, media inilah yang juga disarankan untuk digunakan dalam pengujian.

*Lauryl Tryptose Broth* dirancang untuk mendorong pertumbuhan yang kaya dan produksi gas dari inokula kecil organisme coliform. Bakteri aerob penghasil spora benar-benar terhambat dalam media ini. Media tidak mengandung indikator, tetapi ini dapat ditambahkan (jika diperlukan) setelah inkubasi. Penambahan 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide (MUG) (BR0071) ke dalam media ini akan meningkatkan deteksi *Escherichia coli*. Dalam pertumbuhannya, media ini akan menunjukkan kekeruhan dan adanya gas terhadap kehadiran *Escherichia coli* dan menghambat pertumbuhan bakteri lainnya (Oxoid, 2021)

b. Enumerasi / penghitungan *Escherichia coli*

Mengingat anggota grup koliform yang mampu memfermentasi laktosa dengan memproduksi asam dan gas dalam waktu 48 jam, bukan hanya *Escherichia coli*, maka pembuatan sub-biakan dan inkubasi pada media selektif dilakukan sebagai tahap konfirmasi. Tahapan ini didasarkan pada teori bahwa

bakteri ini pada suhu 44 °C memfermentasi laktosa dengan menghasilkan gas. Pada tahapan ini, setiap tabung media konsentrasi ganda yang memperlihatkan peningkatan kekeruhan, berkabut atau peningkatan pengeluaran gas, serta setiap tabung media konsentrasi tunggal yang memberikan peningkatan pengeluaran gas, disub-biakkan kembali dan diinkubasikan pada suhu 44°C sampai dengan 48 jam. Produksi gas dalam semua tabung diperiksa setelah 24 jam dan 48 jam (BSN, 2012).

Pengujian ini dapat dilakukan dengan sejumlah media, diantaranya :

1) *Brilliant Green Bile (2%) Broth* (BGLB)

Media ini digunakan untuk mendeteksi atau mengkonfirmasi keberadaan anggota kelompok coli-aerogenes; Kandungan hijau yang cemerlang menekan fermentor laktosa anaerobik, seperti *Clostridium perfringens*, dan medianya direkomendasikan untuk uji konfirmasi 44 ° C untuk *Escherichia coli*.

Media ini diformulasikan oleh Durham dan Schoenlein untuk secara selektif memulihkan organisme dari kelompok coli-aerogenes. Empedu dan komponen *brilliant green* menghambat organisme Gram-positif, sedangkan kelompok coli-aerogenes dikenali dengan pembentukan gas yang cepat selama fermentasi laktosa. Agen penghambat dalam medium harus diimbangi dengan nutrien dan komponen mineral, sehingga spora *Clostridium* dan *Bacillus* tidak memberikan reaksi positif palsu pada medium yaitu pembentukan gas. *Brilliant Green Bile Broth* digunakan dalam analisis air, susu dan makanan. Penambahan 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glukuronida (MUG) (BR0071) pada media ini akan

meningkatkan deteksi *Escherichia coli*. Media menjadi keruh dan berwarna hijau kekuningan ketika bakteri tumbuh dan, jika disertai dengan pembentukan gas, terdapat bukti dugaan adanya organisme coli-aerogenes (Oxoid, 2021).

2) *EC broth*

Merupakan kaldu selektif untuk pertumbuhan coliforms dan *Escherichia coli* dari sampel makanan dan lingkungan. Menurut standar SNI ISO yang diacu, media inilah yang juga disarankan untuk digunakan dalam pengujian.

Formulasi asli yang dijelaskan oleh Perry dan Hajna dengan Tryptose sebagai sumber nitrogen kemudian diganti dengan Tryptone. EC Broth adalah media selektif untuk diferensiasi fekal coliform dan uji konfirmasi untuk *Escherichia coli* dari sampel makanan dan lingkungan. Formulasi meliputi kaldu laktosa buffered dan garam empedu No.3. Kehadiran garam empedu menghambat pertumbuhan pembentuk spora dan enterococci, tetapi memungkinkan pertumbuhan *Escherichia coli* dan coliforms. Produksi gas dari fermentasi laktosa ditunjukkan dengan menggunakan tabung Durham terbalik (Oxoid, 2021).

c. Pengujian pelengkap

1) Penanaman pada media EMBA

Menurut Oxoid (2021), untuk lebih meyakinkan bahwa bakteri yang ditemukan memanglah *Escherichia coli*, bila memungkinkan, dapat dilakukan pengujian lanjutan sebagai pelengkap yakni dengan melakukan penanaman hasil yang positif indol pada media EMB (*Eosin Methylene Blue*) agar, yang mana

merupakan media isolasi untuk diferensiasi Enterobacteriaceae. Media serbaguna ini, dimodifikasi oleh Levine dan dapat digunakan untuk diferensiasi *Escherichia coli* dan *Enterobacteria aerogenes*, untuk identifikasi cepat *Candida albicans*, dan untuk identifikasi stafilocokus koagulase-positif. Media disiapkan dengan rumus yang ditentukan oleh APHA untuk deteksi dan diferensiasi kelompok koliform. Adapun karakteristik colonial pada media ini yaitu:

