

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Hygiene dan Sanitasi

Hygiene adalah usaha kesehatan yang mempelajari pengaruh kondisi lingkungan terhadap kesehatan manusia, usaha untuk mencegah timbulnya penyakit dikarenakan faktor lingkungan. Hygiene menitikberatkan pada usaha untuk kesehatan perseorangan beserta lingkungan tempat orang tersebut berada. Misalnya, mencuci tangan untuk menjaga kebersihan tangan mencuci piring untuk menjaga kebersihan piring (Marsanti dan Widiarini, 2018).

Untuk mencegah kontaminasi makanan dengan zat-zat yang dapat mengakibatkan gangguan kesehatan diperlukan penerapan sanitasi lingkungan. Sanitasi merupakan suatu usaha pencegahan penyakit yang menitikberatkan kegiatan pada usaha kesehatan lingkungan. Hal ini berguna untuk mencegah terjadinya pencemaran makanan dan racun yang disebabkan oleh zat adiktif. Sanitasi adalah upaya kesehatan dengan cara memelihara dan melindungi kebersihan lingkungan dari subyeknya (Marsanti dan Widiarini, 2018).

Sanitasi makanan merupakan salah satu usaha pencegahan yang menitikberatkan pada kegiatan dan tindakan yang dilakukan untuk membebaskan makanan dan minuman dari segala bahaya yang dapat mengganggu kesehatan, mulai dari sebelum makanan diproduksi, selama dalam proses pengolahan, penyimpanan, pengangkutan, sampai pada saat dimana makanan dan minuman siap untuk dikonsumsi oleh masyarakat atau konsumen (Marsanti dan Widiarini, 2018).

Hygiene sanitasi makanan adalah upaya untuk mengendalikan faktor makanan, orang, tempat dan perlengkapannya yang dapat atau mungkin menimbulkan penyakit atau gangguan kesehatan. Hygiene sanitasi makanan dan minuman yang baik perlu ditunjang dengan kondisi lingkungan dan sanitasi yang baik. Lingkungan yang terkontaminasi dan sanitasi buruk yang tidak memenuhi syarat kesehatan akan menyebabkan bakteri atau kuman mudah masuk dan menyebabkan infeksi (Marsanti dan Widiarini, 2018).

B. Kacang Kedelai

Kedelai adalah tanaman subtropis yang multiguna, kedelai sudah sejak dahulu dimanfaatkan sebagai salah satu sumber pemenuhan kebutuhan protein nabati di berbagai negara, termasuk di Indonesia. Kedelai adalah tanaman pangan jenis kacang g-kacangan yang biasa diolah masyarakat menjadi berbagai bentuk pangan olahan. Produk utama yang dihasilkan dari kedelai di antaranya tempe, tahu, susu kedelai, kecap, kembang tahu, soyghurt, dan berbagai inovasi produk lainnya. (Warisno dan Dahana, 2010)

Berdasarkan sistematika tumbuhan (taksonomi) tanaman kedelai diklasifikasikan sebagai berikut (Cahyono, 2007) :

Kingdom : *Plantae*
Divisi : *Spermatophyta*
Sub-divisi : *Angiospermae*
Kelas : *Dicotyledonae*
Ordo : *Polypetales*
Famili : *Leguminosea*
Sub-famili : *Papilionoideae*

Genus : *Glycine*

Species : *Glycine max (L.) Merrill*

Kedelai merupakan tanaman semusim, berupa semak rendah, tumbuh tegak, berdaun lembut, dengan beragam morfologi. Tanaman kedelai memiliki tinggi berkisar 10-200 cm, dapat bercabang sedikit atau banyak tergantung kultivar dan lingkungan hidup tanaman kedelai. Morfologi tanaman kedelai didukung oleh komponen utama yaitu akar, daun, batang, bunga, polong, dan biji sehingga pertumbuhannya bisa optimal (Adisarwanto, 2005).

