

MIKROORGANISME DALAM PANGAN LAUT

Penulis :

Komariah Tampubolon



**DEPARTEMEN TEKNOLOGI HASIL PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2008**



DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
DEPARTEMEN TEKNOLOGI HASIL PERAIRAN (THP)

Kampus IPB Dramaga - Bogor 16680, Telp. (0251) 622915-622916. Fax. : (0251) 622915-622916 E-mail : thp_ipb@ipb.ac.id

SURAT KETERANGAN

Yang bertanda tangan di bawah ini menerangkan bahwa:

Nama : Ir. Komariah Tampubolon, MS.
NIP : 130 355 555
Pangkat/Jabatan : Pembina Tk. I/ IV b / Lektor Kepala
Unit Kerja : Departemen Teknologi Hasil Perairan
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB

Telah mendokumentasikan Makalah (Hasil Karya Ilmiah) yang berjudul :

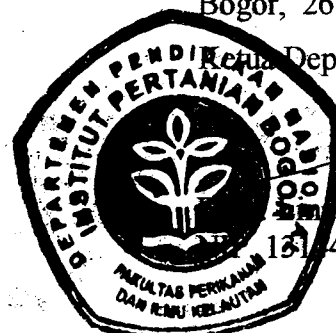
No.	Judul	Keterangan
1.	Mikroorganisme Dalam Pangan Laut, 2008, Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.	<u>Tulisan Tunggal</u> : <i>Komariah Tampubolon</i>
2.	Penentuan Mikroorganisme Pangan Laut, 2008, Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.	<u>Tulisan Tunggal</u> : <i>Komariah Tampubolon</i>
3.	Mikrobiologi Keamanan Pangan Laut, 2008, Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.	<u>Tulisan Tunggal</u> : <i>Komariah Tampubolon</i>
4.	Penentuan Mikrobiologi Keamanan Pangan Laut, 2008, Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.	<u>Tulisan Tunggal</u> : <i>Komariah Tampubolon</i>

pada Perpustakaan Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.

Demikian Surat keterangan ini dibuat, agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Bogor, 26 Juni 2008

Departemen THP FPIK-IPB,



[Signature]
Wati Hardjito, M.Sc.

13147395



DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
DEPARTEMEN TEKNOLOGI HASIL PERAIRAN (THP)

Kampus IPB Dramaga - Bogor 16680. Telp. (0251) 622915-622916. Fax. : (0251) 622915-622916 E-mail : thp_ipb@ipb.ac.id

Perihal : Ucapan Terima Kasih

Kepada Yth. : **Ir. Komariah Tampubolon, MS.**
Staf Pengajar Dept. Teknologi Hasil Perairan FPIK
Institut Pertanian Bogor
di Bogor

Dengan ini kami ucapkan terima kasih atas sumbangan Karya Ilmiah berupa :
Buku/Jurnal/Makalah yang tidak dipublikasikan sebanyak 4 (empat) judul sebagai
berikut :

No.	Judul Karya Ilmiah	Keterangan
1.	Mikroorganisme Dalam Pangan Laut, <i>Makalah tahun 2008, Departemen Teknologi Hasil Perairan FPIK IPB</i>	<u>Tulisan Tunggal :</u> Komariah Tampubolon
2.	Penentuan Mikroorganisme Pangan Laut, <i>Makalah tahun 2008, Departemen Teknologi Hasil Perairan FPIK IPB</i>	<u>Tulisan Tunggal :</u> Komariah Tampubolon
3.	Penentuan Mikroorganisme Keamanan Pangan Laut, <i>Makalah tahun 2008, Departemen Teknologi Hasil Perairan FPIK IPB</i>	<u>Tulisan Tunggal :</u> Komariah Tampubolon
4.	Mikrobiologi Keamanan Pangan Laut, <i>Makalah tahun 2008, Departemen Teknologi Hasil Perairan FPIK IPB</i>	<u>Tulisan Tunggal :</u> Komariah Tampubolon

Adapun Buku/Jurnal/Makalah tersebut disimpan di Perpustakaan Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.

Bogor, 26 Juni 2008
Perpustakaan
Dep. Teknologi Hasil Perairan FPIK IPB

petugas,

Hedy Wibowo, A.Md.
NIP. -

KATA PENGANTAR

Buku ini merupakan pengetahuan tambahan mengenai mikroorganisme, baik secara umum maupun yang terdapat dalam bahan pangan laut. Materi ini berisikan mengenai pengertian mikrobiologi dasar, peranan mikrobiologi yang berhubungan dengan keamanan pangan dan khususnya keamanan pangan laut.

Penulis menyadari, bahwa buku ini masih jauh dari sempurna, dimana tentunya memerlukan penyempurnaan lebih lanjut, sesuai dengan kemajuan teknologi. Pada kesempatan ini penulis berharap, buku ini dapat diambil manfaatnya oleh pembaca.

Bogor, Mei 2008

Penulis,

DAFTAR ISI

I. PENDAHULUAN	1
II. MIKROORGANISME YANG BERHUBUNGAN DENGAN PANGAN	4
2.1. Mikroorganisme	4
2.2. Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Kehidupan Mikroorganisme	5
2.3. Kelompok Mikroorganisme.....	13
2.4. Peranan Mikroorgansme	18
III. MENGHITUNG ORGANISME DALAM BAHAN PANGAN.....	20
3.1. Pengambilan Contoh.....	20
3.2. Prosedur Perhitungan	23
IV. KEAMANAN PANGAN	42
4.1. Makanan Sebagai Substrat Untuk Mikroba.....	42
4.2. Sifat Mikroba Penyebab Penyakit.....	43
4.3. Sifat Patogenik Mikroba.....	45
4.4. Ekotoksin Dan Endotoksin.....	48
4.5. Kelompok Bakteri Yang Penting.....	50
4.6. Mikotoksin	58
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN.....	61

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Tabel MPN – Seri 15 tabung.....	61
Lampiran 1. Tabel MPN – Seri 15 tabung (Lanjutan).....	62
Lampiran 2. Tabel MPN – Seri 9 tabung	63
Lampiran 2. Tabel MPN – Seri 9 tabung (Lanjutan)	64
Lampiran 3. Tabel MPN – Seri 9 tabung	65

I. PENDAHULUAN

Mikrobiologi adalah suatu ilmu yang mempelajari kehidupan makhluk yang bersifat mikroskopik yang disebut mikroorganisme atau jasad renik. Makhluk dimaksud mempunyai ukuran sel sangat kecil, dimana setiap selnya hanya dapat dilihat dengan bantuan mikroskop. Dalam teknologi pangan, mikrobiologi merupakan ilmu yang sangat penting, misalnya dalam hubungannya dengan kerusakan dan kebusukan, serta keracunan makanan. Dengan demikian akan dapat diketahui tindakan pencegahan atau pengawetan yang paling tepat untuk menghindari terjadinya kerusakan serta akibat-akibat yang dapat ditimbulkannya. Disamping itu mikrobiologi juga penting dalam fermentasi makanan, sanitasi, pengawasan mutu pangan dan lainnya.

Adanya mikroorganisme di dalam makanan, mungkin tidak diinginkan jika mikroorganisme tersebut dapat menyebabkan kerusakan dan kebusukan pada makanan, atau menyebabkan keracunan bagi individu yang mengkonsumsinya. Di lain pihak dalam fermentasi makanan dan minuman, pertumbuhan jasad renik justru dikehendaki. Hal ini bertujuan untuk mengubah komponen-komponen di dalam bahan pangan tersebut untuk menjadi produk-produk yang diinginkan.

Untuk mempertahankan kehidupannya, manusia memerlukan makanan, disamping kebutuhan akan air dan oksigen. Mengingat makanan harus tersedia setiap saat dan dengan jumlah yang cukup, sedangkan jumlah penduduk bertambah dengan pesat, maka mendorong kita untuk meningkatkan dan mempercepat pengadaan pangan. Pengadaan pangan yang cukup belum menjamin manfaatnya bagi kehidupan dan kesejahteraan manusia. Disamping ketersediaannya yang cukup, makanan termasuk pangan laut, juga harus bernilai gizi yang tinggi, bersih, serta bebas dari komponen-komponen atau mikroba yang dapat menyebabkan keracunan atau penyakit.

Wabah penyakit yang disebabkan oleh makanan atau yang sumber penularannya adalah makanan, masih sering terjadi, baik di Indonesia maupun di luar negeri. Biasanya yang menjadi sumber penularan adalah makanan yang dijajakan oleh pedagang-pedagang di pinggir jalan atau yang dijual di warung-warung kecil, di rumah-rumah makan, serta makanan yang dibuat di perumahan penduduk. Hal ini kemungkinan makanan tersebut dipersiapkan tanpa memperhatikan kebersihan yang memadai, disamping itu kemungkinan mutu bahan mentah yang digunakan sudah kurang baik.

Yang sering disebut dengan wabah atau dikenal juga dengan sebutan letusan (outbreak) adalah suatu keadaan atau kejadian dimana kelompok orang yang terdiri dari beberapa orang atau banyak orang menderita sakit atau keracunan dengan gejala-gejala yang sama dan disebabkan oleh suatu sumber yang sama. Wabah atau letusan yang terjadi di Indonesia beberapa diantaranya sudah banyak diberitakan di media massa, khususnya wabah yang menyerang penduduk dalam jumlah yang cukup banyak.

Beberapa kejadian besar mengenai keracunan makanan yang pernah terjadi di Indonesia, antara lain terjadinya letusan muntah berak (muntaber) di Denpasar pada Februari 1981. Yang menyerang lebih dari 400 penduduk, dimana beberapa orang diantaranya meninggal dunia. Sumber dari keacunan tersebut adalah dari minuman es bunbun yang menggunakan air sumur yang tidak dimasak. Pada bulan April 1981 pernah terjadi letusan muntaber di Kabupaten Bandung yang menyerang lebih dari 1300 penduduk, dimana 94 penderita meninggal. Gejala-gejala dari letusan tersebut menyerupai kolera eltor, dan di duga disebabkan oleh penggunaan air yang mengandung bakteri penyebab kolera. Dalam bulan Januari 1982, terjadi letusan keracunan makanan terhadap lei dari 200 peserta P4 di Surabaya. Gejala yang

ditimbulkan adalah merasa mual serta sakit perut dan diare, setelah makan nasi dengan lauk pauknya.

Kejadian-kejadian wabah tersebut sangatlah memprihatinkan kita dan perlu ditangani sebaik mungkin. Untuk menghindari kejadian-kejadian seperti tersebut, perlu ditanamkan pengertian pada masyarakat, khususnya pengusaha-pengusaha industri pangan, baik skala besar maupun kecil, dan para konsumen, mengenai betapa pentingnya pengetahuan tentang keamanan pangan.

Beberapa cara yang sudah dan masih terus dilaksanakan untuk mencegah terjadinya keracunan makanan, antara lain adalah :

- penggunaan air dan bahan mentah yang bermutu
- perbaikan dalam produksi, pengolahan, pengawetan, pengepakan, penyimpanan, pengangkutan dan penjualan.

Saat ini kasus-kasus letusan karena keracunan makanan sudah jauh berkurang dan jarang terjadi, walaupun ada, namun jumlah penderita hanya sedikit.

Dalam industri pangan, sanitasi merupakan bagian penting yang harus dilaksanakan dengan baik. Tanpa sanitasi yang baik sulit dihasilkan produk pangan yang aman bagi kesehatan dan bermutu tinggi dengan masa simpan yang cukup. Oleh karena itu peraturan-peraturan yang tercantum dalam payung GMP (Good Manufacturing Practices) atau prakek pengolahan yang baik merupakan pelaksanaan dari sanitasi dasar yang antara lain meliputi aspek-aspek seperti sanitasi pekerja, sanitasi pangan, sanitasi peralatan dan bangunan.

II. MIKROORGANISME YANG BERHUBUNGAN DENGAN PANGAN

2.1. Mikroorganisme

Dalam mikrobiologi pangan, mikroorganisme atau jasad renik yang penting adalah yang tergolong dalam bakteri, kapang dan khamir.

Mahluk hidup dapat dibedakan ke dalam tiga katagori, yaitu :

- 1) tanaman,
- 2) hewan, dan
- 3) protista.

Pada tanaman dan hewan, setiap masing-masing sel tidak dapat berfungsi secara terpisah, tetapi merupakan unit terkecil dari suatu organisme multiseluler. Mahluk hidup yang termasuk dalam katagori *protista* adalah semua mahluk hidup yang tidak tergolong dalam katagori hewan atau tanaman. Mahluk hidup ini dapat dibedakan atas dua kelompok, yaitu :

- 1) protista tingkat rendah atau *prokariot*, dan
- 2) protista tingkat tinggi atau *eukariot*.

Organisme yang tergolong dalam prokariot dan eukariot, adalah sebagai berikut

- 1) Protista rendah (prokariot), terdiri atas :
 - Bakteri
 - Rickettsia dan Chlamydia
 - Mikoplasma
 - Ganggang biru-hijau
- 2) Protista tinggi (eukariot), terdiri :
 - Fungi (kapang, khamir, jamur)
 - Ganggang
 - Protozoa.

Perbedaan yang penting antara sel prokariot dan eukariot adalah dalam struktur inti selnya, dimana sel eukariot mempunyai inti sel (nucleus) sejati. Sel tersebut mempunyai struktur yang dikelilingi oleh membran inti (khromosoma yang mengandung komponen keturunan). Sebaliknya sel prokariot tidak mempunyai inti sejati, dan komponen keturunannya terdapat di dalam molekul DNA tunggal atau khromosoma yang letaknya bebas di dalam sitoplasma.

Virus tidak digolongkan ke dalam salah satu organisme seperti diatas, karena tidak mempunyai ciri-ciri yang dapat dikategorikan sebagai sel pada umumnya. Suatu partikel virus merupakan struktur yang bersifat statis, stabil, dan tidak dapat melakukan metabolisme maupun biosintesa. Virus baru dapat dikatakan makhluk hidup jika terdapat di dalam sel organisme lainnya. Dalam hal ini, sel organisme inang tersebut yang melakukan proses metabolisme yang diperlukan oleh virus untuk memperbanyak diri. Dalam keadaan demikian, virus digolongkan kedalam kelompok protista.

2.2 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Kehidupan Mikroorganisme

Kemampuan mikroorganisme tumbuh dan tetap hidup merupakan hal yang penting dalam sistem pangan. Suatu pengetahuan dan pengertian tentang faktor-faktor yang mempengaruhi kemampuan tersebut sangat penting untuk mengendalikan hubungan antara mikroorganisme – makanan – manusia. Beberapa faktor utama yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme meliputi : sumber energi (suplai zat gizi), waktu, suhu, air, pH, dan tersedianya oksigen

1) Sumber Energi (Suplai Zat Gizi)

Mikroorganisme seperti makhluk hidup lainnya, juga membutuhkan suplai makanan yang akan menjadi sumber energi dan menyediakan unsur-unsur kimia dasar, yang dapat diperoleh dari molekul-molekul kompleks zat-zat organik seperti polisakarida, lemak dan protein. Molekul-molekul kompleks tersebut dipecahkan terlebih dahulu menjadi unit yang lebih sederhana, sebelum zat tersebut dapat masuk ke dalam sel dan di pergunakan untuk pertumbuhannya. Pemecahan awal ini dapat terjadi akibat ekskresi enzim ekstraselular, yaitu suatu sifat yang sangat erat yang berhubungan dengan pembusukan bahan pangan.

