

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. Keamanan Pangan**

##### **2.1.1. Definisi Pangan**

Pangan adalah istilah umum untuk semua yang dapat dijadikan makanan (Sunita, 2001). Sedangkan menurut Sagung Seto, pangan adalah kebutuhan dasar yang sangat penting bagi kehidupan setiap insan baik secara fisiologis, psikologis, sosial maupun antropologis.

##### **2.1.2. Keamanan Pangan**

Keamanan pangan muncul sebagai suatu masalah yang dinamis seiring dengan berkembangnya peradaban manusia dan kemajuan ilmu teknologi, maka diperlukan suatu sistem dalam mengawasi pangan sejak produksi, diolah, ditangani, diangkat, disimpan dan didistribusikan serta dihidangkan kepada konsumen. Berbagai jenis atau produk pangan mungkin dapat menimbulkan masalah keamanan pangan. (Seto, 2001)

#### **2.2. Pengertian Higiene dan Sanitasi**

Higiene adalah upaya kesehatan dengan cara memelihara dan melindungi kebersihan subyeknya seperti mencuci tangan dengan air bersih dan sabun untuk melindungi kebersihan tangan, mencuci piring untuk kebersihan piring, membuang bagianmakanan yang rusak untuk melindungi keutuhan makanan secara keseluruhan (Depkes RI, 2004).

Higiene adalah suatu usaha pencegahan penyakit yang menitikberatkan pada usaha kesehatan perseorangan atau manusia beserta lingkungan tempat orang tersebut berada (Widyati, 2002).

Sanitasi adalah upaya kesehatan dengan cara memelihara dan melindungi kebersihan lingkungan dari subyeknya. Misalnya menyediakan air yang bersih untuk keperluan mencuci tangan, menyediakan tempat sampah untuk mewadai sampah agar tidak dibuang sembarangan (Depkes RI, 2004). Sanitasi adalah suatu upaya pencegahan penyakit yang menitikberatkan kegiatan pada usaha kesehatan lingkungan hidup manusia ( Widyati, 2002).

Higiene dan sanitasi tidak dapat dipisahkan satu dengan yang lain karena erat kaitannya. Misalnya Higienya sudah baik karena mau mencuci tangan, tetapi sanitasinya tidak mendukung karena tidak cukup tersedianya air bersih, maka mencuci tangan tidak sempurna. (Depkes RI, 2004).

### **2.3. Higiene Sanitasi Makanan dan Minuman**

Sanitasi makanan adalah salah satu usaha pencegahan yang menitikberatkan kegiatan dan tindakan yang perlu untuk membebaskan makanan dan minuman dari segala bahaya yang dapat mengganggu atau merusak kesehatan, mulai dari sebelum makanan diproduksi, selama dalam proses pengolahan, penyimpanan, pengangkutan, sampai pada saat di mana makanan dan minuman tersebut siap untuk dikonsumsi kepada masyarakat atau konsumen (Depkes RI, 2004 ). Menurut Kusnoputranto (1986), sanitasi makanan ini bertujuan untuk :

1. Menjamin keamanan dan kemurnian makanan.
2. Mencegah konsumen dari penyakit.
3. Mencegah penjualan makanan yang akan merugikan pembeli.
4. Mengurangi kerusakan/pemborosan makanan.

Di dalam upaya sanitasi makanan ini, terdapat beberapa tahapan yang harus diperhatikan, yaitu sebagai berikut ( Chandra, 2007 ) :

1. Keamanan dan kebersihan produk makanan yang diproduksi.
2. Kebersihan individu dalam pengolahan makanan.
3. Keamanan terhadap penyediaan air.
4. Pengelolaan pembuangan air limbah dan kotoran.
5. Perlindungan makanan terhadap kontaminasi selama proses pengolahan, penyajian dan penyimpanan.
6. Pencucian dan pembersihan peralatan alat perlengkapan.

## 2.4. Tanaman Tebu

### 2.4.1 Definisi Tanaman Tebu

Tebu (*Saccharum officinarum*) merupakan tanaman yang berasal dari Guinea. Tanaman ini termasuk ke dalam kelompok *Gramineae* (rumputrumputan). Tebu merupakan tanaman dengan aktifitas fotosintesis yang tertinggi (aktifitasnya bila dibandingkan dengan tanaman lainnya sekitar 150-200 persen). Tebu merupakan tanaman tahunan yang terus tumbuh dengan memiliki kemampuan adaptasi yang baik. Tumbuh dengan tinggi antara 3-5 meter dan mengandung sukrosa antara 11-16% . Tebu merupakan tanaman yang tumbuh dengan baik di Indonesia. Menurut data yang berhasil dihimpun, perkebunan tebu di Indonesia mencapai luas areal dengan kisaran 321 ribu hektar, 64,74% diantaranya terdapat di pulau Jawa (Departemen Pertanian, 2004).

Tebu adalah tanaman tropis yang mirip sifatnya dengan sorgum. Pemanenan tebu bertujuan untuk memproduksi batang tebu yang memiliki kandungan sukrosa tinggi, yaitu sekitar 10-15% dari total nira tebu. Kebanyakan sukrosa disimpan di bagian dalam batang tebu yang kemudian diekstrak, mengandung antioksidan, dan komponen lainnya yang terkandung di dalam batang tebu (Koge, dkk., 2003).