Kedelai tumbuh dengan baik pada daerah beriklim tropis atau subtropis. Tanaman kedelai lebih menyukai iklim kering dibandingkan iklim lembab. Tanaman kedelai dapat tumbuh baik di daerah yang memiliki curah hujan sekitar 100-400 mm/bulan dan suhu berkisar 21-34°C. Tanah untuk budidaya tanaman kedelai tidak terlalu basah, tapi tersedia air dalam jumlah yang cukup, dengan tingkat keasaman tanah pH 5,0-7,0. (Salim, 2012)

Berdasarkan warna kulit bijinya, kedelai dibedakan menjadi dua jenis, yaitu kedelai kuning dan kedelai hitam. Pada kedelai kuning dan hitam tidak terdapat perbedaan yang mencolok dalam hal gizi, hanya saja warna kulit biji kedelai cukup menentukan jenis olahan yang akan dibuat (Warisno dan Dahana, 2010).

Tanaman kedelai yang umum dibudidayakan adalah spesies *Glycine max* (biji kedelai berwarna kuning kekuningan) dan *Glycine soya* (biji kedelai berwarna hitam). *Glycine max* adalah tanaman asli daerah Asia subtropik seperti RRC dan Jepang selatan, sedangkan *Glycine soya* merupakan tanaman asli Asia tropis seperti Asia Tenggara. Kedelai hitam umumnya digunakan untuk bahan

baku pembuatan kecap, sedangkan jenis kedelai yang digunakan untuk membuat tempe, tahu, susu kedelai, oncom adalah jenis kedelai kuning (Salim, 2012).

Kedelai hitam mempunyai kulit biji yang berwarna hitam dan tidak transparan, sehingga biji tidak terlihat dari luar. Apabila dikupas kulitnya, warna biji kedelai hitam juga berwarna kuning. Kedelai kuning mempunyai kulit biji berwarna putih transparan, sehingga biji yang berwarna kuning terlihat dari luar, sehingga biji kedelai kuning akan terlihat berwarna kuning. Kedelai kuning biasanya diolah menjadi tempe, susu kedelai, tahu, dan soyghurt (Warisno dan Dahana, 2010).

Kedelai adalah bahan pangan yang mempunyai kandungan protein yang tinggi. Kedelai dapat digunakan sebagai pengganti sumber protein hewani, seperti daging, telur, dan susu. Kedelai memiliki kelebihan dibandingkan dengan sumber protein hewani, di antaranya kedelai tidak mengandung kolesterol berbahaya, tetapi kedelai mengandung fitosterol yang bermanfaat bagi tubuh sebagai antioksidan dan menekan produksi kolesterol (Warisno dan Dahana, 2010).

Tabel 1

Kandungan gizi kedelai per 100 gram

Komponen Zat Gizi	Jumlah
1	2
Kalori	331 kcal
Air	7,5 gram
Protein	34 gram
Lemak	18,1 gram

1	2
Karbohidrat	34,8 gram
Kalsium	227 mg
Fosfor	585 mg
Besi	8 mg
Vitamin A	110 SI
Vitamin B	1,1 mg

Sumber : (Warisno, dan Dahana, 2010)

Kandungan utama kedelai adalah protein dan karbohidrat yang sangat tinggi, masing-masing di atas 30%. Untuk beberapa jenis tertentu, kandungan proteinnya di atas 40%. Kedelai juga mengandung lemak yang cukup tinggi (18%). Berbeda dengan lemak kolesterol, lemak dalam kedelai adalah lemak tidak jenuh yang baik untuk kesehatan. Selain itu, lemak kedelai juga mengandung lesitin dan fitosterol yang berfungsi sebagai antioksidan dan menekan pembentukan kolesterol di dalam tubuh manusia (Warisno dan Dahana, 2010).

Lesitin kedelai merupakan senyawa campuran fosfatida dengan senyawa lemak. Salah satu jenis lesitin di dalam kedelai adalah lesitin HPF (*Highly Purified Fraction*) yang berfungsi dalam pembentukan HDL (*High Density Lipoprotein*). HDL lebih dikenal sebagai kolesterol baik yang berfungsi membersihkan LDL (*Low Density Lipoprotein*) atau lebih dikenal sebagai kolesterol jahat (Warisno dan Dahana, 2010).