- 1) *Escherichia coli* akan tampak sebagai koloni terisolasi, diameter 2-3 mm, dengan kecenderungan kecil untuk tumbuh bersama, menunjukkan kilau metalik kehijauan oleh pusat cahaya yang dipantulkan dan ungu tua oleh cahaya yang ditransmisikan.
- 2) *Enterobacter aerogenes* akan tampak sebagai koloni dengan diameter 4-6 mm, menonjol dan berlendir, cenderung berdempet, kilau logam biasanya tidak ada, pusat berwarna abu-abu-coklat oleh cahaya yang ditransmisikan. Patogen usus yang tidak memfermentasi laktosa tumbuh sebagai koloni yang tembus cahaya dan tidak berwarna
- 3) *Candida albicans* setelah 24 hingga 48 jam pada suhu 35 ° C dalam 10% karbon dioksida akan tampak sebagai koloni spideri atau berbulu. *Candida* spesies lainnya menghasilkan koloni halus seperti ragi.

4) Inokulasi pada media SIM

Media SIM (*Sulfur Indole Motility*) adalah media untuk diferensiasi bakteri enterik berdasarkan produksi sulfida, produksi indol, dan motilitas. Media SIM mengandung amonium sulfat dan natrium tiosulfat. Jika protein hidrolisis mikroba kaya akan sistein asam amino, yang berisi atom sulfur, belerang dilepaskan sebagai H<sub>2</sub>S. Gas sulfida kemudian digabungkan dengan amonium sulfat ferrous

untuk membentuk ferrous sulfide. Yang terakhir terdeteksi sebagai endapan hitam dalam medium. Mikroba juga dapat mengurangi senyawa yang mengandung sulfur anorganik, seperti tiosulfat, dan melepaskan gas sulfida. Sekali lagi, H<sub>2</sub>S berinteraksi dengan ferro amonium sulfat pada media untuk membentuk endapan hitam, besi sulfida (Chester R. Cooper, 2019; Oxoid, 2021).

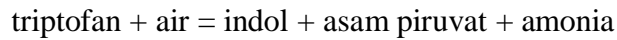
Kehadiran gula yang dapat difermentasi dapat menekan mekanisme enzim yang membentuk hidrogen sulfida, akibat terbentuknya produk asam dan oleh karena itu gula tidak dimasukkan ke dalam medium. Produksi hidrogen sulfida ditunjukkan dengan menghitamkan garis inokulasi setelah inkubasi. Berdasarkan literature, bakteri *Escherichia coli* akan menunjukkan hasil negative pada pengujian produksi H<sub>2</sub>S ini (Oxoid, 2021).

Penggunaan agar hanya 0,35% dalam media menghasilkan produksi media semi padat, ideal untuk pemeriksaan motilitas. Pada akhir proses inkubasi, organisme non-motil hanya akan tumbuh di sepanjang garis inokulasi, sedangkan spesies motil seperti *Escherichia coli* akan tumbuh menjauh darinya (Oxoid, 2021).

Semua tabung yang diperoleh pada diinkubasikan pada suhu 44 °C selama 48 jam. Pengamatan dilakukan terhadap produksi indol dalam tabung, sebagai hasil degradasi tryptophan yang terkandung dalam media. Untuk melakukan pengujian, 0,2 mL pereaksi indol / Kovacs dapat ditambahkan ke tabung yang telah diinkubasi. Periksa setelah 10 menit. Warna merah dalam fase alkohol mengindikasikan adanya indol (Oxoid, 2021).



Melalui berbagai literature yang terkutip dalam MacWilliams (2016), triptofan merupakan asam amino yang dapat mengalami deaminasi dan hidrolisis oleh bakteri yang mengekspresikan enzim triptofanase.



Persyaratan utama untuk membudidayakan organisme sebelum melakukan uji indol adalah bahwa media mengandung triptofan dalam jumlah yang cukup. Kehadiran indol ketika mikroba tumbuh di media kaya triptofan menunjukkan bahwa suatu organisme memiliki kemampuan untuk mendegradasi triptofan. Deteksi indole, produk sampingan dari metabolisme triptofan, bergantung pada reaksi kimia antara indole dan pdimethylaminobenzaldehyde (DMAB) dalam kondisi asam untuk menghasilkan pewarna merah rosindole. Reaksi terjadi melalui proses kondensasi yang dibentuk oleh pemecahan asam pada protein (MacWilliams, 2016). Reagen Kovac yang terdiri dari amil alkohol, para-dimethylaminobenzaldehyde dan hidroklorik pekat. (Oxoid, 2021)

Uji indol positif, seperti misalnya pada bakteri *Escherchia coli*, ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah jambu ke merah ("cincin merah-ceri") di lapisan reagen di atas media dalam beberapa detik setelah penambahan reagen (MacWilliams, 2016).