Tebu mengandung flavonoid seperti *apigenin* dan *luteoleidin*. Akar dan batangnya digunakan di klinik kesehatan untuk perawatan kulit dan infeksi kandung kemih, juga gangguan hati, dan kehilangan kemampuan memproduksi susu, batuk dan anemia. Komponen *phenol* yang terdapat pada tebu juga dikenal bermanfaat bagi kesehatan karena bersifat anti bakteri (Pallavi, dkk., 2012).

### 2.4.2 Nira tebu

Nira tebu adalah cairan yang diperoleh dari pemerasan batang tebu. Nira tebu berbentuk suspensi berwarna gelap dan mengandung gula dengan sejumlah udara yang membentuk buih dari permukaannya. Nira tebu mengandung 75 persen air, sedangkan sisanya serat 13 persen dan padatan terlarut sebesar 12 persen. (Dewi, 2007).

Nira mempunyai sifat yang tidak tahan lama disimpan, setelah 4 jam akan terjadi penurunan pH, hal ini disebabkan terjadinya proses fermentasi oleh khamir. Untuk menjaga agar supaya tidak terjadi proses fermentasi selama penyimpanan, maka perlu dicari cara terbaik untuk mempertahankan mutu nira tersebut (Laksamahardja, 1993).

### 2.4.3 Komposisi Nira Tebu

Sukrosa yang terkandung dalam nira tebu serta selulosa dalam serat merupakan dua komponen utama penyusun tanaman tebu, masing-masing komponen tersebut tersusun atas bahan-bahan gula sederhana. Sukrosa atau yang biasa dikenal sebagai gula pasir merupakan gabungan dari glukosa dan fruktosa.

Selulosa yang merupakan serat-serat penyusun ampas adalah suatu polimer dari glukosa. Komponen yang terkandung dalam nira tebu dapat dilihat pada table 2. Secara bebas tanpa berikatan, glukosa, dan fruktosa ditemukan pada tebu dalam jumlah yang lebih sedikit dibanding dengan sukrosa. Oleh karena itu kandungan gula yang tertinggi yang terdapat pada nira tebu ialah sukrosa dibandingkan dengan glukosa dan fruktosa. (Lahay, 2009).

Tabel 2.1 Komposisi Kimia dan Nilai gizi nira tebu per 100 gram bahan

Komposisi Nira Tebu	Jumlah
Air	70-75 %
Sukrosa	11-16 %
Gula Reduksi	0,4-2 %
Organik Non Gula	0,5-1 %
Mineral	0,5-1 %
Serat	10-16 %

Sumber: Loto, dkk., 2012.

## 2.5. Mikroba Pada Makanan

### 2.5.1 Jenis-jenis Mikroba Pada Makanan

Mikroorganisme atau mikroba adalah organisme yang sangat kecil, biasanya bersel tunggal dan secara individual tidak dapat dilihat dengan mata telanjang. Mikroba hanya dapat dilihat dengan bantuan mikroskop (Sherrington, 1994).

Akibat mikroorganisme yang tersebar luas di alam lingkungan, produk pangan jarang sekali yang steril dan umumnya tercemar oleh berbagai mikroorganisme karena bahan pangan tersebut juga sebagai sumber makanan bagi perkembangan mikroorganisme (Buckle, 1987).

Kelompok mikroorganisme yang umumnya berhubungan dengan bahan pangan adalah bakteri, jamur, dan virus. Jenis-jenis mikroorganisme tersebut antara lain :

#### 1. Bakteri

Bakteri adalah mikroorganisme bersel tunggal yang tidak terlihat oleh mata, tetapi dengan bantuan mikroskop, mikroorganisme tersebut akan tampak. Ukuran bakteri berkisar antara panjang 0,5 – 10  $\mu$  dan lebar 0,5 – 2,5  $\mu$  tergantung dari jenisnya. Hampir semua bakteri mempunyai struktur yang sama walaupun bentuknya berbeda.

Berdasarkan morfologinya, bakteri dibagi atas empat golongan yaitu :

- a. Bentuk bulat atau cocci (*coccus*)
- b. Bentuk batang atau bacili (*bacillus*)
- c. Bentuk spiral atau spirilli (*spirillum*)
- d. Bentuk koma atau vibrios (*vibrio*)

Satu sifat yang penting dalam hubungannya dengan mikrobiologi pangan adalah kemampuan beberapa jenis bakteri untuk memproduksi struktur internal yaitu endospora. Spora – spora ini tahan terhadap keadaan fisik atau kimiawi yang ekstrim seperti suhu, kekeringan dan

bahan – bahan kimia pembasmi kuman dan dapat bertahan dalam keadaan tidur untuk beberapa tahun.

## 2. Jamur

Jamur merupakan mikroorganisme yang multiseluler dan tidak berklorofil. Jamur terdiri untaian benang tipis disebut *hifa*. Jamur dapat bersifat parasit maupun saprofit. Ada jamur yang bersel tunggal dan membelah diri secara bertunas yang disebut khamir.