2) Waktu

Bila suatu organisme jatuh pada bahan pangan atau diinokulasi pada media nutrien agar, pertumbuhan yang terlihat dengan menggunakan alat mikroskop, mula-mula adalah suatu pembesaran volume dan berat sel. Ketika ukuran telah mencapai kira-kira dari sel normal, sel tersebut membelah dan menghasilkan dua sel. Dua sel tadi kemudian tumbuh dan membelah diri menghasilkan empat sel. Selama kondisi mendukung dan memungkinkan, pertumbuhan dan pembelahan sel berlangsung terus sampai sejumlah besar populasi sel terbentuk. Jika jumlah pembelahan sel dan sel yang terbentuk yang terjadi seperti diatas, maka sejumlah sel dapat terbentuk dalam waktu yang sangat singkat.

Waktu antara masing-masing pembelahan sel berbeda-beda, tergantung dari spesies dan kondisi lingkungannya, tetapi untuk kebanyakan bakteri waktu tersebut berkisar 10 – 60 menit. Tipe pertumbuhan yang cepat seperti ini, disebut pertumbuhan logaritmis atau eksponensial, karena bila log jumlah digambarkan terhadap waktu dalam grafik akan menunjukkan garis lurus.

Tetapi pada kenyataannya tipe pertumbuhan eksponensial ini tidak langsung terjadi pada saat sel dipindahkan ke media nutrisi agar dan tidak terjadi secara terus menerus. Biasanya hal ini hanya terjadi dalam satu fase yang singkat dari pertumbuhan populasi mikroorganisme. Selama pertumbuhan mikroorganisme atau kultur, dikenal ada empat fase pertumbuhan, yaitu :

- fase lambat/adaptasi (*lag*),
- fase log, fase tetap (*stationary*) dan
- fase menurun .

a. Fase lambat /adaptasi (*lag phase*)

Pada awal inokulasi sel ke dalam media nutrisi segar, biasanya pada suatu periode dimana tidak terjadi pembelahan sel. Fase lambat ini dapat terjadi antara beberapa menit sampai beberapa jam, tergantung pada spesies, umur dari sel inokulum dan lingkungannya. Waktu pada fase lambat dibutuhkan untuk kegiatan metabolisme dalam rangka persiapan dan penyesuaian diri dengan kondisi pertumbuhan dalam lingkungan yang baru (adaptasi).

b. Fase log (*log phase*)

Setelah beradaptasi terhadap kondisi yang baru, sel-sel tersebut akan tumbuh dan membelah diri secara eksponensial sampai jumlah maksimum yang dapat dibantu oleh kondisi lingkungan yang dicapai.

c. Fase tetap (*stationary phase*)

Populasi mikroorganisme jarang dapat tetap tumbuh eksponensial dengan kecepatan tinggi untuk suatu jangka waktu yang lama. Sebab-sebabnya akan menjadi jelas jika dipikirkan akibat dari pertumbuhan secara eksponensial. Bila sampai terjadi demikian, maka setelah 48 jam, pertumbuhan eksponensial satu

@

sel bakteri dengan waktu 20 menit akan menghasilkan turunan sebesar $2,2 \times 10^{31}$ g atau kira-kira 4.000 kali berat bumi.

Pertumbuhan mikroorganisme tidaklah seperti perkiraan diatas, karena biasanya dibatasi oleh habisnya bahan gizi yang tersedia atau penimbunan zat racun sebagai hasil akhir metabolisme. Akibatnya kecepatan pertumbuhan akan menurun dan pertumbuhan akhirnya terhenti. Pada titik ini dikatakan sebagai fase tetap (*stationary phase*). Komposisi sel-sel pada fase ini berbeda dibandingkan dengan sel-sel saat fase eksponensial dan umumnya lebih tahan terhadap perubahan-perubahan kondisi fisik seperti panas, dingin dan radiasi maupun terhadap bahan-bahan kimia.

d. Fase menurun (*decline or death phase*)

Sel-sel yang berapa diantaranya tetap hidup, akhirnya juga akan mati bila tidak dipindahkan ke media segar lainnya. Sebagaimana pertumbuhan, kematian sel juga secara eksponensial dan karenanya dalam bentuk logaritmis, fase menurun atau kematian ini merupakan penurunan secara garis lurus yang digambarkan oleh jumlah-jumlah sel yang hidup terhadap waktu. Kecepatan kematian juga berbeda-beda, tergantung spesies mikroorganisme dan kondisi lingkungannya.

3) Suhu

Suhu adalah salah satu faktor lingkungan terpenting yang mempengaruhi kehidupan dan pertumbuhan mikroorganisme. Suhu dapat mempengaruhi mikroorganisme dalam dua cara yang berlawanan.

- (1) Apabila suhu naik, kecepatan metabolisme naik dan pertumbuhan dipercepat. Sebaliknya apabila suhu turun, kecepatan metabolisme juga turun dan pertumbuhan diperlambat.

(2) Apabila suhu naik atau turun, tingkat pertumbuhan mungkin terhenti, komponen sel menjadi tidak aktif dan sel-sel dapat mati.

Berdasarkan hal di atas, beberapa hal sehubungan dengan suhu bagi setiap organisme dapat digolongkan sebagai berikut :

- (1) Suhu minimum, dibawah suhu ini pertumbuhan mikroorganisme tidak terjadi lagi.
- (2) suhu optimum, adalah suhu dimana pertumbuhan paling cepat.
- (3) Suhu maksimum, diatas suhu ini pertumbuhan mikroorganisme tak mungkin terjadi.

Suhu optimum selalu lebih mendekati maksimum daripada minimum. Berlandaskan hubungan antara suhu tersebut diatas, mikroorganisme dapat digolongkan menjadi kelompok :

- psikrofil,
- mesofil,
- termofil dan
- themotrof

Nilai suhu sehubungan dengan kelompok ini seperti terlihat pada Tabel dibawah ini.

Kelompok	Suhu pertumbuhan minimum (°C)	Suhu pertumbuhan optimum (°C)	Suhu pertumbuhan maksimum (°C)
Psikrofil	- 15	10	20
Psikrotrof	- 5	25	35
Mesofil	5 - 10	30 - 37	45
Thermofil	40	45 - 55	60 - 80
Thermotrof	15	42 - 44	50

Sehubungan dengan pengaruh suhu terhadap ketahanan hidup mikroorganisme, pemanasan atau kenaikan suhu bersifat jauh lebih merusak

dari pada pendinginan. Berdasarkan hal ini mikroorganisme dapat dikelompokkan menjadi tiga golongan yaitu :

- (1) Peka terhadap panas, dimana hampir semua sel rusak apabila dipanaskan 60°C selama 10-20 menit.
- (2) Tahan terhadap panas, dimana dibutuhkan suhu 100°C selama 10 menit untuk mematikan sel.
- (3) Thermodurik, dimana dibutuhkan suhu lebih dari 60°C selama 10-20 menit, tetapi kurang dari 100°C selama 10 menit untuk mematikan sel.

Bakteri pembentuk spora jenis *Clostridium* dan *Bacillus* termasuk kelompok yang tahan panas. Kebanyakan mikroorganisme tahan terhadap suhu rendah sampai suhu pembekuan dan walaupun pertumbuhan dan pembelahan mungkin terhambat. Sel-sel bakteri dapat tahan hidup untuk jangka waktu cukup lama pada suhu pendinginan $\pm 5^{\circ}\text{C}$. Pada suhu pembekuan, kerusakan sel terjadi, tetapi tidak secepat seperti pada suhu tinggi.

Pada kenyataannya, jika sel tetap tahan hidup pada awal suhu pembekuan, sel ini tetap dapat hidup untuk jangka waktu cukup lama pada keadaan beku. Hal ini adalah suatu kehidupan karena fungsi sel terhenti dan bila media sekitarnya dicairkan kembali metabolisme akan berlangsung lagi. Pembekuan biasanya digunakan sebagai cara pengawetan dan mempertahankan mikroorganisme. Kematian sel selanjutnya sebagai akibat dari pembekuan, tergantung pada sifat alamiah dari spesies mikroorganisme. Kecepatan pembekuan, suhu pembekuan dan faktor-faktor lingkungan lainnya.

4) Nilai pH

Setiap organisme mempunyai kisaran nilai pH dimana pertumbuhan masih memungkinkan dan masing-masing biasanya mempunyai pH optimum.

Kebanyakan mikroorganisme dapat tumbuh pada kisaran pH 6.0-8.0 dan nilai pH diluar kisaran 2,0 sampai 10,0 biasanya bersifat merusak. Beberapa mikroorganisme dalam bahan pangan tertentu seperti khamir dan bakteri asam laktat tumbuh dengan baik pada kisaran nilai pH 3,0-6,0 dan sering disebut sebagai asidofil.

5) Aktivitas Air (*water activity*)

Semua organisme membutuhkan air untuk kehidupannya. Air berperan dalam reaksi metabolik dalam sel dan merupakan alat pengangkut zat-zat gizi atau dalam bahan pangan atau larutan dikenal sebagai "aktivitas air" (*water activity* = a_w). Air murni mempunyai nilai $a_w = 1,0$. Jenis mikroorganisme yang berbeda, akan membutuhkan jumlah air yang berbeda pula untuk pertumbuhannya dalam bahan pangan atau larutan dikenal sebagai aktivitas air (*water activity* = a_w). Air murni mempunyai nilai $a_w = 1,0$. Jenis mikroorganisme yang berbeda membutuhkan jumlah air yang berbeda pula untuk pertumbuhannya. Bakteri umumnya tumbuh dan berkembang biak hanya dalam media dengan nilai a_w tinggi (0,91), khamir membutuhkan nilai a_w lebih rendah (0,87 – 0,91), kapang lebih rendah lagi (0,80 – 0,87).

Larutan gula dan garam pekat dapat mengakibatkan tekanan osmotik pada sel mikroorganisme dengan menyerap keluar air dalam sel. Keadaan ini akan menyebabkan sel kekurangan air dan mati. Beberapa jenis mikroorganisme dapat menyesuaikan diri dengan keadaan tersebut di atas, yaitu adanya tekanan osmotik eksternal yang tinggi dan dalam beberapa hal tertentu keadaan semacam itu yang diinginkan. Beberapa jenis bakteri, khamir dan kapang dapat tahan dan tumbuh pada larutan gula yang sangat pekat dan umumnya dikenal sebagai organisme osmofilik

Keadaan yang sama pada beberapa jenis mikroorganisme yang tahan dalam lingkungan yang berkadar garam cukup tinggi yang disebut halofil atau organisme halofilik. Jenis-jenis yang tahan tekanan osmotik ini dapat berperan secara nyata dalam pembusukan bahan pangan.

6) Ketersediaan Oksigen

Tidak seperti bentuk kehidupan lainnya, mikroorganisme berbeda nyata dalam kebutuhan oksigen guna metabolismenya. Beberapa kelompok dapat dibedakan sebagai :

- (1) organisme aerobik – dimana tersedianya oksigen dan penggunaannya dibutuhkan untuk pertumbuhan.
- (2) Organisme anaerobik-tidak dapat tumbuh dengan adanya oksigen dan bahkan oksigen ini dapat merupakan racun bagi organisme tersebut.
- (3) Organisme anaerobik fakultatif – dimana oksigen dapat dipergunakan apabila tersedia, kalau tidak tersedia, organisme tetap dapat tumbuh dalam keadaan anaerobik
- (4) Organisme mikroerofilik (*microaerophilic organisms*) – yaitu mikroorganisme yang lebih dapat tumbuh pada kadar oksigen yang lebih rendah daripada kadar oksigen dalam atmosfer

7) Faktor-faktor Kimia

Telah diketahui banyak zat kimia yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme atau membunuh mikroorganisme yang telah ada. Bahan-bahan kimia yang bersifat bakteriostatik atau fungistatik adalah bahan-bahan kimia yang dipergunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri atau kapang (fungi), sedangkan bakterisidal dan fungisidal adalah bahan-bahan kimia yang dapat membunuh bakteri atau kapang. Berbagai logam, asam, halogen,

alkohol, fenol, deterjen dan antibiotik mempunyai efek antimikroba yang digunakan dalam industri pengolahan bahan pangan. Selain itu dalam desinfeksi dan sanitasi alat-alat pengolahan dan ruangan-ruangan pabrik atau kadang-kadang sebagai bahan yang ditambahkan dalam bahan pangan sebagai zat pengawet. Kerja dari bahan-bahan kimia antimikroba ini dapat bersifat khas, yaitu hanya efektif pada jenis-jenis mikroorganisme tertentu. Sebagai contoh, antibiotik jenis penisilin dan tetrasiklin hanya dapat membunuh bakteri tetapi tidak membunuh khamir atau kapang. Beberapa bahan yang bersifat spektrum luas seperti hipoklorit dapat mematikan lebih banyak mikroorganisme.

Efektifitas dari setiap bahan antimikroba ini tergantung pada :

- jumlah yang digunakan,
- waktu penggunaan dan
- faktor-faktor lingkungan lainnya seperti pH.

8) Radiasi

Sinar ultraviolet dengan panjang gelombang tertentu dan radiasi seperti sinar X dan sinar gamma, dapat mudah terserap oleh sel mikroorganisme. Sinar-sinar tersebut dapat mengganggu metabolisme sel dan umumnya dapat cepat mematikan.

2.3. Kelompok Mikroorganisme

Kelompok mikroorganisme yang umumnya berhubungan dengan bahan pangan adalah bakteri, kapang, khamir dan virus.

1) Bakteri

Kelompok mikroorganisme yang paling penting dan beraneka ragam, yang berhubungan dengan makanan dan manusia, kemungkinannya adalah bakteri.