C. Susu Kedelai

Susu kedelai merupakan salah satu minuman tambahan yang dianjurkan untuk diminum secara berkala atau teratur sesuai dengan kebutuhan tubuh. Sebagai minuman tambahan, susu kedelai bukan merupakan obat, tetapi dapat menjaga kondisi tubuh agar tetap sehat sehingga tidak mudah terserang penyakit (Amrin, 2006). Susu kedelai adalah olahan minuman yang terbuat dari bahan baku utama kedelai. Susu kedelai adalah hasil dari ekstraksi kedelai. Protein dari susu kedelai memiliki susunan asam amino yang hampir sama dengan susu sapi sehingga susu kedelai seringkali digunakan sebagai pengganti susu sapi bagi mereka yang alergi terhadap protein hewani (Aidah dan Tim Penerbit KBM Indonesia, 2021).



Gambar 1 Susu Kedelai (Mudjajanto dan Kusuma, 2005)

Menurut catatan sejarah, susu kedelai mulai dibuat di Cina sejak abad kedua sebelum masehi. Dari negeri tirai bambu itu, susu kedelai berkembang ke Jepang dan masuk ke Asia Tenggara setelah Perang Dunia II (Mudjajanto dan Kusuma, 2005).

Tata cara untuk mengolah susu kedelai sangat mudah. Susu kedelai dapat dibuat dengan teknologi dan peralatan sederhana, serta tidak memerlukan keterampilan khusus, sehingga semua orang dapat membuat sendiri di rumah. Pembuatan susu kedelai pada dasarnya adalah memproses biji kacang kedelai untuk diambil sarinya. Proses pembuatan susu kedelai meliputi tahap-tahap: penyortiran, pencucian, perendaman, penghancuran hingga berbentuk bubur, kemudian penyaringan sehingga diperoleh sari kacang kedelai, kemudian pemanasan (Ulfiana dan Has, 2019).

D. Kandungan Gizi Susu Kedelai

Susu kedelai mengandung kedelapan asam amino esensial, yaitu lisin, triptofan, fenilalanin, leusin, isoleusin, treonin, metionin, valin. Asam amino esensial ini sangat diperlukan oleh tubuh, tapi tidak disintesis dari bahan makanan dengan kecepatan memadai, sehingga harus disediakan dalam bentuk jadi yang dikonsumsi. Protein susu kedelai mempunyai susunan asam amino yang mirip susu sapi sehingga dapat dijadikan pengganti susu sapi bagi mereka yang alergi (lactose intolerance) atau bagi mereka yang tidak menyukai susu sapi (Ulfiana dan Has, 2019).

Mutu protein dalam susu kedelai hampir sama dengan mutu protein sapi. Protein efisiensi rasio (PER) susu kedelai adalah 2,3 dan PER susu sapi 2,5. Susu kedelai dikenal sebagai susu kesehatan karena tidak mengandung kolesterol. Namun, mengandung fitokimia, yaitu senyawa dalam bahan pangan yang berkhasiat menyehatkan badan (Mudjajanto dan Kusuma, 2005).

Tidak adanya kandungan pati di dalam kedelai, dapat mempermudah kedelai untuk dijadikan susu. Dalam bentuk susu kedelai kandungan zat besi,

kalsium karbohidrat, fosfor , vitamin A, vitamin B kompleks dosis tinggi, air, dan lesitin bisa terserap lebih cepat serta baik dalam tubuh (Amrin, 2006). Berikut ini kandungan gizi susu kedelai (Mudjajanto dan Kusuma, 2005).