Khamir mempunyai peranan penting dalam industri makanan. Banyak kegiatannya dalam makanan memang dikehendaki dan banyak dimanfaatkan dalam pembuatan bir, anggur, minuman keras, roti dan produk makanan terfermentasi, dan juga merupakan sumber potensial dari protein sel tunggal untuk fortifikasi makanan ternak. Galur (*strain*) *saccharomyces cerevisiae* hingga saat ini yang paling banyak digunakan untuk keperluan diatas. Pertumbuhan khamir dapat juga mengakibatkan kerusakan bahan pangan, beberapa jenis khamir pembusuk dikenal adalah : *Saccharomyces Rouxii*, *Debaromyces Hansenii*, *Hanseniaspora Uvarum*, *Saccharomyces Cerevisiae*, *Candida Krusei*, *Schizosaccharomices Octosporus* dan *Rhodotorula Glutinus*.

## 3. Virus

Virus adalah satu golongan mikroorganisme yang tidak mempunyai struktur sel, terdiri dari inti asam nukleat yang dibungkus dengan selubung protein.

Virus berbeda dengan organisme seluler dalam struktur, komposisi kimia dan cara pertumbuhannya, berukuran sangat kecil (jauh lebih kecil dari bakteri) dan hanya dapat dilihat apabila menggunakan mikroskop elektron. Virus dapat berada disemua organisme yang mempunyai sel. Semua virus pertumbuhannya tergantung pada kondisi dinding sel inang. Virus dapat hidup di luar sel inang dan selalu terdapat dalam tanah, air dan substrat seperti bahan pangan, tetapi hanya berkembang biak dan mengakibatkan infeksi setelah masuk kedalam sel inang.

#### 4. Protozoa

Protozoa merupakan binatang kecil bersel tunggal dan bersifat motil yaitu dapat melakukan gerakan sendiri. Dapat memperbanyak diri dengan pembelahan biner yaitu membelah diri menjadi dua belahan. Protozoa dapat menginfeksi melalui air dan makanan.

##### 2.5.2 Peranan Mikroba Dalam Makanan

Mikroba tersebar luas di lingkungan, termasuk dalam bahan maupun produk pangan. Bahan makanan selain merupakan sumber gizi bagi manusia, juga sebagai sumber makanan bagi perkembangan mikroorganisme. Bahan makanan terdiri dari protein, lemak, karbohidrat, dan vitamin dan mineral dimana zat – zat tersebut merupakan medium protein, memfermentasikan karbohidrat dan menjadikan minyak dan lemak berbau tengik. Beberapa peranan mikroba dalam bahan makanan adalah sebagai berikut (Pelzcar , 1998) :

1. Sebagai indikator mutu bahan makanan
2. Sebagai penyebab kerusakan makanan
3. Sebagai bahan pembuatan produk pangan khusus
4. Sebagai sumber penyakit yang berasal dari makanan.

##### 2.6. Bakteri Indikator Polusi

Bakteri indikator polusi adalah bakteri yang dapat digunakan sebagai petunjuk adanya polusi feses atau kotoran manusia atau hewan. Mikroorganisme yang digunakan sebagai indikator polusi adalah bakteri yang tergolong *Escherichia coli*, *Streptokokus fekal*, dan *Clostridium perferingens*.

Beberapa alasan pemilihan bakteri-bakteri tersebut adalah sebagai berikut :

1. Bakteri-bakteri tersebut dapat digunakan sebagai indikator kontaminasi kotoran karena terdapat dalam jumlah besar dalam kotoran manusia dan hewan, dimana bakteri tersebut merupakan bakteri komensaldi dalam saluran pencernaan manusia dan hewan.

2. Bakteri-bakteri tersebut pada umumnya tidak tumbuh di dalam saluran pencernaan organisme lainnya kecuali manusia dan hewan berdarah panas.
3. Bakteri indikator harus selalu terdapat di dalam contoh dimana ditemukan mikroorganisme patogen enterik.
4. Bakteri indikator harus dapat hidup lebih lama dibandingkan dengan bakteri patogen enterik yang berbahaya.
5. Prosedur untuk uji bakteri indikator harus sangat spesifik yang berarti tidak memberikan hasil positif yang salah, dan sangat sensitif yang berarti dapat mendeteksi adanya bakteri indikator dalam jumlah yang sangat kecil.
6. Prosedur untuk uji bakteri indikator harus relatif mudah di kerjakan.
7. Prosedur untuk uji bakteri indikator harus aman yang berarti tidak boleh membahayakan bagi kesehatan orang yang melakukannya.
8. Jumlah bakteri indikator harus dapat menunjukkan tingkat polusi yang berarti kira-kira jumlahnya sebanding dengan jumlah mikroorganisme patogen yang terdapat di dalam air.

Syarat-syarat bakteri indikator tersebut mungkin tidak selalu dapat dipenuhi karena bakteri indikator mungkin berbeda dalam hal toleransi terhadap suhu, tingkat klorinasi, dan terhadap konsentrasi garam. Sifat masing-masing bakteri indikator perlu diketahui untuk dapat melakukan uji yang tepat (Fardiaz, 1992).