Adanya bakteri dalam bahan pangan dapat mengakibatkan pembusukan yang tidak diinginkan atau bahkan menimbulkan penyakit yang ditularkan melalui makanan atau sebaliknya dapat melangsungkan fermentasi yang menguntungkan.

a. Sumber

Bakteri terdapat secara luas di lingkungan alam yang berhubungan dengan hewan, tumbuh-tumbuhan, udara, air dan tanah. Pada kenyataannya sangat sedikit sekali lingkungan yang bersih dari bakteri. Berdasarkan sifat-sifat morfologi, biokimia, serologi dan genetik, beribu jenis bakteri telah diketahui dan deskripsi tentang pengelompokan yang terbaru dapat dilihat dalam buku "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", cetakan terakhir (kedelapan) (Buchanan dan Gibbons, 1974)

b. Morfologi

Bakteri adalah mikroorganisme bersel tunggal yang tidak terlihat oleh mata, tetapi dengan bantuan mikroskop, mikroorganisme tersebut akan nampak. Ukuran bakteri berkisar antara panjang 0,5 sampai 2,5 μ tergantung dari jenisnya (μ 1 mikron - 0,0001 mm). Walaupun terdapat beribu jenis bakteri, tetapi hanya beberapa karakteristik bentuk sel yang di temukan, yaitu :

- 1) Bentuk bulat atau cocci (tunggal - coccus).
- 2) Bentuk batang atau bacilli (tunggal - bacillus)
- 3) Bentuk tunggal atau spirilli (tunggal - spirillum)
- 4) Bentuk koma atau vibrios (tunggal - vibrio)

Sel-sel ini dapat dijumpai dalam keadaan tunggal, berpasangan tetrad, kelompok kecil, gerombolan atau rantai

c. Perkembang biakan sel

Bakteri berkembang biak secara aseksual yaitu dengan proses pembelahan diri menjadi dua (*binary fission*) secara sederhana dapat diuraikan sebagai berikut : sel-sel akan memanjang dan apabila sudah mencapai dua kali ukuran normal akan membelah di bagian tengah menjadi dua sel yang selanjutnya yang juga akan mengalami pembelahan. Walaupun sel secara individu tidak nampak oleh mata, tetapi kumpulan dari berjuta-juta sel tunggal – sebagai hasil pembelahan sel yang berulang-ulang pada substrat padat – membentuk suatu unit yang terlihat oleh mata yang disebut koloni. Jenis koloni yang terbentuk (warna, bentuk, tekstur dan sebagainya) penting dalam identifikasi bakteri tersebut

2) Khamir

a. Bentuk (morfologi)

Khamir adalah mikroorganisma ber sel tunggal dengan ukuran 5 dan 20 mikron . Biasanya berukuran 5 sampai 10 kali lebih besar dari bakteri. Terdapat berbagai macam bentuk ragi, dan bentuk ini sering kali tergantung pada cara pembelahan selnya. Sel-sel khamir sering dijumpai secara tunggal tetapi apabila anak-anak sel tidak dilepaskan dari induknya setelah pembelahan maka akan terjadi bentuk yang disebut pseudomiselium. Khamir tidak bergerak, karena itu tidak mempunyai struktur tambahan di bagian luarnya, seperti flagella. Beberapa jenis khamir membentuk kapsul di sebelah luar. Tipe endospora aseksual yang tahan panas seperti yang diproduksi bakteri *Bacillus* dan *Clostridium* tidak dihasilkan oleh khamir.

b. Struktur

Sel-sel khamir mempunyai lapisan dinding luar yang terdiri dari polisakarida kompleks dan dibawahnya terletak membran sel. Sitoplasma (isi

sel) berisi cairan dan di dalamnya terkandung suatu inti yang bebas (discrete nukleus), satu atau lebih vakuola, mitokhondria dan globula lipid

c. Pertumbuhan

Khamir dapat tumbuh dalam media cair maupun padat dengan cara yang sama seperti bakteri. Pembelahan sel terjadi secara aseksual dengan pembentukan tunas yaitu sebagai suatu proses yang merupakan sifat khas khamir. Terlihat pada dinding sel terdapat struktur yang disebut bekas lahir (birth scar) dan bekas tunas (bud scar).

Bekas lahir adalah suatu tanda (spot) pada dinding sel yang timbul sebagai akibat dari pembentukan sel dari sel induknya melalui pertunasan. Oleh karena itu setiap anak sel hanya mempunyai satu bekas lahir. Bekas tunas terbentuk jika sel tersebut telah membentuk satu atau lebih anak sel melalui pertunasan. Oleh karena itu jumlah bekas tunas tergantung dari jumlah anak sel yang telah dibentuk oleh sel tersebut.

3) Kapang

a. Sumber

Kapang berlawanan dengan bakteri dan khamir, sering kali dapat dilihat dengan mata. Sifat pertumbuhan yang khas adalah berbentuk kapas dan biasanya terlihat pada kertas-kertas koran yang basah, kulit-kulit yang sudah usang, dinding yang basah, buah-buahan, bahan pangan lainnya seperti keju dan selai yang membusuk

b. Bentuk (morfologi)

Berbeda dengan bakteri dan khamir, kapang adalah multiseluler yang mempunyai filamen, terdiri dari banyak sel yang bergabung jadi satu dan pertumbuhannya pada makanan mudah dilihat karena penampakannya yang

berserabut seperti kapas. Di bawah mikroskop dapat dilihat bahwa kapang terdiri dari benang yang disebut hifa, kumpulan hifa ini dikenal sebagai miselium. Kapang tumbuh dengan cara memperpanjang hifa pada ujungnya, dikenal sebagai pertumbuhan apikal dan pada bagian tengah hifa yang disebut pertumbuhan interkaler.

Beberapa kapang dapat langsung bersifat patogenik dan menyebabkan penyakit tanaman dan pada manusia. Beberapa kapang merupakan penyebab sebagai infeksi pernafasan dan kulit pada manusia. Beberapa jenis lainnya selama proses pembusukan pangan atau pertumbuhannya dalam bahan pangan dapat memproduksi racun yang dikenal sebagai mikotoksin. Sebagai suatu kelompok zat, mikotoksin dapat menyebabkan gangguan hati, ginjal dan susunan syaraf pusat dari manusia maupun hewan.

4) Virus

Virus adalah suatu golongan mikroorganisme yang tidak mempunyai sel. Virus berbeda dari organisme seluler dalam struktur, komposisi kimia dan cara pertumbuhan, berukuran sangat kecil (jauh lebih kecil dari pada bakteri) dan hanya dapat dilihat apabila mempergunakan mikroskop elektron. Virus merupakan parasit obligat yang hanya mampu berkembang biak di dalam sel-sel organisme yang dapat dimasukinya atau sel inang (host cell). Virus dapat berada/hidup hampir disemua kelompok organisme yang mempunyai sel. Dalam mikrobiologi pangan, virus-virus yang penting adalah yang dapat menular pada manusia dan dipindahkan/ditularkan melalui konsumsi bahan pangan dan bakteriofage, yang menghancurkan bakteri yang dipergunakan dalam fermentasi bahan pangan. Virus dapat dipindahkan dari satu sel ke sel yang lain dalam bentuk partikel kecil yang bersifat menular yang pada ukuran tertentu. Setiap virion terdiri dari inti asam nukleat yang berada di dalam suatu

lapisan protein atau capsul. Pada saat masuk ke dalam sel inang, virus memimpin sintesa virion yang baru oleh sel inang yang terinfeksi. Semua virus pertumbuhannya tergantung kondisi sel inang. Virus dapat hidup di luar sel inang dan selalu terdapat dalam tanah, air dan substrat seperti bahan pangan, tetapi hanya akan berkembang biak dan mengakibatkan infeksi setelah masuk ke dalam sel inang. Dalam bahan pangan, virus tidak dapat berkembang baik sebagaimana halnya bakteri dan kapang.

2.4. Peranan Mikroorganisme

Mikroorganisme tersebar luas di alam dan sebagai akibatnya hasil laut yang umumnya tidak steril, telah tercemar oleh berbagai jenis mikroorganisme. Tidak berbeda dengan makhluk lainnya, ikan yang hidup, juga dihuni oleh sejumlah bakteri, tergantung pada mutu air yang didiami ikan, pada setiap sentimeter persegi kulitnya, terdapat 10^2 - 10^3 bahkan dapat mencapai 10^5 /gram. Pada bagian isi perut ikan yang lapar, terdapat sedikit bakteri sedangkan pada ikan yang kenyang terdapat sejumlah besar sekitar 10^7 bakteri per gram isi perut. Selain itu ada juga yang menyatakan 10^3 - 10^5 bakteri per ml cairan intestinal..

Bahan pangan selain merupakan sumber gizi bagi manusia, juga sebagai sumber makanan bagi perkembangan mikroorganisme. Terlebih lagi pada ikan laut Pertumbuhan atau perkembangan mikroorganisme dalam makanan, sangat erat hubungannya dengan kehidupan manusia. Ada beberapa hal yang penting dalam hubungan tersebut.

1) Kerusakan bahan pangan

Pertumbuhan mikroorganisme di dalam makanan dapat berakibat berbagai perubahan fisik maupun kimiawi yang tidak diinginkan, sehingga bahan pangan tersebut tidak layak untuk dikonsumsi. Keadaan ini akan lebih nyata lagi terhadap hasil perikanan, khususnya pangan laut, dimana mempunyai

kandungan protein yang tinggi. Pada ikan laut kandungan proteinnya mencapai 12,7 %, lemak 3,5 % dan air 81,9 %. Apabila hal ini terjadi, produk pangan tersebut dinyatakan sebagai bahan pangan yang busuk dan ini menggambarkan penyalahgunaan sumber gizi yang berharga.

2) Penyakit.

Bahan pangan dapat bertindak sebagai perantara atau substrat untuk tumbuhnya mikroorganisme yang bersifat patogenik terhadap manusia. Penyakit menular yang cukup berbahaya seperti tipus, kolera disentri, tbc dan poliomyelitis dengan mudah disebarkan melalui bahan pangan. Akhir-akhir ini terjadi peningkatan gangguan saluran pencernaan (gastrointestinal) akibat keracunan bahan pangan yang disebarkan oleh mikroorganisme patogenik yang termakan bersama bahan pangan yang tercemar.

Sebagai akibat dari meningkatnya perjalanan dan perdagangan pangan secara internasional, maka penyakit yang disebabkan bahan pangan dan keamanan bahan pangan dari mikroorganisme telah menjadi perhatian utama dunia.

3) Fermentasi makanan

Dalam beberapa hal pertumbuhan mikroorganisme dalam bahan pangan menyebabkan perubahan yang menguntungkan seperti perbaikan bahan pangan dari segi mutu dari aspek gizi maupun dari daya cerna serta meningkatnya daya simpannya. Pada umumnya melibatkan proses fermentasi (bahan pangan) oleh mikroorganisme dan sebagai contoh adalah keju dan yogurt (dari susu), tempe (dari kedelai) dan tape (dari ubi kayu). Masih banyak contoh bahan pangan hasil fermentasi, antara lain minuman beralkohol. Penggunaan mikroorganisme sendiri sebagai sumber protein dan vitamin bagi konsumsi manusia dan ternak (protein sel tunggal - single cell protein), saat ini merupakan pokok perhatian utama dan bahan perdebatan.

III. MENGHITUNG ORGANISME DALAM BAHAN PANGAN

Mutu mikrobiologi dari suatu produk makanan ditentukan oleh jumlah dan jenis mikroorganisme (jasad renik) yang terdapat dalam bahan pangan. Mutu mikrobiologis ini akan menentukan ketahanan simpan dari produksi tersebut, ditinjau dari kerusakan oleh mikroorganisme. Sedangkan keamanan produk dari mikroorganisme ditentukan oleh jumlah spesies patogen yang terdapat. Jadi kemampuan untuk mengukur secara tepat jumlah mikroorganisme yang umum terdapat dalam bahan pangan dan jumlah mikroorganisme spesifik yang berada dalam produk pangan merupakan dasar yang penting bagi mikrobiologi pangan. Hal tersebut meliputi dua pertimbangan utama, yaitu :

- (1) Pengambilan contoh yang tepat dari produksi yang akan diuji
- (2) Enumerasi atau penghitungan mikroorganisme yang terdapat pada contoh.

3.1. Pengambilan Contoh

1) Perencanaan Pengambilan Contoh (*sampling plans*)

Di luar ketepatan dari cara perhitungan mikroorganisme yang digunakan, kesimpulan yang berarti tentang mutu mikrobiologis produk hanya dapat diperoleh apabila dilakukan prosedur pengambilan contoh yang cukup. Keputusan yang harus dibuat, diambil sebelum perhitungan adalah :

- berapa jumlah contoh dari produk yang akan diuji,
- berapa ukuran contoh yang harus diambil untuk analisa, dan
- metoda apa yang dipakai untuk analisa, serta
- metoda apa yang harus digunakan dalam pengambilan contoh.

Jumlah keseluruhan dan penyebaran yang merata dari mikroorganisme dalam bahan pangan akan mempengaruhi jumlah besarnya contoh yang akan diambil. Makin banyak mikroorganisme dan makin merata penyebarannya dalam bahan pangan, makin kecil dan sedikit contoh yang akan diuji. Pertimbangan ini akan membedakan pengambilan contoh untuk sebotol susu yang tercampur secara baik, 50 kg tepung dalam satu karung atau daging dari seekor ikan atau karkas ayam. Sebagai tambahan, beberapa bahan pangan lebih homogen dalam satu "lot" atau unit, tetapi akan berbeda di antara beberapa "lot". Dengan kata lain, jika dalam satu kiriman bahan pangan terdiri umpamanya 10.000 paket dari masing-masing 1 kg kelapa kering, tidak dibenarkan untuk memutuskan tentang mutu dari seluruh paket tersebut hanya berdasarkan analisa/pengujian dari satu paket saja. Jelasnya, makin banyak paket yang diuji, akan memberikan keputusan akhir yang lebih dapat dipercaya tentang seluruh paket. Secara ideal semua bagian tersebut harus diuji untuk mendapatkan keputusan yang benar-benar dapat dipercaya. Tetapi hal tersebut tidak mungkin dilakukan, karena membutuhkan banyak waktu, biaya dan peralatan dan sudah tentu tidak ada produk yang tersisa untuk dijual. Guna mengatasi masalah ini maka untuk berbagai produk telah dikembangkan perencanaan pengambilan contoh yang dirumuskan berdasarkan peluang secara statistik terhadap resiko konsumen maupun produsen. Perencanaan ini menunjukkan berapa banyak "lot" atau unit yang harus diuji dan ukuran dari contoh yang akan dianalisa. Perlu ditekankan bahwa untuk setiap perencanaan pengambilan contoh, pemilihan dari bagian-bagian yang akan dianalisa harus terhindar dari bias. Oleh karena itu perlu dilakukan pengambilan contoh secara acak (*random sampling*).

2) Metode Pengambilan Contoh

Selain adanya konsekuensi pengambilan contoh secara statistik, terdapat beberapa aspek praktis dari pengambilan contoh yang dapat mempengaruhi keterandalan perhitungan jumlah mikroorganisme.

Tata cara pengambilan contoh, pertama :

- Harus dipergunakan teknik aseptis selama pengambilan contoh agar tidak terjadi pencemaran lebih lanjut pada contoh yang diambil.
- Alat-alat yang dipergunakan harus steril.
- Bahan pangan berbentuk cair harus diambil dengan pipet yang steril.
- Untuk produk-produk berbentuk padat, alat-alat yang digunakan seperti pisau garpu, sendok dan penjepit harus disterilkan terlebih dahulu.
- Penimbangan contoh harus mempergunakan wadah yang disterilkan.
- Contoh-contoh tersebut harus segera dianalisa setelah diambil untuk mengurangi kemungkinan perubahan jumlah mikroorganisme selama waktu penundaan. Hal ini khususnya untuk bahan-bahan pangan yang mudah rusak seperti daging, ikan dan susu.
- Jika contoh-contoh tersebut tidak dapat dianalisa dalam jangka waktu 2-3 jam setelah diambil, maka contoh-contoh ini harus disimpan pada suhu 4°C sebelum diuji – tetapi penyimpanan tidak boleh lebih lama dari 10 – 12 jam .