Tabel 2

Kandungan zat gizi susu sapi dan susu kedelai (dalam 100 g bahan)

Komposisi	Susu Sapi	Susu Kedelai
Kalori (kal)	61	41,00
Lemak (g)	3,20	3,50
Protein (g)	3,50	2,50
Karbohidrat (g)	4.30	5,00
Kalsium (mg)	143,00	50,00
Fosfor (mg)	60,00	45,00
Besi (mg)	1,70	0,70
Vitamin A (SI)	130,00	200,00
Vitamin B1 (mg)	0,03	0,08
Vitamin C (mg)	1,00	2,00
Air (g)	88,33	87,00

Sumber : (Mudjajanto dan Kusuma, 2005)

E. *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri yang hidup di dalam saluran pencernaan manusia atau hewan, dan merupakan flora alami pada usus mamalia. *Escherichia coli* patogen adalah salah satu mikroba yang sering diduga menjadi penyebab keracunan yang ditandai dengan gejala diare (Rahayu dkk., 2018).

1. Klasifikasi dan morfologi

Genus *Escherichia coli* merupakan bagian dari *Escherichiae* yang termasuk pada famili *Enterobacteriaceae* dan pertama kali diisolasi pada tahun

1885 oleh seorang bakteriologis asal Jerman bernama Theodor Escherich (Rahayu dkk., 2018).

Escherichia coli diklasifikasikan yaitu, sebagai berikut (Martani, 2020) :

Domain : *Bacteria*
Filum : *Proteobacteria*
Kelas : *Gammaproteobacteria*
Ordo : *Enterobacteriales*
Famili : *Enterobacteriaceae*
Genus : *Escherichia*
Spesies : *Escherichia coli*



Gambar 2 Bakteri *Escherichia coli* (Martani, 2020)

Escherichia coli merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang dengan ukuran berkisar antara 1.0-1.5 μm x 2.0-6.0 μm , tidak motil atau motil dengan flagela serta dapat tumbuh dengan atau tanpa oksigen, bersifat fakultatif anaerobik dan dapat tahan pada media yang miskin nutrisi. Karakteristik biokimia *Escherichia coli* lainnya adalah kemampuannya untuk memproduksi indol, kurang mampu memfermentasi sitrat, bersifat negatif pada analisis *urease*. *Escherichia*

coli memiliki waktu generasi sekitar 30 sampai 87 menit bergantung pada suhu. Suhu optimum bagi pertumbuhan *Escherichia coli* adalah 37°C dengan waktu generasi tersingkat, yaitu selama 30 menit (Rahayu dkk., 2018).

Escherichia coli merupakan salah satu spesies bakteri enterik. *Escherichia coli* yang merupakan flora normal usus digunakan sebagai indikator pencemaran tinja pada air minum, kolam renang, makanan, dan minuman (Radji, 2010). Kebanyakan *Escherichia coli* tidak berbahaya, tetapi beberapa seperti *Escherichia coli* tipe O157:H7 dapat mengakibatkan keracunan makanan yang serius pada manusia yaitu diare berdarah karena eksotoksin yang dihasilkan bernama verotoksin (Martani, 2020).

Secara fisiologi, *Escherichia coli* memiliki kemampuan untuk bertahan hidup pada kondisi lingkungan yang sulit. *Escherichia coli* tumbuh dengan baik di air tawar, air laut, atau di tanah. Penyakit yang ditimbulkan oleh *Escherichia coli* disebabkan karena kemampuannya untuk beradaptasi dan bertahan pada lingkungan yang berbeda. Ada beberapa jenis kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan bagi *Escherichia coli* untuk dapat tetap bertahan, misalnya lingkungan asam (pH rendah) seperti pada saluran pencernaan manusia, perubahan suhu, serta tekanan osmotik. Kemampuan *Escherichia coli* untuk bertahan hidup selama pendinginan dan pembekuan telah terbukti menjadikan *Escherichia coli* toleran terhadap kondisi kering (Rahayu dkk., 2018).

2. Faktor virulensi

Patogenitas *Escherichia coli* patogen ditentukan berdasarkan faktor atau gen virulensi spesifik yang dimiliki bakteri tersebut. Gen virulensi ini terdapat pada kromosom atau plasmid indigenus atau berasal dari mikroorganisme lainnya.