### **2.7. Bakteri *Coliform***

Bakteri *Coliform* merupakan suatu grup bakteri yang digunakan sebagai indikator adanya polusi kotoran dan kondisi yang tidak baik terhadap air dan makanan. *Coliform* sebagai suatu kelompok dicirikan sebagai bakteri batang, gram negatif, tidak membentuk spora dan anaerobik fakultatif yang memfermentasi laktosa dengan menghasilkan asam dan gas dalam waktu 48 jam pada suhu 35°C. Bakteri koliform yang berada di dalam makanan/minuman



menunjukkan kemungkinan adanya mikroba yang bersifat enteropatogenik dan atau toksigenik yang berbahaya bagi kesehatan. Bakteri *Coliform* mempunyai banyak spesies diantaranya *Escherichia coli*. Bakteri ini indikator sanitasi yang keberadaannya dalam pangan menunjukkan bahwa air atau makanan tersebut pernah tercemar oleh feses manusia. Bakteri sanitasi bakteri yang dapat ditemukan dalam usus besar manusia. Kebanyakan *Escherichia coli* tidak berbahaya, tetapi beberapa, dapat mengakibatkan keracunan makanan yang serius pada manusia yaitu diare berdarah karena eksotoksin yang dihasilkan bernama verotoksin (Widianti, 2004).

Bakteri coliform dalam air minum dikategorikan menjadi tiga golongan, yaitu coliform total, fecal coliform, dan *E. coli*. Masing-masing memiliki tingkat risiko yang berbeda. Coliform total kemungkinan bersumber dari lingkungan dan tidak mungkin berasal dari pencemaran tinja. Sementara itu, fecal coliform dan *E. coli* terindikasi kuat diakibatkan oleh pencemaran tinja, keduanya memiliki risikolebih besar menjadi patogen di dalam air. Bakteri fecal coliform atau *E. coli* yang mencemari air memiliki risiko yang langsung dapat dirasakan oleh manusia yang mengonsumsinya. Kondisi seperti ini mengharuskan pemerintah bertindak melalui penyuluhan kesehatan, investigasi, dan memberikan solusi untuk mencegah penyebaran penyakit yang ditularkan melalui air (Hartini, 2009).

## **2.8. *Escherichia coli***

*Escherichia coli* merupakan flora normal saluran pencernaan manusia dan hewan. Sejak 1940 di Amerika Serikat telah ditemukan strain-strain *E.coli* yang tidak merupakan flora normal saluran pencernaan. Strain tersebut dapat menyebabkan diare pada bayi. Serotipe dari *E. coli* yang dapat menyebabkan diare pada manusia disebut *E.coli enteropatogenik*.

Berdasarkan sifat patogenik dan produksi toksin nya, strain enteropatogenik *E.Coli* (EPEK) dapat dibedakan menjadi dua grup. Grup I terdiri dari strain yang bersifat patogenik, tapi tidak dapat memproduksi toksin, sedangkan grup II terdiri dari strain yang memproduksi enterotoksin, dan menyebabkan gejala enterotoksigenik, menyerupai gejala penyakit kolera yang disebabkan oleh *vibrio cholerae*. Strain yang termasuk grup II ini disebut *E.coli*

enterotoksigenik (ETEC atau ETEK), dan merupakan bakteri penyebab diare yang banyak menyerang bayi (anak-anak di bawah 2 tahun) (Supardi,1999).

### 2.8.1 Klasifikasi Bakteri *Escherichia coli*

*E. coli* adalah kuman oportunistis yang banyak ditemukan di dalam usus besar manusia sebagai flora normal. Bakteri ini bersifat unik karena dapat menyebabkan infeksi primer pada usus, misalnya diare pada anak, seperti juga kemampuannya menimbulkan infeksi pada jaringan tubuh lain di luar usus. *Escherichia coli* terdiri dari 2 spesies yaitu : *E. coli* dan *E. hermanis* (Zuhri, 2009).

Berikut ini klasifikasi dari bakteri *E. coli*.

Devisi : *Protophyta*

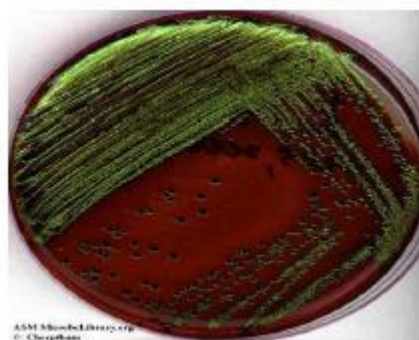
Klas : *Schizomycetes*

Ordo : *Eubacteriales*

Familia : *Enterobacteriaceae*

Genus : *Escherichia*

Spesies : *Escherichia coli* (Dwidjoseputro, 1990).



Gambar 2.1 Koloni bakteri *E. coli*

(Pelczar dan Chan, 2006)

### 2.8.2 Sifat-sifat *Escherichia coli*

*E. coli* dalam jumlah yang banyak bersama-sama tinja, akan mencemari lingkungan. *E. Coli thermotoleran* adalah strain *E. coli* yang dapat hidup pada suhu biakan 44,50C dan merupakan indikator pencemaran air dan makanan oleh tinja. *E. coli* merupakan bakteri batang

gram negatif, tidak berkapsul, umumnya mempunyai fimbria dan bersifat *motile*.