3) Suspensi Contoh

Tahapan terakhir dari pengambilan contoh adalah membebaskan mikroorganisme dari contoh. Mikroorganisme dapat tersuspensi secara bebas dalam hampir semua larutan, sehingga tidak perlu ada perlakuan lain, kecuali pencampuran yang merata sebelum dilakukan perhitungan. Untuk bahan

pangan yang berbentuk padat, mikroorganisme yang bersangkutan harus dilarutkan menjadi suspensi untuk dihitung. Pengambilan dengan cara :

- mengusap permukaan produk (swabbing),
- pencucian (rinsing), dan
- penghancuran (blending),

merupakan tiga prosedur yang umum digunakan untuk tujuan ini. Prinsip dan teknik dari tiap-tiap prosedur, akan dijelaskan di penuntun praktikum di laboratorium.

Penghancuran contoh dalam suatu larutan steril seperti larutan 0.1 % pepton akan melepas hampir semua mikroorganisme ke dalam suspensi yang dapat dihitung dan secara keseluruhan memberi hasil yang dapat dipercaya. Tetapi proses ini tidak selalu dapat dilakukan, misalnya pada karkas ayam atau ikan. Oleh karena itu prosedur pembilasan dan pengusapan permukaan contoh (swabbing) lebih baik untuk produk-produk tersebut.

3.2. Prosedur Perhitungan

1) Analisis Kuantitatif Mikrobiologi

Analisis kuantitatif mikrobiologi pada bahan pangan penting dilakukan untuk mengetahui mutu bahan pangan, dan menghitung proses pengawetan yang akan diterapkan pada bahan pangan tersebut. Beberapa cara dapat digunakan untuk menghitung atau mengukur jumlah mikroorganisme (jasad renik) di dalam suatu suspensi atau bahan, yang dapat dibedakan atas beberapa kelompok, yaitu :

- a. Perhitungan jumlah sel
 - (1) Hitungan Mikroskopik
 - (2) Hitungan Cawan (TPC)
 - (3) Most Probable Number (MPN)

b. Perhitungan massa sel secara langsung

- (1) Volumetrik
- (2) Gravimetrik
- (3) Kekeruhan (turbidimetri)

c. Perhitungan massa sel secara tidak langsung

- (1) Analisis komponen sel (protein, DNA, ATP dan sejenisnya)
- (2) Analisis produk katabolisme (metabolit primer atau sekunder, panas)
- (3) Analisis konsumsi nutrisi (karbon, nitrogen, oksigen, asam amino, mineral dan lainnya)

Perhitungan massa sel secara langsung maupun tidak langsung, jarang digunakan dalam uji mikrobiologi bahan pangan, tetapi sering digunakan untuk mengukur pertumbuhan sel selama fermentasi. Dalam perhitungan massa sel secara langsung, jumlah sel jasad renik dapat dihitung jika medium pertumbuhan tidak mengganggu pengukuran. Sebagai contoh, dalam metode volumetrik dan gravimetrik, pengukuran volume dan berat sel dilakukan dengan terlebih dahulu menyaring sel-sel jasad renik. Oleh karena itu jika substrat tempat tumbuhnya banyak mengandung padatan, misalnya bahan pangan, sel jasad renik tidak dapat diukur menggunakan metode volumetrik, gravimetrik maupun turbidimetri. Perhitungan massa sel secara tidak langsung sering digunakan dalam mengamati pertumbuhan sel selama proses fermentasi, dimana komposisi substrat atau bahan yang difermentasi dapat diamati dan diukur dengan teliti.

Dalam hal ini akan dijelaskan cara perhitungan jumlah sel yang umum digunakan dalam uji mikrobiologi bahan pangan, yaitu hitungan

- mikroskopik (*Direct Microscopic Counts*),
- hitung cawan (*Total Plate Count*) dan
- MPN (*Most Probable Number*).

2) Perhitungan Jumlah Sel

Jumlah seluruh sel dalam larutan contoh dapat dihitung secara cepat dan langsung dengan menghitung jumlah sel yang terlihat dibawah mikroskop.

Ada dua prosedur yaitu :

- (1) prosedur yang paling sederhana ialah menghitung secara mikroskopis masing-masing sel di dalam suspensi contoh dengan volume yang sangat sedikit dan telah diukur dengan teliti. Perhitungan ini dilakukan dengan menggunakan kaca slide khusus yang dikenal sebagai kotak penghitung (*counting chamber*). Kaca slide ini terdiri dari kotak-kotak kecil dengan ukuran tertentu dan dibentuk sedemikian rupa sehingga suatu larutan tipis yang diketahui tebalnya dapat diletakkan diantara kaca slide ini dengan gelas penutupnya. Dengan demikian volume cairan yang berada di tiap-tiap kotak dapat diketahui secara pasti. Oleh karena volume ini diketahui dalam jumlah sel dalam tiap-tiap kotak dapat terlihat dan dihitung, maka jumlah sel / ml larutan asal dapat diketahui
- (2) Cara lain untuk menghitung jumlah sel total secara mikroskopis adalah dengan menggunakan lapisan suspensi contoh yang telah diwarnai.

(1) Hitungan Mikroskopik

Metode Breed

Hitungan mikroskopik dengan metode Breed, sering digunakan untuk menganalisa susu yang mengandung bakteri dalam jumlah tinggi, misalnya susu yang diperoleh dari sapi yang terkena mastitis, yaitu suatu penyakit infeksi yang menyerang kelenjar susu sapi. Cara ini merupakan suatu cara cepat, yaitu menghitung bakteri secara langsung menggunakan mikroskop. Cara ini mempunyai kelemahan, yaitu tidak dapat dilakukan terhadap susu yang telah

dipasteurisasi, karena secara mikroskopik tidak dapat dibedakan antara sel-sel bakteri yang masih hidup atau yang telah mati, karena perlakuan pasteurisasi.

Dalam metode ini, luas areal pandang (field) mikroskop yang akan digunakan, harus dihitung terlebih dahulu. Hal ini dapat dilakukan dengan cara mengukur diameter areal pandang menggunakan mikrometer yang dilihat melalui lensa minyak imersi.

Untuk menghitung jumlah bakteri di dalam susu, sebanyak 0,01 ml susu dipipet dengan pipet Breed dan disebarakan di atas gelas obyek, sehingga mencapai luas 1 cm². Kemudian didiamkan sampai kering, difiksasi dan diwarnai dengan biru metilen. Rata-rata jumlah bakteri per areal pandang mikroskopik ditentukan setelah mengamati 10 sampai 60 kali areal pandang, tergantung dari jumlah bakteri pada areal pandang. Sel-sel yang mengumpul dalam kelompok, dihitung jumlah sel yang terdapat di dalam kelompok tersebut, tetapi jika tidak mungkin dapat dihitung sebagai suatu satu kelompok. Hasil perhitungan berdasarkan jumlah kelompok bakteri biasanya lebih mendekati hasil perhitungan jumlah bakteri menggunakan agar cawan. Pada sapi yang terserang mastitis, biasanya dalam susunya mengandung sel-sel darah putih dalam jumlah tinggi. Setelah pewarnaan dengan biru metilen, sel-sel darah putih akan terlihat sebagai sel yang bulat atau berbentuk tidak teratur, berwarna biru dengan ukuran lebih besar dari pada bakteri.

Mikrometer yang digunakan adalah mikrometer gelas obyek yang mempunyai skala terkecil 0,01 mm. Areal pandang mikroskop biasanya mempunyai ukuran 14 – 16 skala atau 0,14 – 0,16 mm. Beberapa mikroskop mungkin mempunyai ukuran diameter areal pandang lebih dari 0,18 mm.

$$\text{Luas areal pandang mikroskop} = \pi r^2 \text{ mm}^2$$

$$= \frac{\pi r^2}{100} \text{ cm}^2$$

Dimana r = jari-jari (mm) areal pandang mikroskop. Karena contoh susu yang disebarakan pada gelas obyek seluas 1 cm² adalah 0,01 ml, maka :

$$\begin{aligned} \text{Jumlah susu per areal pandang mikroskop} &= \frac{\pi r^2}{100} \text{ cm}^2 \times 0,01 \text{ ml} \\ &= \frac{\pi r^2}{10.000} \text{ ml} \end{aligned}$$

Dengan kata lain, untuk mendapatkan 1 ml contoh susu, dapat diperoleh dari $10.000/\pi r^2$ x areal pandang mikroskop. Angka $10.000/\pi r^2$ disebut juga faktor mikroskopik (FM), dan digunakan untuk mengubah jumlah bakteri per areal pandang mikroskop menjadi jumlah bakteri per ml.

$$\begin{array}{l} \text{Jumlah bakteri} \\ \text{Per ml} \end{array} = \frac{10.000}{\pi r^2} \times \begin{array}{l} \text{jumlah bakteri per} \\ \text{areal pandang} \end{array}$$

Jumlah bakteri per areal pandang dihitung dari rata-rata pengamatan areal pandang. Jumlah areal pandang yang harus diamati tergantung dari jumlah rata-rata bakteri per areal pandang, dan ditentukan sebagai berikut :

Jumlah rata-rata bakteri per areal pandang	Jumlah areal pandang yang harus diamati
< 0,6	50
0,5 - 1	25
1 - 10	10
10 - 30	5
> 30	Dilaporkan sebagai TBUD (terlalu banyak untuk dihitung)

Metode Petroff-Hausser

Dalam metode Petroff-Hausser, hitungan mikroskopik dilakukan dengan pertolongan kotak-kotak skala, dimana dalam setiap ukuran skala seluas 1 mm² terdapat 25 buah kotak besar dengan luas 0,04 mm², dan setiap kotak besar terdiri dari 16 kotak kecil. Tinggi contoh yang terletak di antara gelas obyek dengan gelas penutup adalah 0.02 mm. Jumlah sel dalam beberapa kotak besar dihitung, kemudian dihitung jumlah sel rata-rata dalam satu kotak besar. Jumlah sel per ml contoh dapat dihitung sebagai berikut :

$$\begin{array}{l} \text{Jumlah sel} \\ \text{per ml} \\ \text{contoh} \end{array} = \begin{array}{l} \text{jumlah sel} \\ \text{per kotak} \\ \text{besar} \end{array} \times \begin{array}{l} 25 \text{ kotak} \\ (= 1 \text{ mm}^2) \end{array} \times \frac{1}{0,02} \times 10^3$$

$$\begin{aligned} \text{Jumlah sel per ml contoh} &= \text{Jumlah sel per kotak besar} \times 25 \times 50 \times 10^3 \\ &= \text{Jumlah sel per kotak besar} \times 1,25 \times 10^6 \end{aligned}$$

Hitungan mikroskopik merupakan metode yang cepat dan murah, tetapi mempunyai beberapa kelemahan, yaitu :

- (1) Sel-sel yang telah mati tidak dapat dibedakan dari sel-sel hidup, oleh karena itu keduanya akan terhitung.
- (2) Sel-sel yang berukuran sangat kecil, sukar dilihat di bawah mikroskop, sehingga kadang-kadang tidak terhitung.
- (3) Untuk mempertinggi ketelitian, jumlah sel di dalam suspensi harus cukup tinggi, misalnya untuk bakteri minimal 10⁶ sel/ml. Hal ini disebabkan dalam setiap bidang pandang yang diamati harus terdapat sejumlah sel yang dapat dihitung.
- (4) Tidak dapat digunakan untuk menghitung sel jasad renik di dalam bahan pangan yang banyak mengandung debris atau ekstrak makanan, karena hal ini akan mengganggu dalam perhitungan.

Oleh karena itu, dengan mempertimbangkan hal-hal diatas, maka bahan pangan homogenat tidak dapat dianalisa dengan mikroskop seperti tersebut diatas, walaupun bahan pangan berbentuk cairan mungkin dapat dianalisa dengan cara ini.

(2) Hitungan Cawan

Mungkin yang paling sering dan banyak digunakan adalah prosedur perhitungan dengan penumbuhan dalam agar. Secara sederhana suatu contoh suspensi sel atau bahan pangan homogenat diinokulasi ke dalam atau ke atas media nutrisi agar dan setelah diinkubasi, jumlah koloni yang terbentuk dihitung. Karena koloni terbentuk dari satu sel, maka jumlah koloni menunjukkan jumlah sel dalam larutan asalnya.

Prosedur ini hanya menghitung sel-sel yang hidup, dimana sangat peka. Suspensi contoh yang mengandung sejumlah kecil sel hingga 20 sel/ml masih dapat dihitung. Keuntungan lain adalah kemungkinan untuk mengetahui berbagai jenis organisme yang berada dalam contoh dari perbedaan bentuk koloni yang tumbuh dan kemungkinan mengisolasi tipe koloni yang paling dominan untuk identifikasi taksonomi.

Prinsip dari metode hitungan cawan adalah jika sel jasad renik yang masih hidup ditumbuhkan pada medium agar, maka sel jasad renik tersebut akan berkembang biak membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dan dihitung dengan mata tanpa menggunakan mikroskop. Metode hitungan cawan merupakan cara yang paling sensitif untuk menentukan jumlah jasad renik, karena :

- (1) Hanya sel yang masih hidup yang dihitung.
- (2) Beberapa jenis jasad renik dapat dihitung sekali gus.

- (3) Dapat digunakan untuk isolasi dan identifikasi jasad renik, karena koloni yang terbentuk mungkin berasal dari suatu jasad renik yang mempunyai penampakan pertumbuhan spesifik.

Selain keuntungan tersebut, metode hitungan cawan juga mempunyai kelemahan, yaitu :

- (1) Hasil perhitungan tidak menunjukkan sel yang sebenarnya, karena beberapa sel yang berdekatan mungkin membentuk satu koloni.
- (2) Medium dan kondisi inkubasi yang berbeda mungkin menghasilkan nilai yang berbeda.
- (3) Jasad renik yang ditumbuhkan harus dapat tumbuh pada medium padat dan membentuk koloni yang kompak dan jelas, tidak menyebar.
- (4) Memerlukan persiapan dan waktu inkubasi relatif lama, sehingga pertumbuhan koloni dapat dihitung.

Dalam metode hitungan cawan, bahan pangan yang diperkirakan mengandung lebih dari 300 sel jasad renik per ml atau per gram atau per cm (jika pengambilan contoh dilakukan pada permukaan), memerlukan perlakuan pengenceran sebelum ditumbuhkan pada media agar di dalam cawan petri. Setelah inkubasi, akan terbentuk koloni pada cawan tersebut dalam jumlah yang dapat dihitung, dimana jumlah yang terbaik adalah di antara 30 sampai 300 koloni. Pengenceran biasanya dilakukan secara desimal, yaitu 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000, dan seterusnya, atau 1 : 100, 1 : 10.000, 1 : 1.000.000 dan seterusnya. Larutan yang digunakan untuk pengenceran dapat berupa larutan bufer fosfat, 0,85 % NaCl, atau larutan Ringer.

Cara pemupukan dalam metode hitungan cawan dapat dibedakan atas dua cara, yaitu :

- metode tuang (*pour plate*), dan
- metode permukaan (*surface/spread plate*).

Dalam metode tuang, sejumlah contoh (1 ml atau 0,1 ml) dari pengenceran yang dikehendaki, dimasukkan ke dalam cawan petri, kemudian ditambahkan agar cair steril yang telah didinginkan (47 – 50°C) sebanyak 15 – 20 ml dan digoyangkan supaya contoh menyebar rata.