Kombinasi gen virulensi ini akan menentukan patotipe *Escherichia coli*, dan masing-masing patotipe menyebabkan gejala klinis tertentu yang berbeda. Perubahan sifat patogenitas dapat berlaku reversible, strain patogen juga dapat berubah menjadi non patogen (komensal) karena hilangnya faktor virulensi dalam sel (Rahayu dkk., 2018).

Dari enam jenis *Escherichia coli* patogen, masing-masing memiliki gen virulensi yang spesifik, tetapi beberapa diantaranya juga dapat memiliki faktor virulensi yang sama, seperti EPEC dan EHEC yang sama-sama memiliki intimin (suatu protein yang memungkinkan bakteri patogen untuk menempel pada usus dan menimbulkan luka) (Rahayu dkk., 2018).

a. Antigen permukaan

Escherichia coli memiliki sedikitnya 2 jenis tipe fimbria, yaitu 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. Sebagai contoh, CFA I dan II melekatkan *Escherichia coli* enteropatogenik pada sel epitel usus. Enteropatogenik berarti dapat menimbulkan penyakit pada saluran intestine. Antigen K1 berperan menghalangi proses fagositosis sel bakteri oleh leukosit (Radji, 2010).

b. Enterotoksin

Enterotoksin yang berhasil diisolasi dari *Escherichia coli* yaitu toksin LT (termolabil) dan toksin ST (termostabil). Produksi kedua jenis toksin tersebut diatur oleh plasmid. Bakteri *Escherichia coli* memiliki dua jenis plasmid, yaitu plasmid yang menyandi pembentukan toksin LT dan ST dan plasmid yang menyandi pembentukan toksin ST saja (Radji, 2010).

Toksin LT bekerja merangsang enzim adenilat siklase yang terdapat di dalam sel epitel mukosa usus halus, yang menyebabkan peningkatan permeabilitas sel epitel usus sehingga terjadi akumulasi cairan di dalam usus dan berakhir dengan diare. Toksin ST bekerja dengan mengaktifkan enzim guanilat siklase menghasilkan guanodin monofosfat siklik, menyebabkan gangguan absorpsi klorida dan natrium, serta dapat menurunkan motilitas usus halus (Radji, 2010).

c. Hemolisin

Pembentukan hemolisin diatur oleh plasmid. Galur *Escherichia coli* hemolitik ternyata lebih patogen daripada galur yang nonhemolitik (Radji, 2010).

3. Patogenesis

Kolonisasi *Escherichia coli* dalam saluran cerna manusia biasanya terjadi setelah 40 hari dilahirkan. *Escherichia coli* dapat melekat pada usus besar dan dapat bertahan selama beberapa bulan bahkan beberapa tahun. Perubahan populasi bakteri *Escherichia coli* terjadi dalam periode yang lama, hal ini dapat terjadi setelah infeksi usus atau setelah penggunaan kemoterapi atau antimikroba yang dapat membunuh flora normal (Radji, 2010).

Beberapa galur *Escherichia coli* menjadi penyebab infeksi pada manusia, seperti infeksi saluran kemih, infeksi meningitis pada neonatus, dan infeksi intestin (gastroenteritis). Infeksi *Escherichia coli* sering kali berupa diare yang disertai darah, kejang perut, demam, dan terkadang dapat menyebabkan gangguan pada ginjal. Infeksi *Escherichia coli* pada beberapa penderita, anak-anak di bawah 5 tahun, dan orang tua dapat menimbulkan komplikasi yang disebut dengan sindrom uremik hemolitik (Radji, 2010).

Sebagian besar penyakit yang disebabkan oleh infeksi *Escherichia coli* ditularkan melalui makanan yang tidak dimasak dan daging yang terkontaminasi. Penularan penyakit dapat terjadi melalui kontak langsung dan biasanya terjadi di tempat yang memiliki sanitasi dan lingkungan yang kurang bersih. Berdasarkan sifat virulensi, *Escherichia coli* dikelompokkan menjadi *Escherichia coli* yang menyebabkan infeksi intestin dan *Escherichia coli* yang menyebabkan infeksi ekstraintestin (Radji, 2010).