Sel *E. Coli* mempunyai ukuran panjang 2,0 – 6,0  $\mu\text{m}$  dan lebar 1,1-1,5  $\mu\text{m}$ , tersusun tunggal, berpasangan dengan *flagella peritikus*. Bakteri relatif sangat sensitif terhadap panas dan dapat diinaktifkan pada suhu pasteurisasi makanan atau selama pemasakan makanan (Supardi, 1999).

## **2.9. Angka Lempeng Total**

Metode kuantitatif digunakan untuk mengetahui jumlah mikroba yang ada pada suatu sampel, umumnya dikenal dengan Angka Lempeng Total (ALT). Uji Angka Lempeng Total (ALT) dan lebih tepatnya ALT aerob mesofil atau anaerob mesofil menggunakan media padat dengan hasil akhir berupa koloni yang dapat diamati secara visual berupa angka dalam koloni (cfu) per ml/gram atau koloni/100ml. Cara yang digunakan antara lain dengan cara tuang, cara tetes, dan cara sebar (BPOM, 2008).

Prinsip pengujian Angka Lempeng Total menurut Metode Analisis Mikrobiologi (MA PPOM 61/MIK/06) yaitu pertumbuhan koloni bakteri aerob mesofil setelah cuplikan diinokulasikan pada media lempeng agar dengan cara tuang dan diinkubasi pada suhu yang sesuai. Pada pengujian Angka Lempeng Total digunakan PDF (Pepton Dilution Fluid) sebagai pengencer sampel dan menggunakan PCA (Plate Count Agar) sebagai media padatnya. Digunakan juga pereaksi khusus Tri Phenyl Tetrazolium Chloride 0,5 % (TTC) (Dirjen POM, 2000).

Metode yang digunakan untuk menentukan jumlah mikroba dalam bahan pangan antara lain dengan metode permukaan. Agar steril terlebih dahulu dituangkan kedalam cawan petri dan dibiarkan membeku. Setelah membeku dengan sempurna, kemudian sebanyak 0,1 ml contoh yang telah diencerkan di pipet pada permukaan agar tersebut. Sebuah batang gelas melengkung (*hockey stick*) dicelupkan kedalam alkohol 95% dan dipijarkan sehingga alkohol habis terbakar. Setelah dingin batang gelas melengkung tersebut digunakan untuk meratakan contoh diatas medium agar dengan cara memutar cawan petri diatas meja. Selanjutnya inkubasi dan perhitungan koloni dilakukan seperti pada metode penuangan, tetapi harus diingat bahwa jumlah contoh yang ditumbuhkan adalah

0,1 ml dan harus dimasukkan dalam perhitungan "Total Count" (Thayib dan Amar, 1989).

### 2.9.1 Syarat Uji Angka Lempeng Total

Metode hitungan cawan didasarkan pada anggapan bahwa setiap sel yang dapat hidup akan berkembang menjadi satu koloni. Jadi jumlah koloni yang muncul pada cawan merupakan suatu indeks bagi jumlah organisme yang dapat hidup yang terkandung dalam sampel. Dan mencawakan hasil pengenceran tersebut. Setelah inkubasi, jumlah koloni masing-masing cawan diamati. Untuk memenuhi persyaratan statistik, cawan yang dipilih untuk penghitungan koloni ialah yang mengandung antara 30 sampai 300 koloni. Karena jumlah mikroorganismenya dalam sampel tidak diketahui sebelumnya, maka untuk memperoleh sekurang-kurangnya satu cawan yang mengandung koloni dalam jumlah yang memenuhi syarat tersebut maka harus dilakukan sederatan pengenceran dan pencawanan. Jumlah organisme yang terdapat dalam sampel asal ditentukan dengan mengalikan jumlah koloni yang terbentuk dengan faktor pengenceran pada cawan yang bersangkutan. Cara ini yang paling umum digunakan untuk perhitungan jumlah mikrobia. Dasarnya ialah membuat suatu seri pengenceran bahan dengan kelipatan 10 dari masing-masing pengenceran diambil 1 cc dan dibuat taburan dalam petridish (*pour plate*) dengan medium agar yang macam caranya tergantung pada macamnya mikrobia. Setelah diinkubasikan dihitung jumlah koloni tiap petridish dapat ditentukan jumlah bakteri tiap cc atau gram contoh, yaitu dengan mengalikan jumlah koloni dengan kebalikan pengencerannya, misalnya untuk pengenceran 1:10.000 terdapat 45 koloni bakteri maka tiap cc atau gram bahan mengandung 450.000 bakteri. Untuk membantu menghitung jumlah koloni dalam petridish dapat digunakan *colony counter* yang biasanya dilengkapi *electronic register*. Menurut Jutono, dkk., (1973), perhitungan dengan cara ini diperlukan beberapa syarat yang harus dipenuhi yaitu:

1. Jumlah bakteri tiap petridish antara 30-300 koloni, jika memang tidak ada yang memenuhi syarat dipilih yang jumlahnya mendekati 300.
2. Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas petridish, koloni tersebut dikenal sebagai *spreader*.
3. Hasil yang dilaporkan hanya terdiri dari dua angka, yaitu angka pertama didepan koma dan angka kedua dibelakang koma.
4. Jika semua pengenceran yang dibuat menghasilkan angka kurang 30 koloni pada cawan petri, hanya jumlah koloni pada pengenceran terendah yang dihitung. Hasil dilaporkan sebagai kurang dari 30 dikalikan dengan besarnya pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung.
5. Jika semua pengenceran yang dibuat menghasilkan lebih dari 300 koloni pada cawan petri, hanya koloni pada pengenceran tertinggi yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai lebih besar dari 300 dikalikan dengan besarnya pengenceran, jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung.
6. Jika cawan dari dua tingkat pengenceran menghasilkan koloni dengan jumlah antara 30 dan 300, dan perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah dari kedua pengenceran tersebut lebih kecil atau sama dengan 2 maka tentukan rata-rata dari kedua nilai tersebut dengan memperhitungkan pengencerannya. Jika perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah lebih besar dari 2, yang dilaporkan hanya hasil yang terkecil.

### **2.9.2 Keuntungan dan Kelemahan Metode Uji Angka Lempeng Total**

Keuntungan dari metode pertumbuhan agar atau metode uji Angka Lempeng Total adalah dapat mengetahui jumlah mikroba yang dominan. Keuntungan lainnya dapat diketahui adanya mikroba jenis

lain yang terdapat alam contoh. Adapun kelemahan dari metode ini menurut Buckle (1987), adalah:

1. Kemungkinan terjadinya koloni yang berasal lebih dari satu sel mikroba, seperti pada mikroba yang berpasangan, rantai atau kelompok sel. Kemungkinan ini akan memperkecil jumlah sel mikroba yang sebenarnya.
2. Kemungkinan adanya jenis mikroba yang tidak dapat tumbuh karena penggunaan jenis media agar, suhu, pH, atau kandungan oksigen selama masa inkubasi.
3. Koloni dari beberapa mikroorganisme terutama dari contoh bahan pangan, kadang-kadang menyebar di permukaan media agar, sehingga menutupi pertumbuhan dan perhitungan jenis mikroba lainnya.
4. Penghitungan dilakukan pada media agar yang jumlah populasi mikrobanya antara 30–300 koloni. Bila jumlah populasi kurang dari 30 koloni akan menghasilkan penghitungan yang kurang teliti secara statistik, namun bila lebih dari 300 koloni akan menghasilkan hal yang sama karena terjadi persaingan diantara koloni.
5. Penghitungan populasi mikroba dapat dilakukan setelah masa inkubasi yang umumnya membutuhkan waktu 24 jam atau lebih.

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

Metode Most Probable Number (MPN) digunakan untuk uji kualitas bakteriologis air. Metode MPN terdiri dari 3 tahapan, yaitu uji pendugaan (Presumptive Tes), uji penguat (Confirmed Tes), dan uji kelengkapan (Completed tes) (Shodikin 2007). Perhitungan didasarkan pada tabung yang positif, yaitu tabung menunjukkan pertumbuhan mikroba setelah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu dan dapat diketahui dari gelembung gas yang dihasilkan pada tabung Durham. Nilai MPN ditentukan dengan kombinasi jumlah tabung positif (asam dan gas) tiap serinya setelah diinkubasi (Waluyo, 2009).

Metode MPN dapat digunakan untuk menghitung jumlah koloni mikroba yang terdapat diantara campuran mikroba lainnya. Sebagai contoh, jika digunakan Lactose Broth maka adanya bakteri yang dapat memfermentasi laktosa ditunjukkan dengan terbentuknya gas di dalam tabung Durham. Cara ini bisa digunakan untuk menentukan MPN *Coliform* terhadap air atau minuman karena bakteri *Coliform* termasuk bakteri yang dapat memfermentasi laktosa. Dalam metode MPN menghitung jumlah jasad renik biasa digunakan dalam contoh yang berbentuk cair, Meskipun dapat pula digunakan untuk contoh berbentuk padat dengan terlebih dahulu membentuk suspensi 1:10 dari contoh tersebut (Waluyo, 2009).

Kelebihan metode *Most Probable Number* (Jay, 2000):

1. Sederhana
2. Hasil uji bisa dibandingkan dengan SPC
3. Organisme spesifik dapat ditentukan dengan media selektif dan diferensial
4. Metode yang digunakan untuk menghitung jumlah *coliform* fekal

Kekurangan metode *Most Probable Number* (Suriawiria, 2003):

1. Sampel air yang digunakan hanya sedikit untuk sekali pengujian
2. Dibutuhkan waktu beberapa hari untuk mendapatkan kultur yang baik
3. Jumlah *coli* yang dihitung hanya dalam jumlah kasar
4. Membutuhkan banyak media dan perlengkapan
5. Tidak dapat dilakukan di lapangan tempat pengambilan sampel, sehingga membutuhkan sistem angkutan tertentu agar meminimalisir perubahan *coli* pada sampel

### 2.11. Uji *Coliform*

Uji *coliform* secara lengkap terdiri dari 3 tahap yaitu:

1. Uji penduga (*Presumptive Test*)

Uji penduga merupakan uji pendahuluan untuk melihat kehadiran bakteri *coliform* ditandai adanya asam dan gas disebabkan karena fermentasi laktosa oleh bakteri golongan *coli*. Terbentuknya asam dilihat dari kekeruhan pada media laktosa, dan gas yang dihasilkan

dapat dilihat dalam tabung durham berupa gelembung udara. Tabung dinyatakan positif jika terbentuk gas sebanyak 10% atau lebih dari volume di dalam tabung durham.