Pada pemupukan dengan metode permukaan, terlebih dahulu dibuat agar cawan, kemudian sebanyak 0,1 ml contoh yang telah diencerkan dipipet pada permukaan agar tersebut, dan diratakan dengan batang gelas melengkung yang steril. Jumlah koloni dalam contoh, dapat dihitung, sebagai berikut :

$$\begin{array}{l} \text{Koloni per ml} \\ \text{atau per gram} \end{array} = \begin{array}{l} \text{Jumlah koloni} \\ \text{per cawan} \end{array} = \frac{1}{\text{Faktor pengenceran}}$$

Untuk melaporkan hasil analisa mikrobiologi dengan cara hitungan cawan, digunakan suatu standar yang disebut “Standard Plate Counts” (SPC), sebagai berikut :

- (1) Cawan yang dipilih dan dihitung adalah yang mengandung jumlah koloni antara 50 dan 300.
- (2) Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu, merupakan satu kumpulan koloni yang besar, dimana jumlah koloninya diragukan dapat dihitung sebagai satu koloni.
- (3) Satu deretan rantai koloni yang terlihat sebagai suatu garis tebal, dihitung sebagai satu koloni.

Dalam SPC ditentukan cara pelaporan dan penghitungan koloni sebagai berikut :

- (1) Hasil yang dilaporkan hanya terdiri dari dua angka, yaitu angka pertama (satuan) dan angka kedua (desimal). Jika angka yang ketiga sama dengan atau lebih besar dari 5, harus dibulatkan satu angka lebih

tinggi pada angka kedua. Contoh : $1,7 \times 10^3$ unit koloni/ml atau $2,0 \times 10^6$ unit koloni/gr.

- (2) Jika pada semua pengenceran dihasilkan kurang dari 30 koloni pada cawan petri, berarti pengenceran yang dilakukan terlalu tinggi, oleh karena itu jumlah koloni pada pengenceran yang terendah yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai kurang dari 30 dikalikan dengan besarnya pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan di dalam tanda kurung.
- (3) Jika pada semua pengenceran dihasilkan lebih dari 300 koloni pada cawan petri, berarti pengenceran yang dilakukan terlalu rendah, oleh karena itu jumlah koloni pada pengenceran yang tertinggi yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai lebih dari 300 dikalikan dengan faktor pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan di dalam tanda kurung.

Jika pada cawan dari dua tingkat pengenceran dihasilkan koloni dengan jumlah antara 30 dan 300, dan perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah dari kedua pengenceran tersebut lebih kecil atau sama dengan dua, dilaporkan rata-rata dari kedua nilai tersebut dengan

- (4) memperhitungkan faktor pengencerannya. Jika perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah lebih besar dari 2, yang dilaporkan hanya hasil yang terkecil.
- (5) Jika digunakan dua cawan petri (duplo) perpengenceran, data yang diambil harus dari kedua cawan tersebut, tidak boleh diambil salah satu. Oleh karena itu harus dipilih tingkat pengenceran yang menghasilkan kedua cawan duplo dengan koloni di antara 30 dan 300.

(3) Metode MPN (Most Probable Number)

Dalam bidang kesehatan masyarakat dari mikrobiologi pangan, prosedur ini dipergunakan secara luas untuk menghitung jumlah bakteri yang ada dalam bahan pangan. Metode ini berdasarkan pengenceran. Apabila suatu larutan mengandung sel-sel mikroorganisme diencerkan terus menerus, akan diperoleh suatu larutan dimana tidak dijumpai sel yaitu dikatakan steril.

Berbeda dengan metode hitungan cawan, dimana digunakan medium padat, dalam metode MPN digunakan medium cair di dalam tabung reaksi, dimana perhitungan dilakukan berdasarkan jumlah tabung yang positif, yaitu yang ditumbuhi oleh jasad renik setelah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu. Pengamatan tabung yang positif dapat dilihat dengan mengamati timbulnya kekeruhan, atau terbentuknya gas di dalam tabung kecil (tabung Durham) yang diletakkan pada posisi terbalik, yaitu untuk jasad renik pembentuk gas. Untuk setiap pengenceran, pada umumnya digunakan tiga atau lima seri tabung. Lebih banyak tabung yang digunakan menunjukkan ketelitian yang lebih tinggi, tetapi alat gelas yang digunakan juga lebih banyak.

Dalam metode MPN, pengenceran harus dilakukan lebih tinggi dari pada pengenceran dalam hitungan cawan, sehingga beberapa tabung yang berisi medium cair yang diinokulasi dengan larutan hasil pengenceran tersebut mengandung satu jasad renik, beberapa tabung mungkin mengandung lebih dari satu sel, sedangkan tabung lainnya tidak mengandung sel. Dengan demikian, setelah inkubasi diharapkan terjadi pertumbuhan pada beberapa tabung, yang dinyatakan sebagai tabung positif, sedangkan tabung lainnya negatif.

Metode MPN biasanya digunakan untuk menghitung jumlah jasad renik di dalam contoh yang berbentuk cair, meskipun dapat pula digunakan untuk contoh berbentuk padat dengan terlebih dahulu membuat suspensi 1 : 10 dari contoh

tersebut. Grup jasad renik yang dapat dihitung dengan metode MPN juga bervariasi, tergantung dari medium yang digunakan untuk pertumbuhan. Dalam metode MPN, dari setiap pengenceran dimasukkan 1 ml masing-masing ke dalam tabung yang berisi medium, dimana untuk setiap pengenceran digunakan tiga seri tabung atau lima seri tabung. Setelah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu, dihitung jumlah tabung yang positif, yaitu tabung yang ditumbuhi jasad renik yang dapat ditandai dengan timbulnya kekeruhan. Misalnya pada pengenceran pertama, ketiga tabung menghasilkan pertumbuhan positif, pada pengenceran kedua, dua tabung positif, pada pengenceran ketiga, satu tabung positif, dan pada pengenceran keempat (terakhir), tidak ada tabung yang positif. Kombinasinya menjadi 3, 2, 1, 0 dan jika diambil tiga pengenceran yang pertama, kombinasinya akan menjadi 3, 2, 1. Angka kombinasi ini kemudian dicocokkan dengan Tabel MPN (Lampiran 1 s/d 3), dan nilai MPN contoh dapat dihitung sebagai berikut.

$$\text{MPN contoh} = \text{Nilai MPN dari Tabel} \times \frac{1}{\text{Pengenceran tabung tengah}}$$

Tabel yang digunakan untuk menentukan nilai MPN dari tiga seri tabung berbeda dengan tabel untuk lima seri tabung. Kombinasi yang dipilih dimulai dari pengenceran tertinggi yang masih menghasilkan semua tabung positif, sedangkan pada pengenceran yang berikutnya ada tabung yang negatif. Kombinasi yang diambil terdiri dari tiga pengenceran. Jika pada pengenceran yang keempat atau seterusnya masih ditemukan tabung yang hasilnya positif, maka jumlah tabung yang positif tersebut harus ditambahkan pada angka kombinasi yang ketiga, sampai mencapai jumlah maksimum.

Metode MPN dapat digunakan untuk menghitung jumlah jasad renik tertentu yang terdapat di antara campuran jasad renik lainnya. Sebagai contoh, jika digunakan Lactose Broth, maka adanya bakteri yang dapat memfermentasi

laktosa ditunjukkan dengan terbentuknya gas di dalam tabung Durham. Cara ini biasa digunakan untuk menentukan MPN koliform terhadap air atau minuman, karena bakteri koliform termasuk bakteri yang dapat menfermentasi laktosa.

Keuntungan dari metode ini adalah :

- (1) Dapat dibuat sangat peka dengan penggunaan volume inokulum contoh yang lebih besar dari 1,0 ml tabung.
- (2) Bahan-bahan dapat dipersiapkan untuk tugas lapangan
- (3) Media pertumbuhan selektif dapat digunakan untuk menghitung jenis mikroorganisme yang diharapkan di antara jenis-jenis lainnya yang ada dalam bahan pangan tersebut.

Kerugiannya adalah dibutuhkannya banyak ulangan untuk diperoleh hasil yang teliti. Hal ini berarti banyak biaya dan waktu yang dibutuhkan untuk persiapannya. Perlu ditekankan disini bahwa metoda ini banyak digunakan untuk menghitung bakteri patogenik dalam jumlah sedikit yang terdapat dalam bahan pangan.

3) Prosedur Penyaringan dengan Membran (*membrane filtration*)

Dibandingkan perhitungan dengan cawan petri, penyaringan dengan membran (*membrane filtration*) merupakan teknik menghitung mikroorganisme yang baru. Dalam metode ini larutan contoh yang akan diuji disaring dengan menggunakan membran steril atau filter yang mempunyai pori-pori berukuran sangat kecil, sehingga mikroorganisme dalam suspensi dapat tertinggal pada membran. Membran dengan ukuran $0,45\mu$ seringkali digunakan untuk menghitung bakteri dan khamir. Virus berukuran lebih kecil dari $0,45\mu$ akan lewat melalui membran. Setelah penyaringan membran yang berisi sel-sel mikroorganisme yang tertinggal pada permukaan, dipindahkan secara aseptis dan diletakkan kedalam suatu cawan steril berisi kertas saring yang di jenuhkan

dengan media nutrien cair dengan bagian yang ada selnya menghadap keatas. Cawan beserta kertas penyaring kemudian diinkubasi dan diperiksa terhadap pertumbuhan koloni di permukaan kertas saring. Cara lain, membran dapat pula di pindahkan pada permukaan media nutrien dalam cawan petri. Zat-zat gizi akan didifusi melalui membran sehingga pertumbuhan sel mikoorganisme yang tertangkap dipermukaan dimungkinkan. Teknik ini sangat peka sekali pada jumlah contoh 100 ml atau lebih dapat dipergunakan, walau hanya 5 sel dalam contoh dapat diketahui sebagai koloni pada membran. Dengan metode ini memungkinkan untuk mengetahui sel-sel yang walaupun hanya terdapat 5 sel hidup dalam 100 ml contoh, dimana hal ini tidak mungkin pada prosedur penumbuhan pada agar. Pekerjaan dari teknik penyaringan dengan lapisan tipis ini tidak terlalu banyak dan cukup tepat. Walaupun demikian, suatu modal yang cukup besar di butuhkan untuk membeli peralatan-peralatan yang cukup untuk pekerjaan rutin dan masing-masing harus di sterilkan sebelum dipakai. Hal yang paling mengganggu dari teknik ini adalah membran ini mudah tersumbat oleh beberapa zat tertentu seperti homogenat bahan pangan Sehingga penggunaan teknik ini terbatas hanya pada contoh-contoh berbentuk cairan seperti air, minuman berkarbonat dan beralkohol.

4) Faktor Yang Mempengaruhi Perhitungan Sel-sel Hidup

Pemilihan pelarut yang dipakai untuk menyiapkan bahan pangan homogenat kemudian untuk persiapan pengenceran secukupnya untuk menghitung akan sangat berpengaruh pada hasil akhir. Beberapa studi terdahulu maupun akhir-akhir ini menggunakan air steril, air garam steril dan bufer fosfat steril sebagai pelarut. Penelitian yang dilakukan sejak dua puluh tahun terakhir menunjukkan bahwa produk pangan, jumlah sel yang lebih rendah umumnya akan diperoleh apabila menggunakan pelarut-pelarut tersebut

dibandingkan dengan pelarut 0,1 % pepton. Oleh karena itu akan diperoleh hasil yang lebih rendah dari jumlah mikroba yang sebenarnya. Berdasarkan penelitian, beberapa bakteri dapat mudah mengalami kerusakan apabila dilarutkan dalam air dan larutan air garam. Seperti pepton nyatanya mempunyai daya pelindung terhadap kerusakan tersebut diatas. Akan tetapi penggunaan larutan bergizi dengan konsentrasi lebih tinggi seperti 1 % pepton tidak dianjurkan, karena dapat mengakibatkan pertumbuhan mikroorganisme dalam pelarut sebelum dihitung. Konsentrasi pepton 0,1 % memberi hasil yang cukup memuaskan sebagai pelarut bagi kebanyakan bahan pangan dan oleh karena itu secara umum dianjurkan untuk dipergunakan. Bahan pangan berasal dari laut disarankan untuk menambahkan 3 % NaCl ke dalam pelarut karena banyak mikroorganisme yang berhubungan dengan bahan tersebut berasal dari laut dan harus membutuhkan garam.

Suhu dan waktu pemeraman dari perhitungan dengan cawan agar dapat juga memberi pengaruh nyata terhadap hasil akhir. Pada umumnya suhu pemeraman 25° – 30° C memberi hasil perhitungan yang lebih tinggi daripada suhu pemeraman 37° C dan waktu pemeraman 18 jam juga memberi hasil yang lebih tinggi daripada 24 jam. Oleh karena itu, bahan pangan segar yang disimpan pada suhu rendah lebih memberi kesempatan tumbuh mikroorganisme yang cocok pada suhu rendah seperti *Pseudomonas* dan *Bacillus* yang tidak tumbuh pada suhu pemeraman 37° C

5) Teknik-teknik Perhitungan Selektif (*selective counting techniques*)

Dalam kerusakan bahan pangan atau kesehatan masyarakat dari mikrobiologi pangan, sering kali diperlukan untuk menghitung suatu jenis mikroorganisme tertentu seperti jenis mikroorganisme pembusuk yang sudah dikenal atau jenis patogen tertentu, seperti *Salmonella*. Walaupun pekerjaan

tersebut mudah dilakukan dengan suatu kultur murni, akan tetapi pada bahan pangan keadaan ini menjadi sukar, karena jenis mikroorganisme yang dikehendaki ini sering kali bercampur dengan jenis-jenis mikroorganisme lainnya. Oleh karena itu, untuk keperluan tersebut, contoh dari produk berbentuk homogen, ditumbuhkan pada media agar yang mengandung zat-zat terpilih yang dapat menghambat pertumbuhan jenis-jenis mikroorganisme yang tidak dikehendaki. Akan tetapi sementara itu memberi kesempatan mikroorganisme yang dikehendaki untuk tumbuh. Karena kondisi selektif tersebut tidak pernah seratus persen efektif dan dapat memberi kesempatan jenis yang tidak diinginkan berkembang. Maka media tersebut dibuat sedemikian rupa mengandung beberapa komponen yang dapat menunjukkan beberapa sifat fisiologis yang khas yang dimiliki oleh jenis mikroorganismenya yang diinginkan, sehingga koloninya menunjukkan warna atau morfologi yang dapat dibedakan. Sebagai contoh, agar bismuth sulfid adalah media selektif untuk jenis *Salmonella*, dimana koloninya akan tampak hitam dan dilingkari warna kaca mengkilat dari endapan bismuth jika ditumbuhkan pada agar bismuth sulfid. Media difensial selektif telah dikembangkan untuk beberapa jenis mikroorganisme dan khususnya untuk spesies-spesies patogenik dimana kehadiran dan jumlahnya perlu cepat diketahui.

Dalam beberapa hal, suatu jenis khusus hanya terdapat dalam jumlah sedikit sekali dalam bahan pangan dan tidak dapat diketahui dengan teknik pertumbuhan dalam agar biasa. Deteksi dan penghitungan dalam hal ini, mula-mula dilakukan dengan tahap pemupukan selektif (*selective enrichment*), dimana contoh pangan diinokulasi ke dalam media cair tertentu yang komposisinya dibuat sedemikian rupa, hingga dapat memberi kesempatan bagi beberapa sel spesies mikroorganisme yang diinginkan tumbuh. Setelah inokulasi secukupnya, contoh yang telah dipupuk ditumbuhkan ke dalam

media agar difrensial selektif, yang dapat membedakannya dengan jenis-jenis mikroorganisme lainnya. Sebagai media pemupukan selektif yang digunakan untuk *Salmonella* ialah *terathionate broth* dimana pertumbuhan spesies-spesies mikroorganisme yang tidak diinginkan ditekan oleh ion tetrathionat.