Escherichia coli yang menyebabkan infeksi Intestin :

a. *Escherichia coli* enteropatogenik (EPEC)

Enteropatogenik *Escherichia coli* menyebabkan diare yang cukup parah pada bayi dan dapat berlangsung selama lebih dari 2 minggu serta menyebabkan kematian jika terjadi dehidrasi parah (Rahayu dkk., 2018). Karakteristik utama dari EPEC adalah kemampuannya untuk menginduksi luka (*attaching-effacing*) pada saluran pencernaan dengan cara merusak mikrovili usus (Rahayu, dkk., 2018). EPEC memiliki fimbria, toksin yang tahan terhadap panas (ST), dan toksin yang tidak tahan panas (LT), serta menggunakan adhesin, yang dikenal dengan *intimin*, untuk melekat pada sel mukosa usus (Radji, 2010).

b. *Escherichia coli* enterotoksigenik (ETEC)

ETEC merupakan bakteri penyebab diare pada anak dan wisatawan yang bepergian ke daerah yang bersanitasi buruk (Radji, 2010). ETEC akan memproduksi enterotoksin. ETEC mengeluarkan toksin yang terdiri dari dua jenis, yaitu yang tidak tahan panas (*heat labile toxin* = LT) dan yang tahan panas (*heat stabile toxin* = ST). Strain ETEC dapat memproduksi salah satu atau kedua toksin tersebut, dan dapat menginduksi diare (Rahayu, dkk., 2018).

c. *Escherichia coli* enteroinvasif (EIEC)

Mekanisme patogenik EIEC mirip dengan patogenesis infeksi yang disebabkan oleh *Shigella* (Radji, 2010). Patogenesis EIEC cukup berbeda jika dibandingkan dengan *Escherichia coli* lainnya tetapi identik dengan shigellosis (yang disebabkan oleh *Shigella*) yaitu infeksi disebabkan oleh penetrasi bakteri dan kerusakan mukosa usus (Rahayu, dkk., 2018).

EIEC masuk dan berkembang dalam epitel sel-sel kolon sehingga menyebabkan kerusakan pada sel kolon. Gejala klinis yang ditimbulkan oleh infeksi EIEC mirip dengan gejala diare yang disebabkan oleh *Shigella* (Radji, 2010).

d. *Escherichia coli* enterohemoragik (EHEC)

Enterohemoragik *Escherichia coli* merupakan kelompok *Escherichia coli* yang dapat menyebabkan diare atau kolitis berdarah pada manusia (Rahayu, dkk., 2018). Jenis bakteri ini menghasilkan suatu toksin yang dikenal dengan verotoksin. EHEC dapat menyebabkan kolitis berdarah (yakni diare berat yang disertai perdarahan) dan sindrom uremik hemolitik atau *Hemolytic Uremic Syndrom/HUS* (yakni gagal ginjal akut yang disertai anemia hemolitik mikroangiopatik dan trombositopenia) (Radji, 2010).

e. *Escherichia coli* enteroagregatif (EAEC)

EAEC melekat pada sel manusia dengan pola khas dan menyebabkan diare yang tidak berdarah, tidak menginvasi, dan tidak menyebabkan inflamasi pada mukosa intestin. EAEC diperkirakan memproduksi EAST (*entero aggregative ST toxin*), yang merupakan suatu enterotoksin yang tidak tahan panas (Radji, 2010).

Escherichia coli yang menyebabkan infeksi ekstraintestin :

a. *Escherichia coli* uropatogenik (UPEC)

UPEC menyebabkan kira-kira 90% infeksi saluran kandung kemih mulai dari sistitis sampai pielonefritis. Bakteri yang berkolonisasi berasal dari tinja atau daerah perineum saluran urine yang masuk ke dalam kandung kemih. Bakteri yang terdapat pada daerah periureteral tersebut pada akhirnya masuk ke dalam kandung kemih ketika melakukan hubungan seksual. Dengan bantuan adhesin, UPEC dapat berkolonisasi pada kandung kemih penderita. Protein penting adhesin yang dikaitkan dengan patogenisitas UPEC adalah P-fimbria atau PAP (pili yang menyebabkan pielonefritis [*pyelonephritis-associated pili*]). Fimbria ini tidak saja dapat berikatan dengan sel darah merah, tetapi juga dapat berikatan dengan senyawa galaktosa yang terdapat pada permukaan sel-sel epitel saluran kemih (Radji, 2010).