Kandungan bakteri *Escherichia coli* dapat dilihat dengan menghitung tabung yang menunjukkan reaksi positif terbentuk asam dan gas dan dibandingkan dengan tabel MPN. Metode MPN dilakukan untuk menghitung jumlah mikroba di dalam sampel yang berbentuk cair. Bila inkubasi 1x24 jam hasilnya negatif, maka dilanjutkan dengan inkubasi 2x24 jam pada suhu 37°C. Jika dalam waktu 2x24 jam tidak terbentuk gas dalam tabung durham, maka menunjukkan hasil negatif. Jumlah tabung yang positif dihitung pada masing-masing seri. MPN penduga dapat dihitung dengan melihat tabel MPN.

## 2. Uji Penguat (*Confirmed Test*)

Hasil uji dugaan dilanjutkan dengan uji penguat. Hasil tabung yang positif terbentuk asam dan gas terutama pada masa inkubasi 1x24 jam, suspensi ditanamkan pada media *Eosin Methylen Blue Agar* (EMBA) secara aseptik dengan menggunakan jarum inokulasi. Koloni bakteri *Escherichia coli* tumbuh berwarna merah kehijauan dengan kilat metalik atau koloni berwarna merah muda dengan lendir untuk kelompok *coliform* lainnya.

## 3. Uji Pelengkap (*Completed Test*)

Pengujian selanjutnya dilanjutkan dengan uji pelengkap untuk menentukan bakteri *Escherichia coli*. Hasil positif pada uji penguat diinokulasikan ke dalam medium *Lactose Broth* dan medium medium agar miring *Nutrient Agar* (NA) dengan ose secara aseptik dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 1x24 jam. Hasil positif terbentuk asam dan gas pada media *Lactose Broth* yang menunjukkan sampel positif mengandung bakteri *Escherichia coli*.

Uji pelengkap juga bisa dilakukan untuk membedakan bakteri golongan *coli* dari bakteri golongan *coli* fekal (berasal dari tinja hewan berdarah panas). Bakteri yang telah diinokulasikan pada media *Lactose Broth* diinkubasi pada suhu 37°C (untuk golongan *coli*) dan



satu seri diinkubasi pada suhu 42°C (untuk golongan *coli* fekal). Bakteri golongan *coli* tidak dapat tumbuh dengan baik pada suhu 37°C, sedangkan golongan *coli* fekal dapat tumbuh dengan baik pada suhu 42°C (Widiyanti dkk., 2004).

### 2.12. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram digunakan untuk membedakan mikroorganisme berdasarkan karakteristik pewarnaan Gram, ukuran, bentuk, dan susunan sel. Uji ini merupakan salah satu uji pada mikrobiologi klinis yang cepat, diagnosis presumtif dari infeksi penyakit. Variasi Gram bergantung kepada pewarnaan, umur dari mikroorganisme, pengaruh terhadap pengobatan antimikroba dan faktor lainnya. Reaksi pewarnaan tergantung komposisi dinding sel.

Bakteri yang tetap berwarna ungu dengan pewarnaan oleh kristal violet disebut Gram positif, misalnya *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, sedangkan bakteri yang warna ungunya hilang jika dibilas dengan alkohol, tetapi tetap berwarna merah muda karena menahan warna merah safranin disebut bakteri Gram negatif, misalnya *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (James dkk., 2008).

### 2.13. Uji IMViC (Indol, Methyl Red, Voges Proskauer, Simmons Citrate)

Uji IMViC merupakan uji lanjutan untuk identifikasi famili dari *enterobacteriaceae*. Uji IMViC terdiri dari empat uji berbeda seperti uji indol, uji *Methyl Red*, uji Voges Proskauer, dan uji *Simmons Citrate* (Shweta dkk., 2015).

#### 2.13.1 Uji Indol

Uji indol untuk melihat kemampuan organisme yang mendegradasi asam amino triptofan dan menghasilkan indol (Hemraj dkk., 2013). Kemampuan menghidrolisis triptofan yang dilakukan oleh bakteri bukan merupakan karakteristik semua bakteri sehingga bisa digunakan dalam mendeteksi bakteri tertentu, seperti *Escherichia coli*. Media yang digunakan untuk uji indol bisa berupa *Sulfide Indole Motility* (SIM), *Tryptophan Broth*, dan *Motility Indole Ornithine* (MIO) (Hemraj dkk., 2013; Shweta dkk., 2015). Indol dideteksi dengan menambahkan reagen kovac's yang menghasilkan cincin berwarna merah.

Reagen kovac's lebih stabil dan tidak perlu penambahan pelarut organik tambahan, reagen kovac's cocok untuk penggunaan penelitian mahasiswa di laboratorium karena lebih aman (Hemraj dkk., 2013).