Penggunaan media selektif dalam mikrobiologi pangan telah menimbulkan suatu masalah baru kedalam perhitungan jumlah mikroorganisme yang di kenal dengan fonemena kerusakan sublethal. Dalam bahan pangan yang telah diolah baik dengan pemanasan, pendinginan, pembekuan, dehidrasi atau diberi zat pengawet, banyak dari mikroorganisme yang hidup sudah tidak normal lagi secara fisiologis maupun biokimia. Sel-sel demikian disebut sel mengalami stres dan telah menderita suatu kerusakan sublethal oleh kondisi pengolahan. Walaupun sel-sel ini masih dapat tumbuh bila ditumbuhkan pada media yang bukan selektif, media bergizi tinggi tetapi tidak dapat tumbuh pada media-media selektif. Kerusakan metabolisme yang disebabkan stres saat pengolahan dapat mengakibatkan sel-sel tersebut peka terhadap bahan-bahan pilihan yang dipergunakan untuk media, dimana sebelum pengolahan sel-sel dapat tahan. Sebagai contoh sel-sel *Salmonella* yang telah mengalami stres dapat tumbuh dalam agar nutrien, tetapi tidak dapat pada agar bismuth sulfid dan karenanya tidak dihitung apabila agar yang terakhir ini dipergunakan. Untungnya kerusakan tersebut sementara dan sel-sel yang mengalami kerusakan/luka ini akan sembuh kembali menjadi normal dan sehat dalam jangka waktu yang tidak terlalu lama, mungkin dalam 1 – 2 jam jika ditaruh dalam *nutrient broth* yang tidak selektif. Dalam praktek apabila akan menguji makanan olahan untuk organisme tertentu menggunakan media selektif, perlu sekali pertama-atama dilakukan pemupukan pendahuluan untuk waktu singkat bagi contoh bahan pangan tersebut dengan memumbuhkannya kedalam suatu *nutrient broth* yang tidak selektif dan inkubasi sebentar. Selanjutnya contoh tersebut diinokulasi

dalam atau pada media selektif tertentu. Sangat penting diperhatikan bahwa inkubasi pemupukan pendahuluan dilakukan sesingkat mungkin - cukup lama bagi sel-sel untuk menyembuhkan dirinya. Bila tidak, akan terjadi perkembang biakan sel-sel yang tidak luka atau baru sembuh, sehingga dapat menimbulkan perhitungan yang berlebihan dari sel-sel yang sebenarnya. Kerusakan sublethal merupakan hal yang sangat penting dalam bahan pangan sehubungan dengan mikrobiologi kesehatan masyarakat. Kegagalan mengenai adanya sel-sel yang mengalami stres dalam produk dapat menyebabkan estimasi yang terlalu rendah dari keamanan mikrobiologis produk yang sebenarnya.

6) Metode Hitungan Tidak Langsung

Salah satu untuk menghitung jumlah sel dalam suatu bahan secara tidak langsung adalah dengan uji biru metilen. Uji biru metilen (BM) biasanya dilakukan terhadap susu, dan dapat memberikan perkiraan jumlah bakteri dalam susu. Dalam uji ini, ditambahkan sejumlah biru metilen ke dalam susu, kemudian diamati kemampuan bakteri dalam susu untuk tumbuh dan menggunakan oksigen yang terlarut, sehingga menyebabkan penurunan kekuatan oksidasi-reduksi dari campuran tersebut. Akibatnya biru metilen yang ditambahkan akan tereduksi menjadi putih metilen. Waktu reduksi, yaitu perubahan warna biru menjadi putih, dianggap selesai jika kira-kira empat per lima dari contoh susu yang terdapat didalam tabung (sebanyak 10 ml) telah berwarna putih. Beberapa penelitian melaporkan perkiraan jumlah koloni yang diperoleh dengan metode hitungan cawan dengan waktu reduksi menggunakan metode biru metilen seperti terlihat pada tabel dibawah ini. Semakin tinggi jumlah bakteri dalam susu, semakin cepat terjadinya perubahan warna dari biru menjadi putih

Tabel Hubungan antara jumlah koloni menggunakan metode cawan dengan waktu reduksi dalam uji biru metilen

waktu reduksi biru metilen (jam)	perkiraan jumlah koloni (x 10 ⁴)
0.5 – 3.5	80 atau lebih
4	40
4.5	25
5	15
5.5	10
6	6
6.5 – 8	2.5
8	1

Metode biru metilen merupakan cara yang lebih cepat dibandingkan dengan metode hitungan cawan dan lebih teliti karena bakteri yang terdapat dalam keadaan berkelompok dimana dalam metode hitungan cawan, dihitung sebagai satu koloni, dalam metode BM hal ini tidak berpengaruh terhadap perhitungan jumlah bakteri.

Kelemahan metode BM adalah karena cara ini tidak praktis dilakukan terhadap susu yang mengandung bakteri hidup dalam jumlah sedikit, misalnya susu yang telah mengalami pasteurisasi, dimana dibutuhkan waktu yang lama sekali untuk mereduksi biru metilen. Kelemahan lainnya adalah karena dalam uji biru metilen diperlukan waktu pengamatan yang terus menerus, yaitu paling sedikit enam jam. Dengan metode ini tidak dibedakan jenis bakteri yang terdapat di dalam susu, misalnya bakteri gram positif atau negatif, pembentuk spora, khamir dan sebagainya.

IV. KEAMANAN PANGAN

4.1. Makanan Sebagai Subtrat Untuk Mikroba

Mikroba dapat menggunakan makanan sebagai sumber gizi untuk hidup dan berkembang biak. Selain berkembang biak, mikroba mengeluarkan enzim yang dapat memecah komponen-komponen di dalam makanan, menjadi molekul-molekul yang lebih kecil, dimana kemungkinan mengakibatkan makanan menjadi busuk. Selain itu beberapa mikroba dapat memproduksi komponen-komponen lain yang mungkin beracun, sebagai hasil dari metabolismenya.

Makanan yang mengandung mikroba dalam jumlah tinggi, tidak selalu menjadi busuk. Misalnya makanan yang dengan sengaja difermentasikan, seperti tempe, oncom, tape, keju, yoghurt, ikan pekasam, ikan peda, ikan jambal roti dan terasi, bukanlah merupakan makanan yang busuk, meskipun jumlah mikroba tinggi. Di dalam makanan-makanan seperti ini, mikroba dengan sengaja ditumbuhkan atau distimulir pertumbuhannya, sehingga dapat mengubah komponen-komponen dalam bentuk lain yang mempunyai sifat-sifat yang diinginkan. Sebaliknya makanan yang tidak busuk atau tidak difermentasi bukan berarti makanan tersebut bebas dari mikroba. Mikroba hampir selalu ada di dalam makanan yang tidak disetrilkan, tetapi jumlahnya mungkin belum cukup tinggi untuk menimbulkan tanda-tanda kebusukan yang dapat dideteksi langsung oleh indera manusia. Meskipun demikian, jika diantara mikroba tersebut terdapat mikroba patogen, ada kemungkinan makanan tersebut dapat menimbulkan keracunan atau penyakit pada orang yang mengkonsumsinya. Hal seperti ini kadang-kadang terjadi pada makanan yang telah diolah, misalnya dengan pemanasan.

4.2. Sifat Mikroba Penyebab Penyakit

Penyakit yang timbul bila seseorang yang mengkonsumsi makanan atau minuman dapat disebabkan karena dua hal. Pertama, makanan atau minuman tersebut mungkin mengandung komponen yang beracun, kedua, makanan atau minuman tersebut mungkin mengandung mikroba dalam jumlah yang cukup untuk dapat menimbulkan gejala sakit. Berdasarkan kedua hal tersebut, penyakit yang ditimbulkan oleh makanan dapat digolongkan dalam dua kelompok besar menurut penyebabnya, yaitu :

- (1) keracunan dan
- (2) infeksi mikroba.

Walaupun dengan demikian, istilah keracunan makanan kadang-kadang digunakan secara umum untuk dinyatakan gejala penyakit yang ditimbulkan sebagai akibat dari mengkonsumsi suatu makanan, baik penyakit tersebut disebabkan oleh racun maupun oleh mikroba penyebab infeksi yang terdapat di dalam makanan tersebut.

Keracunan dapat terjadi karena tertelannya suatu racun yang dapat berupa komponen anorganik, seperti misalnya komponen sianida pada singkong, atau racun organik yang disebut toksin yang mungkin terdapat secara alamiah pada tanaman (gospol, visin dan sebagainya) atau pada hewan (skombrotoksin, tetrodotoksin dan sebagainya). Selain itu keracunan dapat disebabkan karena tertelannya toksin yang merupakan hasil metabolisme sel-sel mikroba tertentu. Gejala-gejala keracunan karena toksin tersebut di atas disebut intoksikasi.

Salah satu contoh intoksikasi yang sudah dikenal adalah keracunan botulisme. Keracunan ini terjadi karena seseorang menelan makanan yang mengandung toksin yang dihasilkan oleh bakteri pembentuk spora *Clostridium botulinum*. Di Jepang pernah terjadi suatu keracunan makanan yang menyebabkan kematian akibat dari mengkonsumsi suatu makanan yang disebut

“izushi” atau “kirikomi”, yaitu merupakan hasil olahan ikan yang difermentasi. Setelah diteliti ternyata terkontaminasi oleh *C. botolium*^N tipe E.

Contoh intoksikasi lainnya adalah keracunan yang disebabkan oleh toksin yang dihasilkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* yang dapat tumbuh pada makanan yang mengandung protein, misalnya pada sosis dan keju, seperti yang pernah terjadi di Eropa. Racun yang dapat menyebabkan intoksikasi misalnya racun bongkrek yang dihasilkan oleh bakteri gram negatif *Pseudomonas cocovenenans*^M, dan aflatoksin yang dihasilkan oleh kapang *Aspergillus flavus* yang tumbuh pada biji-bijian atau kacang-kacangan.

Infeksi mikroba adalah tertelannya atau masuknya mikroba ke dalam tubuh yang kemudian dapat menembus pertahanan tubuh, hidup dan berkembang biak di dalam tubuh. Dalam menghadapi adanya infeksi mikroba dan juga hasil-hasil metabolismenya, biasanya tubuh mengadakan suatu reaksi perlawanan, yang ditandai oleh gejala-gejala demam yang dialami oleh penderita penyakit. Hal ini merupakan salah satu gejala penyakit yang membedakan antara intoksikasi dan infeksi mikroba, dimana penderita intoksikasi biasanya tidak mengalami gejala demam.

Mikroba yang tumbuh pada makanan dan dapat menyebabkan infeksi dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu :

- (1) mikroba patogen yang pertumbuhannya tidak distimulir oleh makanan tempat mikroba itu hidup; dalam hal ini makanan hanya berfungsi sebagai perantara (pembawa), misalnya bakteri-bakteri yang menyebabkan tuberkulosa, difteri, brucellosis, hepatitis, demam Q, dan sebagainya,
- (2) mikroba patogen yang pertumbuhannya distimulir oleh makanan tempat tumbuhnya, sehingga jumlahnya akan bertambah banyak,

misalnya *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* yang bersifat enteropatogenik (EPEC), dan *Vibrio parahaemolyticus*.

Bakteri-bakteri lainnya penyebab infeksi misalnya *Clostridium parfringens*, *Bacillus cereus*, *Shigella sp.*, *Yersinia enterocoliticas*, dan *C. perfringens* serta *B. cereus* adalah bakteri yang juga dapat memproduksi enterotoksin (bersifat enterotoksi genik), sehingga kadang-kadang digolongkan ke dalam kelompok bakteri penyebab intoksikasi. *C. perferingens* tipe A menghasilkan enterotoksin yang akan dilepaskan ke luar sel sewaktu terjadi pembentukan spora (sporulasi) di dalam saluran pencernaan atau di dalam makanan. *B. cereus* juga menghasilkan enterotoksin, tetapi toksin tersebut akan dilepaskan ke ke luar sel sewaktu sel mengalami lisis atau pecah. di dalam saluran pencernaan atau di dalam makanan. Jika toksin dari kedua bakteri tersebut dilepas oleh sel di dalam makanan dan makanan tersebut tertelan masuk ke dalam tubuh, maka gejala yang ditimbulkannya dapat disebut sebagai gejala "intoksikasi". Meskipun demikian, beberapa penelitian menunjukkan bahwa penyakit yang disebabkan oleh ke dua bakteri tersebut baru timbul jika bakteri yang masih hidup tertelan dalam jumlah cukup banyak. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi yang terbaik bagi ke dua bakteri tersebut untuk melepaskan toksinnya adalah di dalam saluran pencernaan. Oleh karena itu ke dua bakteri tersebut juga dapat digolongkan ke dalam kelompok bakteri penyebab infeksi.

4.3. Sifat Patogenik Mikroba

Tidak semua mikroba yang masuk kedalam tubuh dapat menyebabkan penyakit. Untuk dapat menimbulkan penyakit, suatu mikroba harus melalui beberapa tahap penting yaitu :

- masuk ke dalam tubuh,

- berkembang biak di dalam tubuh,
- tahan terhadap sistem pertahanan tubuh, dan
- merusak jaringan tubuh.

Proses yang terjadi disetiap tahapan sangat kompleks dan biasanya di pengaruhi oleh beberapa faktor. Suatu mikroba dapat kehilangan sifat patogeniknya jika salah satu faktor tersebut hilang. Sebagai contoh misalnya bakteri patogen yang dibiakkan berulang-ulang di dalam laboratorium, daya patogeniknya makin lama akan makin berkurang. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa sifat patogeniknya suatu mikroba terhadap hewan dapat dipertahankan dengan cara membiakkannya di dalam tubuh hewan tersebut. (pembiakan *in vivo*)

Biasanya suatu mikroba hanya dapat menimbulkan penyakit jika masuk ke dalam tubuh melalui saluran pencernaan untuk golongan mikroba tertentu, sedangkan mikroba lainnya harus masuk melalui saluran pernafasan, kulit atau saluran-saluran lainnya. Sebagai contoh misalnya gejala disentri basiler yang disebabkan oleh *Shigella sp.* dapat berakibat fatal jika tertelan melalui mulut, sedangkan jika bakteri tersebut menyentuh kulit, hal ini tidak akan menimbulkan infeksi, meskipun kulitnya terluka. Sebaliknya, bakteri penyebab gonorrhoe yaitu *Neisseria gonorrhoeae*. Tidak akan berbahaya jika tertelan melalui mulut, tetapi dapat menimbulkan infeksi pada membran mukosa melalui kontaminasi pada mata atau alat reproduksi.