b. *Escherichia coli* meningitis neonatus (NMEC)

NMEC dapat menyebabkan meningitis pada bayi baru lahir. Perjalanan infeksi biasanya terjadi setelah *Escherichia 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 respons reaksi imunitas hospes (Radji, 2010).

F. *Most Probable Number* (MPN)

Metode MPN biasa digunakan untuk uji kualitas air ataupun bahan pangan serta produk olahan. Metode MPN biasanya dilakukan untuk menghitung jumlah mikroba di dalam sampel yang berbentuk cair, meskipun dapat pula digunakan untuk sampel padat dengan terlebih dahulu membuat suspensi 1:10 dari sampel

tersebut. Media yang digunakan untuk metode MPN adalah *Lactose Broth (LB)* atau *Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLBB)*. Metode MPN dapat digunakan untuk menghitung jumlah mikroba jenis tertentu yang terdapat di antara mikroba-mikroba lainnya (Rahayu dan Nurwitri, 2012).

Mikroba yang dapat memfermentasi laktosa dihitung dengan menggunakan media LB atau BGLBB yang dilengkapi dengan tabung Durham, untuk media lainnya dapat digunakan tabung MPN tanpa tabung Durham di mana tabung positif ditandai dengan timbulnya kekeruhan setelah inkubasi (Rahayu dan Nurwitri, 2012)

Metode MPN terdiri dari tiga tahap, yaitu uji pendugaan (*presumptive test*), uji penetapan (*confirmed tes*), dan uji kelengkapan (*completed test*). Dalam uji tahap pertama, keberadaan *coliform* masih dalam tingkat probabilitas rendah; masih dalam dugaan. Uji ini mendeteksi sifat fermentatif *coliform* dalam sampel. Karena beberapa jenis bakteri selain *coliform* juga memiliki sifat fermentatif, diperlukan uji konfirmasi untuk mengetes kembali kebenaran adanya *coliform* dengan bantuan medium selektif diferensial. Uji kelengkapan kembali meyakinkan hasil tes uji konfirmasi dengan mendeteksi sifa fermentatif dan pengamatan mikroskop terhadap ciri-ciri *coliform* yaitu berbentuk batang, gram negatif, tidak berspora (Ramadhani dan Wahyuni, 2020).

Secara umum, penentuan tabung positif yang menandakan ada pertumbuhan mikroba diamati berdasarkan pada hal-hal berikut ini (Rahayu dan Nurwitri, 2012) :

1. Adanya kekeruhan
2. Produk hasil akhir dari metabolisme suatu mikroba., yaitu :

- a. Produksi gas: adanya gas yang terperangkap dalam tabung Durham terdeteksi jika hasil reaksi terdapat gelembung gas pada akhir periode inkubasi yang ditandai dengan setidaknya 20% volume tabung atau hampir seluruh tabung terlihat kosong atau tidak ada medium cairnya.
- b. Produksi asam-basa setelah inkubasi: adanya asam/basa dilihat dengan mengukur nilai pH atau dengan melihat derajat keasaman pada tiap-tiap tabung yang berisi media yang mengandung zat indikasi warna pH.
- c. Terjadinya perubahan warna media: hal ini untuk mendeteksi proses pembentukan senyawa pereduksi dengan adanya aseptor elektron seperti resazurin, biru metilen, atau *2,3,5-triphenylterrazoliumchloride*.
- d. Lainnya: media yang spesifik lainnya dapat digunakan untuk mengetahui aktivitas metabolis tertentu seperti reduksi nitrat (NO₃), produksi indol, hidrolisis pada pati, dan produksi H₂S tergantung dari informasi yang diharapkan terdapat pada sampel pangan.