#### **2.13.2 Uji Methyl Red**

Menurut Sudarsono (2008), uji *Methyl Red* dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri mengoksidasi glukosa dengan memproduksi asam dengan konsentrasi tinggi sebagai hasil akhirnya. Jika media *Methyl Red* akan menjadi merah setelah ditambahkan merah metil menunjukkan bahwa hasil uji positif, sedangkan jika media tetap berwarna kuning menunjukkan hasil uji negatif.

#### **2.13.3 Uji Voges Proskauer**

Uji Voges proskauer adalah uji untuk mendeteksi asetoin dalam kultur bakteri. Pengujian ini dilakukan dengan menambahkan alpha-naftol dan kalium hidroksida pada media Voges Proskauer yang telah diinokulasikan bakteri. Hasil positif akan menghasilkan warna merah, sedangkan warna kuning-coklat menunjukkan hasil negatif. Voges Proskauer positif pada *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia marcescens*, *Hafnia alvei*, *Vibrio damsela*, dan *Vibrio alginolyticus* (Hemraj dkk., 2013).

#### **2.13.4 Uji Simmons Citrate**

Menurut Hadioetomo (1993), media *Simmons Citrate* merupakan salah satu medium yang digunakan untuk menguji kemampuan bakteri dalam menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon yang digunakan. Bakteri yang memiliki sitrat-permease bisa mengangkut molekul ke dalam sel dan mengonversi secara enzimatik menjadi piruvat. Piruvat kemudian dapat dikonversi ke berbagai produk, tergantung pada pH lingkungan.

*Simmons Citrate Agar* merupakan media yang berisi natrium sitrat sebagai sumber karbon tunggal dan amonium fosfat sebagai sumber nitrogen tunggal. Pewarna biru bromotimol, yang berwarna hijau pada pH 6,9 dan biru pada pH 7,6 ditambahkan sebagai indikator. Bakteri yang bertahan dalam medium dan memanfaatkan sitrat juga mengubah

amonium fosfat amonia (NH<sub>3</sub>) dan amonium hidroksida (NH<sub>4</sub>OH), keduanya cenderung membasakan media agar. Perubahan pH mengubah media dari hijau ke biru. Hasil positif bila media berubah menjadi warna biru.

## **2.14. Persyaratan Kesehatan Makanan dan Minuman Jajanan**

### **2.14.1 Persyaratan Makanan dan Minuman Jajanan**

Berdasarkan Kepmenkes RI No. 942/Menkes/SK/VII/2003, makanan jajanan adalah makanan dan minuman yang diolaholeh pengrajin makanan dan minuman di tempat penjualan dan disajikan sebagai makanan dan minuman siap santap yang dijual bagi umum selain yang disajikan jasa boga, rumah makan, atau restoran dan hotel. Di dalam Kepmenkes RI No. 942/Menkes/SK/VII/2003 ini dimuat persyaratan kesehatan makanan jajanan antara lain meliputi penjamah makanan, peralatan, air, bahan makanan dan penyajian, saran penjaja serta sentra pedagang.

Dalam Kepmenkes RI No. 942/Menkes/SK/VII/2003 tersebut dinyatakan penjamah makanan jajanan harus memenuhi syarat, antara lain menjaga kebersihan tubuh dan pakaian, mencucitangan setiap kali hendak menangani minuman dan menjamah minumandengan peralatan. Peralatan yang digunakan oleh pedagang yang sudah dipakai, dicuci dengan air bersih dan dengan sabun, disimpan ditempat yang bebas dari pencemaran dan pedagang dilarang menggunakan kembali peralatan yang dirancang hanya untuk sekali pakai.

Lokasi makanan jajanan harus dilengkapi fasilitas sanitasi yang meliputi antara lain tempat pembuangan sampah dan fasilitas pengendali lalat.

### **2.14.2 Persyaratan Kesehatan Lokasi Usaha**

Lokasi dan bangunan sangat penting bagi setiap tempat usaha, usaha yang memiliki bangunan akan memberikan rasa aman dan kenyamanan bagi konsumennya. Saat ini banyak dijumpai pedagang yang menjual makanan dan minuman tidak memiliki bangunan dan

lokasi berdagang yang memenuhi syarat kesehatan, sehingga kemungkinan cukup besar terkontaminasi mikroorganisme.

Persyaratan lokasi dan bangunan akan disesuaikan sejalan dengan Kepmenkes RI No. 1098/Menkes/SK/VII/2003 tentang persyaratan kesehatan rumah makan. Kepmenkes ini memuat persyaratan lokasi dan bangunan, bahan makanan dan minuman, tempat penyimpanan bahan makanan dan minuman, tempat penyajian, persyaratan peralatan dan lain-lain.

Dalam persyaratan kesehatan rumah makan tersebut dinyatakan lokasi usaha harus jauh dari sumber pencemaran, bahan makanan dan minuman dalam kondisi baik (tidak rusak dan tidak busuk) dan tempat penyimpanan bahan minuman harus selalu dalam keadaan bersih serta bebas dari serangga. Selain itu peralatan yang digunakan harus terjaga kebersihannya, penyajian harus dilakukan oleh pedagang yang berperilaku sehat dan memakai pakaian bersih.