Mikroba patogen yang terdapat di dalam makanan biasanya masuk ke dalam tubuh melalui saluran pencernaan. Infeksi oleh mikroba tersebut dapat dimulai dari membran mukosa pada dinding saluran pencernaan, terutama pada usus halus. Meskipun demikian, tidak semua mikroba patogen yang masuk melalui saluran pencernaan dapat menyebabkan infeksi pada membran mukosa tersebut, karena sesungguhnya dinding saluran pencernaan dilindungi oleh :

- (1) lapisan lendir atau mukus yang terdapat pada permukaannya,
- (2) pergerakan isi saluran pencernaan, dan
- (3) bakteri komensal yang hidup dan berkembang biak tanpa merugikan, seperti misalnya *Escherichia coli* non-enteropatogenik (non EPEC) yang hidup dalam saluran hewan atau manusia.

Berdasarkan cara penyebaran dan daya penetrasinya di dalam tubuh, bakteri patogen yang dapat menyebabkan infeksi melalui saluran pencernaan dapat dibedakan atas tiga golongan, yaitu :

- (1) bakteri yang berkembang biak pada permukaan dinding saluran pencernaan dan tidak menembus terlalu dalam ke dalam sel-sel mukosa, misalkan bakteri penyebab kolera.
- (2) bakteri yang menembus sel-sel mukosa dan berkembang biak didalam sel-sel tersebut, tetapi tidak menyebar ke jaringan-jaringan yang lebih dalam, misalnya bakteri penyebab disentri basiler,
- (3) bakteri yang menyebar ke jaringan-jaringan yang lebih dalam baik dengan cara menembus sel-sel mukosa atau di antara sel-sel mukosa, misalnya bakteri-bakteri penyebab salmonellosis, infeksi streptokoki dan disentri amuba. Bakteri yang termasuk ke dalam golongan terakhir ini hampir selalu menunjukkan gejala bakteremia (adanya bakteri di dalam darah).

Untuk menyatakan kemampuan suatu mikroba menimbulkan penyakit, biasanya menggunakan istilah virulen. Mikroba yang meskipun terdapat dalam jumlah sedikit sudah dapat menimbulkan gejala infeksi atau penyakit, dikatakan mempunyai daya virulen yang tinggi, sedangkan mikroba yang menyebabkan gejala penyakit ringan atau yang harus terdapat dalam jumlah tinggi untuk dapat memulai infeksi atau menimbulkan penyakit, dikatakan mempunyai daya virulen rendah. Sifat virulen juga dapat diartikan sebagai

keseluruhan sifat patogenik suatu mikroba yang merupakan perpaduan dari tiga sifat kemampuan mikroba, yaitu :

- (1) daya infeksi atau kemampuannya untuk memulai infeksi didalam tubuh organisme inangnya,
- (2) daya infasif atau kemampuannya untuk menembus ke jaringan-jaringan yang lebih dalam,
- (3) daya patogenik atau kemampuannya untuk merusak sel-sel jaringan tubuh.

Sifat virulen suatu mikroba dipengaruhi oleh berbaagi faktor yang terdiri dari faktor-faktor yang terdapat pada organisme inangnya, dan faktor-faktor yang terdapat pada mikroba tersebut. Faktor-faktor yang terdapat pada organisme inangnya misalnya keadaan substrat tempat dimulainya infeksi, daya tahan tubuh, baik berupa sistem pertahan humoral maupun selular dan adanya komponen reseptor pada tempat dimulainya infeksi. Faktor-faktor pada organisme inang dan mikroba inilah yang menentukan sifat selektif dan spesifik dari mikroba dalam menimbulkan penyakit pada organisme inangnya.

4.4. Eksotoksin dan Endotoksin

Faktor utama yang mempengaruhi sifat virulen suatu mikroba adalah adanya toksin dan eksoenzim yang dihasilkan oleh mikroba tersebut. Toksin mikroba dapat dibedakan atas dua kelompok

- (1) Eksotoksin yaitu toksin yang setelah disintesa didalam sel mikroba kemudian dikeluarkan ke substrat di sekelilingnya, dan
- (2) Endotoksin yang merupakan bagian dari dari dinding sel bakteri gram negatif dan tidak akan dilepaskan keluar sel.

Eksotoksin terdiri dari protein yang biasanya sensitif terhadap panas, terutama pada suhu diatas 80°C, dan juga sensitif terhadap alkohol (50%),

formaldehid, dan asam. Jika mengalami denaturasi ringan, misalnya pada perlakuan dengan formalin, eksotoksin dapat kehilangan daya racunnya, walaupun struktur kimianya tidak berubah. Dalam keadaan ini toksin tersebut masih mempunyai sifat antigenik dan disebut toksoid. Jika disuntikkan ke dalam tubuh hewan, toksoid akan menstimulir pembentukan anti toksin (anti bodi) yang akan mengumpul di dalam serum. Serum yang mengandung anti toksin terhadap toksin tertentu dapat digunakan untuk menetralkan toksin tersebut. Oleh karena itu jika ada orang yang menderita keracunan yang belum terlalu parah, yang disebabkan oleh toksin suatu mikroba tertentu, kemungkinan masih dapat disembuhkan dengan cara menetralkan melalui penyuntikan dengan anti toksin.

Eksotoksin yang dihasilkan oleh bakteri, biasanya bekerja secara spesifik terhadap tenunan-tenunan atau sel-sel tertentu, misalnya sel-sel syaraf, otot, sel-sel pada saluran pencernaan, dan lainnya. Beberapa eksotoksin yang dihasilkan oleh bakteri, misalnya racun botulisme, yang disebut neurotoksin, karena menyerang sel-sel syaraf dan menyebabkan kelumpuhan, racun stafilokoki dan racun perfringens yang disebut enterotoksin, karena menyebabkan diare, racun bongkrek dan sebagainya.

Cara kerja eksotoksin pada umumnya menyerupai enzim, yaitu bersifat sitolitik atau dapat menyebabkan lisis terhadap sel-sel mamalia. Beberapa eksotoksin juga disebut hemolisin, karena dapat menyebabkan lisis pada sel-sel darah merah. Eksotoksin dapat diproduksi, baik oleh bakteri gram positif maupun bakteri gram negatif. Eksotoksin yang diproduksi bakteri gram positif, biasanya dilepas di luar sel selama fase logaritmik. Eksotoksin ini tidak dapat ditemukan di dalam sitoplasma, dan diduga disintesa di dalam ribosoma yang terikat pada membran sel, bukan didalam sitoplasma.

Eksotoksin yang diproduksi oleh bakteri gram negatif, seperti *Escherichia coli* yang bersifat enterotoksigenik (ETEC), *Shigella dysenteriae* dan *Vibrio cholerae*, biasanya tidak langsung dilepaskan ke luar sel, tetapi terkumpul di dalam sel dan baru dilepaskan ke luar sel jika sel mati atau mengalami otolisis.

Endotoksin adalah toksin yang dibentuk di dalam sel bakteri gram negatif, baik yang bersifat patogenik maupun yang non patogenik. Endotoksin merupakan bagian dari lipopolisakarida (LPS) dari dinding sel bakteri gram negatif, dan sering juga disebut sebagai antigen O atau antigen somatik. Endotoksin telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi dari beberapa bakteri gram negatif yang bersifat patogen, misalnya *Salmonella*, *Shigella*, dan *E. coli*. Endotoksin bersifat lebih tahan terhadap panas dibandingkan dengan eksotoksin. Daya racun endotoksin terletak pada bagian lipida dari lipopolisakarida, sedangkan sifat antigeniknya terdapat pada bagian karbohidrat (gula). Daya racun endotoksin lebih lemah dari pada eksotoksin dan biasanya kurang spesifik dalam menyerang sel-sel atau jaringan tubuh dibandingkan dengan eksotoksin. Daya racun endotoksin bersifat emetik, yaitu menyebabkan kenaikan suhu badan atau demam.

4.5. Kelompok Bakteri Yang Penting

Berdasarkan atas sifat-sifat tertentu yang dimiliki, bakteri dapat diklasifikasikan menjadi jenis (*species*), golongan (*genus*), suku (*tribe*), keluarga (*family*), dan kelas (*order*). Untuk hampir semua keperluan dalam mikrobiologi pangan, golongan (*genus*) dan jenis (*species*) (contohnya *Escherichia coli*) adalah tingkat klasifikasi yang umumnya digunakan. Buku pedoman dari bergey (Buchanan dan Gibon 1974) menguraikan secara lengkap

skema klasifikasi bakteri. Beberapa sifat dasar dari kelompok dan spesies bakteri penting dalam mikrobiologi pangan diuraikan di bawah ini.

Pseudomonadaceae

Genus utama dan famili bakteri ini yang berhubungan dengan bahan pangan adalah *Pseudomonas*. Mikroorganisme ini adalah bakteri gram negatif berbentuk batang kecil, dapat bergerak, umumnya berflagella polar tunggal dan mempunyai tipe metabolisme yang bersifat oksidatif. Bakteri ini merupakan penyebab berbagai jenis kerusakan bahan pangan yang sebagian besar berhubungan dengan kemampuan spesies ini dalam memproduksi enzim yang dapat memecah, baik komponen lemak maupun protein dari bahan pangan. Banyak organisme *Pseudomonas* yang dapat berkembang dengan cepat pada suhu lemari es/kulkas dan sering terbentuknya lendir dan pigmen pada permukaan daging yang didinginkan. *Pseudomonas fluorescens* menghasilkan pigmen kehijauan dan beberapa spesies seperti *Pseudomonas nigrificans* membentuk pigmen hitam pada makanan yang mengandung protein.

Bacillaceae

Dalam famili ini ada dua genus penting yang berhubungan dengan bahan pangan yaitu *Bacillus* dan *Clostridium*. Mikroorganisme ini penting dalam mikrobiologi pangan terutama kemampuannya dalam membentuk endospora. Sel-selnya berbentuk batang dan umumnya cukup besar, merupakan gram positif dan sering bergerak dengan flagella peritrichous. Kedua jenis ini dibedakan oleh metabolisme oksigen, *Clostridium* bersifat anaerobik (katalase negatif) dan *Bacillus* bersifat aerobik dan fakultatif anaerobik (katalase positif). Kedua genus mikroorganisme ini tersebar luas dalam air dan tanah serta mencemari banyak jenis bahan pangan. Kegiatan perusakan kedua jenis bakteri ini terutama berhubungan dengan bahan pangan yang diolah dengan

pemanasan, dimana endosporanya tahan terhadap pemanasan. Anggota genus ini menghasilkan berbagai enzim perusak karbohidrat, lemak dan protein. *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans* dan *Bacillus stearothermophilus* dikenal sebagai penyebab keasaman dari makanan kaleng, karena fermentasi gula yang dikandung pada bahan pangan tersebut. *Clostridium putrefaciens* dan *Clostridium sporogenes* dikenal karena sifatnya yang proteolitik anaerobik (pembusukan) pada daging dan sayuran, terutama produk dalam kaleng. *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* dan *Clostridium Botulinum* adalah penyebab keracunan makanan pada manusia.

Sejak tahun 1950, bakteri *Bacillus cereus*, banyak dilaporkan sebagai penyebab letusan keracunan makanan, terutama di Eropah. Sedangkan di Indonesia keracunan makanan oleh bakteri ini jarang dilaporkan. Hal ini kemungkinan, keracunan tersebut dengan gejala yang ringan dan pada umumnya tidak fatal.

Enterobacteriaceae

Golongan bakteri ini merupakan sekelompok besar dari bakteri gram negatif, tidak berspora, berbentuk batang kecil. Beberapa bakteri dari kelompok ini tidak dapat bergerak, sedang lainnya dapat bergerak baik dengan flagella polar atau peritrichous. Secara keseluruhan kelompok ini mempunyai sifat khas, yaitu mampu tumbuh secara aerobik maupun anaerobik (anaerobik fakultatif). Pada beraneka ragam karbohidrat. Anggota dari genus *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, dan *Erwinia* umumnya dapat diisolir dari tanah dan air, karenanya sering mencemari bahan pangan segar. Spesies *Erwinia* menyebabkan busuk lunak (*soft rots*) dan nekrosis dari sayuran dan buah-buahan karena produksi enzim pemecah polisakarida. Spesies *Serratia*, membentuk pigmen kemerah-merahan di permukaan beberapa bahan pangan.

Spesies *Proteus* (*Proteus vulgaris*) telah diidentifikasi dalam kerusakan telur dan daging, juga sering menyebabkan pembusukan protein bahan pangan. Beberapa genus *Enterobacteriaceae* penting bagi kesehatan masyarakat, karena menimbulkan wabah keracunan pangan dan penyakit infeksi yang ditularkan melalui makanan yang cukup serius. Organisme seperti ini yang umumnya terdapat dalam alat pencernaan ternak termasuk spesies *Salmonella* dan *Shigella*, *Escherichia coli* dan *Yersinia enterocolitica*.

Lactobacillaceae dan *Streptococcaceae*

Spesies dari bakteri ini umumnya memfermentasi gula heksosa, menghasilkan asam laktat. Seringkali bakteri ini berperan dalam produksi bahan pangan terfermentasi. Anggota dari genus *Lactobacillus* tidak dapat bergerak, gram positif berbentuk batang yang dapat dijumpai secara tunggal, berpasangan atau berbentuk rantai.

Spesies *Streptococcus* adalah bakteri gram positif yang tidak membentuk spora. Bakteri ini tidak dapat bergerak, berbentuk bulat yang dapat dijumpai secara tunggal, berpasangan atau berbentuk rantai. Spesies dari kedua kelompok ini memilih keadaan kadar oksigen yang rendah untuk pertumbuhan (katalase negatif) dan sangat tahan terhadap asam dibandingkan dengan spesies bakteri lain. Baik *Lactobacillus* maupun *Streptococcus* berperan sangat nyata dalam produksi susu dan sayur-sayuran terfermentasi, seperti keju, yogurt, sauerkraut, asinan (pikel) dan ikan. Beberapa spesies *Lactobacillus* dapat mengakibatkan kerusakan dari minuman beralkohol seperti bir dan anggur. Beberapa spesies bakteri ini yang penting antara lain *Lactobacillus bulgaricus*, *L. acidophilus*, *Streptococcus lactis* dan *Streptococcus cremoris*

Micrococcaceae

Spesies dari famili ini adalah gram positif tidak berspora, bersifat katalase positif yang dapat tersusun secara tunggal, berpasangan, tetrad atau kelompok kecil. Dua genus yang penting dalam bahan pangan adalah *Micrococcus* dan *Staphylococcus*. *Micrococcus* ini tersebar luas di alam bergabung dengan tanah, permukaan air, tanaman dan hewan. Walaupun bakteri ini merupakan pencemar bahan pangan segar, tetapi jarang merupakan penyebab utama kerusakan, sebagian besar disebabkan karena ketidakmampuan bersaing dengan jenis bakteri yang lebih cepat tumbuh seperti kelompok *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae* dan *Bacillaceae*. Tetapi jenis bakteri ini sedikit lebih tahan terhadap tekanan lingkungan seperti suhu, garam dan kekeringan. Jika dibandingkan dengan jenis bakteri lain dan oleh karena itu masih dapat hidup setelah pengolahan dan berperan nyata dalam kerusakan beberapa makanan olahan, seperti susu yang telah dipasteurisasi, daging, sayur asin. Spesies yang sering dijumpai adalah *Micrococcus varians*, *Micrococcus flavus* dan *Micrococcus roseus*. Dari kelompok *Staphylococci*, yang terpenting dalam makanan adalah *Staphylococcus aureus*.