Output metode MPN adalah nilai MPN. Nilai MPN adalah perkiraan jumlah unit tumbuh (*growth unit*) atau unit pembentuk-koloni (*colony-forming unit*) dalam sampel. Namun, pada umumnya, nilai MPN juga diartikan sebagai perkiraan jumlah individu bakteri. Satuan yang digunakan, umumnya per 100 ml. atau per gram. Jadi misalnya terdapat nilai MPN 10/g dalam sebuah sampel air, artinya dalam sampel air tersebut diperkirakan setidaknya mengandung 10 *coliform* pada setiap gramnya. Makin kecil nilai MPN, maka air tersebut makin tinggi kualitasnya, dan makin layak minum. Metode MPN memiliki limit kepercayaan 95 %, sehingga pada setiap nilai MPN terdapat jangkauan nilai MPN terendah dan nilai MPN tertinggi (Ramadhani dan Wahyuni, 2020).

Hasil analisa metode MPN didapatkan dari mencocokkan dengan tabel *Formula Thomas* atau yang lebih dikenal dengan nama tabel *MPN US Food and Drug Administration's Bacterial Analytical Manual (BAM)*, yaitu tabel yang memberikan *The Most Probable Number* atau Jumlah Perkiraan Terdekat, tergantung dari kombinasi tabung positif (yang mengandung bakteri *coliform/coliform fecal*) dan negatif (yang tidak mengandung bakteri *coliform/coliform fecal*) dari kedua tahap tes (Trisnawati dan Suregar, 2021).

Metode MPN terdiri dari tiga tahap yaitu :

1. Uji penduga (*presumptive test*)

Uji penduga (*presumptive test*), uji ini dilakukan untuk menduga keberadaan *coliform* dalam suatu sampel. uji dilakukan dalam medium fermentasi kaldu laktosa (*Lactose Broth*) yang berisi tabung durham. Uji dinyatakan positif jika terbentuk gas pada tabung durham, karena bakteri *coliform* mampu memfermentasikan laktosa dengan menghasilkan gas ($\geq 10\%$) yang merupakan khasnya. Uji penduga dapat menunjukkan kuantitas mikroorganisme *coliform* yang merupakan jumlah perkiraan terdekat (MPN: *Most Probable Number*). MPN didapatkan dengan menghitung jumlah tabung positif tiap seri setelah 24 jam inkubasi pada suhu 44°C. Jumlah tabung tersebut dicocokkan dengan tabel MPN yang sesuai dengan jumlah seri tabung yang digunakan. (Martani, 2020).

2. Uji penegasan atau penentu (*confirmed test*)

Uji penegasan atau penentu (*confirmed test*), konfirmasi dari uji pendugaan perlu dilakukan, karena nilai positif (gas) dari uji pertama dapat juga merupakan reaksi dari bakteri non-*Escherichia coli*. Uji penentu memerlukan medium selektif atau diferensial, misalnya BGLB (*Brilliant Green Lactose Broth*)

dengan dilengkapi tabung durham. Umumnya digunakan BGLB dengan tabung durham karena diketahui *ox-bile* dan *brilliant green* dalam BGLB mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif yang mampu memfermentasikan laktosa seperti *Clostridia*. Syarat uji bernilai positif sama dengan uji pendugaan. Bila dalam tahap ini di dalam kultur uji masih terbentuk gas, maka sampel air dinyatakan positif *Escherichia coli* (Martani, 2020).

3. Uji pelengkap (*completed test*)

Uji pelengkap (*completed test*) uji ini merupakan analisis akhir dari sampel untuk mendeteksi keberadaan bakteri *Escherichia coli*. Metode yang digunakan adalah pengecatan gram terhadap bakteri yang muncul atau tumbuh pada media EMB agar pada uji penentu. Bila karakter koloni berwarna hijau metalik dan hasil pengamatan dengan mikroskop menunjukkan bakteri berbentuk batang, gram-negatif, tidak berspora tersebut adalah *Escherichia coli* dan uji pelengkap bernilai positif (Martani, 2020).