Pada waktu pertumbuhan, organisme ini mampu memproduksi suatu enterotoksin yang cukup berbahaya yang menyebabkan terjadinya peristiwa keracunan makanan. Toksin ini dapat menyebabkan gastroenteritis atau inflamasi pada saluran pencernaan. Keracunan stafilokokus merupakan gejala intoksikasi yang paling banyak dilaporkan di Amerika Serikat.

Salmonella

Bakteri *Salmonella* adalah suatu genus yang termasuk ke dalam famili *Enterobacteriaceae* bersifat gram negatif, berbentuk batang, tidak membentuk spora, hidup secara aerobik dan anaerobik fakultatif, non motil. Bakteri dari

genus *Salmonella* merupakan bakteri penyebab infeksi, jika tertelan akan menimbulkan gejala yang disebut salmonellosis, dimana gejala yang paling sering terjadi adalah gastroenteritis. Beberapa spesies *Salmonella* juga dapat menimbulkan gejala yang di golongan dalam demam enterik seperti demam tifoid dan demam paratifoid, serta infeksi lokal.

Di Indonesia, letusan yang disebabkan oleh *Salmonella* belum banyak dilaporkan secara resmi, tetapi di negara-negara yang sudah maju, seperti Amerika Serikat telah banyak dilaporkan

Escherichia coli

Escherichia coli termasuk ke dalam group *Enterobacteriaceae*, adalah bakteri gram negatif, berbentuk batang. Bakteri ini pada umumnya merupakan flora yang secara normal terdapat dalam saluran pencernaan manusia dan hewan. Oleh karena itu dengan mudah mengkontaminasi daging, selama proses pemotongan hewan tersebut atau mengkontaminasi susu selama pemerasan. *E. coli* dapat memproduksi indol dan skatol yang menimbulkan bau tidak enak/busuk. Bakteri ini juga sering mengkontaminasi air, oleh karena itu *Escherichia coli* yang ada dalam makanan, biasanya berasal dari air yang digunakan. Makanan yang sering terkontaminasi bakteri ini, antara lain daging ayam, daging sapi, daging babi, telur, sayuran, ikan dan pangan laut lainnya.

Peralatan yang digunakan dalam industri pengolahan pangan, sering terkontaminasi *E. coli*, yaitu berasal dari air yang digunakan untuk mencuci peralatan tersebut. Kontaminasi *E. coli* pada makanan atau peralatan pengolahan, menunjukkan suatu indikasi praktek sanitasi yang kurang baik.

Cara pencegahan kontaminasi *E. coli* sama dengan yang dilakukan terhadap *Salmonella* dan *Shigella*, karena *E. coli* merupakan bakteri yang sensitif terhadap panas dan dapat diinaktifkan pada suhu pasteurisasi dan

pemanasan Untuk mencegah pertumbuhan bakteri ini, sebaiknya makanan disimpan pada suhu rendah.

Vibrio cholerae

Bakteri ini kadang-kadang disebut juga *Vibrio comma*, serogrup 01, merupakan bakteri penyebab terjadinya kolera epidemik. *Vibrio* adalah bakteri gram positif yang tidak dapat membentuk spora, dapat bergerak atau bersifat motil, dengan menggunakan flagellum polar tunggal, berbentuk batang yang melengkung atau lurus. Bakteri ini berukuran panjang 1 – 3 mikron dan lebar 0,4 – 0,6 mikron, terdapat dalam kelompok berbentuk huruf S atau spiral, atau tunggal. Beberapa spesies mempunyai dua atau lebih flagella polar pada salah satu selnya.

Bakteri kolera, kemungkinan terdapat di air, ikan dan pangan laut lainnya yang masih mentah, buah-buahan, sayuran, dan dapat disebarkan oleh lalat. Penularan secara langsung dari satu penderita ke penderita lainnya, jarang terjadi, tanpa melalui air atau makanan. Penyebaran bakteri kolera distimulir oleh keadaan udara yang panas, cuaca relatif lembab dan populasi penduduk yang padat.

Penyakit ini biasanya timbul di daerah yang fasilitas sanitasi dan kebersihan yang tidak baik. *V. cholerae* tidak dapat berkembang biak pada suhu di bawah 15°C, sehingga letusan kolera biasanya terjadi di daerah-daerah beriklim tropis.

Vibrio parahaemolyticus

Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* adalah suatu bakteri gram negatif yang bersifat anaerobik fakultatif, berbentuk batang pendek, lurus atau agak

melengkung dengan ujung bulat, kadang-kadang dapat membentuk rantai, dan membentuk flagelum polar tunggal jika tumbuh pada media cair.

Bakteri ini merupakan penyebab terjadinya letusan keracunan makanan yang terjadi di Jepang pada tahun 1950. Makanan penyebabnya adalah makanan yang disebut "shirazu", yaitu suatu makanan kering yang terbuat dari ikan sardin. Selain di Jepang, sejak tahun 1971, bakteri ini juga ditemukan pada berbagai produk pangan laut di berbagai negara seperti Australia, India, Thailand, Malaysia, Filipina, Meksiko, Inggris dan Amerika Serikat.

Di Indonesia, keracunan makanan yang disebabkan oleh kontaminasi *V. parahaemolyticus* dapat dikatakan tidak ada. Hal ini disebabkan makanan yang berasal dari pangan laut pada umumnya di Indonesia dikonsumsi setelah dimasak sampai matang. Sedangkan di Jepang, banyak makanan dari pangan laut dikonsumsi dalam keadaan mentah. Oleh karena itu produk pangan laut yang akan diekspor dari Indonesia harus bebas dari bakteri *V. parahaemolyticus*.

Listeria

Bakteri *Listeria*, terutama *L. monocytogenes* adalah suatu bakteri yang dapat menyebabkan gejala infeksi pada manusia dan berbagai hewan, seperti ayam, kelinci, kambing, sapi, kuda dan lainnya. Bakteri ini merupakan bakteri gram positif, berbentuk batang agak bulat, kecil, dan motil dengan flagela peritrikhus. Bakteri ini memproduksi beta-hemolisis pada agar darah, dan sangat sukar diisolasi. Bakteri ini dapat tumbuh pada suhu 4 – 6 °C. Bakteri ini merupakan bakteri yang tahan panas, dan tidak akan mati pada pemanasan 80 °C selama 5 menit atau pada suhu 100 °C selama 15 detik.

Infeksi oleh bakteri ini dapat ditularkan dari hewan ke manusia, baik secara langsung atau melalui konsumsi daging hewan yang terkena infeksi. Pada

manusia gejala infeksi yang umum adalah meningitis pada bayi dan gejala-gejala lainnya, meliputi septikemia, keguguran, abses lokal eksternal atau internal, endokarditis, konjungtivitis, gejala seperti demam dan faringitis.

4.6. Mikotoksin

Seperti halnya bakteri, fungi juga dapat menyebabkan penyakit yang dibedakan atas dua golongan, yaitu :

- (1) infeksi kapang yang disebut juga mikosis,
- (3) mikotoksikosis atau intoksikasi yang disebabkan oleh tertelannya suatu hasil metabolisme yang beracun dari kapang atau jamur.

Tetapi dari kedua golongan ini, hanya mikotoksikosis yang mungkin disebarkan melalui makanan, sedangkan mikosis yang merupakan infeksi yang biasanya menyerang kulit (epidermes), rambut dan kuku, tidak disebarkan melalui makanan, tetapi dapat disebarkan melalui sentuhan, pakaian, angin dan lainnya.

Komponen beracun yang diproduksi oleh kapang maupun jamur disebut mikotoksin. Toksin ini dapat menyebabkan penyakit yang kadang-kadang fatal, dan beberapa diantaranya mempunyai sifat karsinogenik. Beberapa fungi juga memproduksi komponen yang bersifat halusinogenik, misalnya asam lisergat. Beberapa mikotoksin yang diproduksi oleh fungi yang sering mencemari makanan, antara lain, yaitu :

- (1) Alfatoksin oleh *Aspergillus flavus* dan *A. parasiticus*, dalam makanan kacang-kacangan, jagung dan serelia,
- (2) Islanditoksin oleh *Penicillium islandicum*, dalam beras,
- (3) Asam penisilat oleh *Aspergillus ochraceus* dan *A. melleus* dalam keju Swiss
- (4) Sterigmatosistin oleh *A. vericolor*, dalam susu, gandum dan kopi.

(5) Sterigmatosistin oleh *A. flavus*, dalam keju.

Berbeda dengan toksin yang diproduksi oleh bakteri, mikotoksin pada umumnya tidak menyebabkan penyakit yang bersifat akut, tetapi timbulnya penyakit biasanya disebabkan oleh konsumsi mikotoksin dalam jumlah kecil, secara berulang-ulang dan dalam jangka waktu yang lama. Hanya beberapa mikotoksin yang mungkin dapat menyebabkan penyakit yang bersifat akut, diantaranya toksin yang diproduksi oleh jamur *Amanita sp.*

Kapang yang digunakan dalam fermentasi makanan, misalnya dalam pembuatan tempe, oncom, keju dan lainnya, merupakan kapang yang selama ini dianggap tidak berbahaya. Akan tetapi, cara pengolahan atau fermentasi yang salah, dapat mengakibatkan kontaminasi oleh kapang yang tidak diinginkan, yang kadang-kadang dapat memproduksi mikotoksin. Kontaminasi oleh kapang yang tidak diinginkan ini perlu mendapat perhatian khusus, karena banyak kapang yang dapat tumbuh pada keadaan dimana bakteri tidak dapat tumbuh, misalnya pada keadaan kering atau pada makanan dengan pH kurang dari 5,5.

Makanan yang telah ditumbuhi oleh kapang yang tidak diinginkan pada permukaannya, menandakan bahwa makanan tersebut sebenarnya tidak aman untuk dikonsumsi. Jika kapang yang tumbuh pada permukaan makanan tersebut dibuang, misalnya pada kacang tanah, tauco, dendeng, keju dan sosis yang ditumbuhi kapang, kemudian dicuci untuk menghilangkan kapang pada permukaannya, maka dari segi kenampakan cara ini dapat memperbaiki mutu makanan tersebut, tetapi kemungkinan bahaya yang ditimbulkannya tidak akan berkurang. Hal ini disebabkan toksin yang mungkin diproduksi oleh kapang tersebut dapat menyerap ke bagian dalam makanan. Mikotoksin pada umumnya tahan terhadap panas, sehingga pengolahan atau pemasakan juga tidak dapat menjamin hilangnya atau berkurangnya keaktifan dari toksin tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Buckle, K.A., R.A. Edward, G.H. Fleet and M. Wooton. 1985. Ilmu Pangan (Hary Purnomo dan Adiono, Penerjemah). UI Press, Jakarta.
- Iljas, S. 1976. Fish Processing Technology. Direktorat Jenderal Perikanan. Jakarta.
- Jenie, B.S.L. 1998. Sanitasi Dalam Industri Pangan. PAU IPB, Bogor.
- Jenie, B.S.L. 1999. Sanitasi dan Higiene pada Pengolahan Pangan. Di dalam Kumpulan Materi Pelatihan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Pangan, Bagi staf Pengajar. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. DEPDIKBUD, Jakarta.
- Nasran, S. 1976. Handling Bahan Mentah. Direktorat Jenderal Perikanan. Jakarta.
- Pelczar, J.M. E.C.S. Chan and M.F. Pelczar 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi (Ratna, S.H., Teja Imas, Sutarna, T. dan Sri Lestari, A., Penerjemah). UI - Press, Jakarta.
- Srikandi, Fardiaz. 1983. Keamanan Pangan, Jilid I, Bakteriologi. Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan. IPB, Bogor.
- Srikandi, Fardiaz. 1989. Mikrobiologi Pangan. PAU Pangan dan Gizi, IPB, Bogor.

LAMPIRAN 1

Tabel MPN - Seri 15 tabung

Jumlah tabung positif			MPN/100 ml
5 a 10 ml	5 a 1.0 ml	5 a 0.1 ml	
0	0	0	<2
0	0	1	2
0	1	0	2
1	0	0	2
1	0	1	4
1	1	0	4
1	2	0	6
2	0	0	4
2	0	1	7
2	1	0	7
2	1	1	9
2	2	0	9
3	0	0	8
3	0	1	11
3	1	0	11
3	1	1	14
3	2	0	14
3	2	1	17
3	3	0	17
4	0	0	13
4	0	1	17
4	1	0	17
4	1	1	21
4	2	0	22
4	2	1	26
4	3	0	27
4	3	1	33
4	4	0	34
5	0	0	23
5	0	1	31
5	1	0	33
5	1	1	46
5	1	2	63
5	2	0	49
5	2	1	70
5	2	2	94

Catatan: Nilai MPN/100 ml dapat dibagi 100 untuk memperoleh nilai MPN/ml.

SAC

Lampiran 1

**Tabel MPN - Seri 15 tabung
(Lanjutan)**

Jumlah tabung positif			MPN/100 ml
5 a 10 ml	5 a 1.0 ml	5 a 0.1 ml	
5	3	0	79
5	3	1	110
5	3	2	140
5	4	0	130
5	4	1	170
5	4	2	220
5	4	3	280
5	4	4	350
5	5	0	240
5	5	1	350
5	5	2	540
5	5	3	920
5	5	4	1600
5	5	5	<1600

Catatan: Nilai MPN/100 ml dapat dibagi 100 untuk memperoleh nilai MPN/ml.

LAMPIRAN 2

Tabel MPN - Seri 9 tabung

Jumlah tabung positif			MPN*
Seri A	Seri B	Seri C	
0	0	0	<0.03
0	0	1	0.03
0	0	2	0.06
0	0	3	0.09
0	1	0	0.03
0	1	1	0.061
0	1	2	0.092
0	1	3	0.12
0	2	0	0.062
0	2	1	0.093
0	2	2	0.12
0	2	3	0.16
0	3	0	0.094
0	3	1	0.13
0	3	2	0.16
0	3	3	0.19
1	0	0	0.036
1	0	1	0.072
1	0	2	0.11
1	0	3	0.15
1	1	0	0.073
1	1	1	0.11
1	1	2	0.15
1	1	3	0.19
1	2	0	0.11
1	2	1	0.15
1	2	2	0.20
1	2	3	0.24
1	3	0	0.16
1	3	1	0.20
1	3	2	0.24
1	3	3	0.29
2	0	0	0.091
2	0	1	0.14
2	0	2	0.20
2	0	3	0.26

* Nilai MPN dikalikan dengan 1/pengenceran dari nilai yang di tengah.

LAMPIRAN 3

Tabel MPN - Seri 7 tabung

Jumlah tabung positif			MPN/100 ml
5 a 10 ml	1 a 1.0 ml	1 a 0.1 ml	
5	1	1	< 240
5	1	0	240
5	0	1	96
5	0	0	38
5	—	—	16
4	1	0	21
4	0	1	20
4	0	0	15
4	—	—	16
3	1	0	12
3	0	0	8.8
3	—	—	9.2
2	1	0	7.6
2	0	0	5.0
2	—	—	5.1
1	1	0	4.4
1	0	0	2.2
1	—	—	2.2
0	1	0	2.0
0	0	0	2.0
0	—	—	2.2