

**PROTOKOL UJI SENSORIK DAN PEMERIKSAAN LABORATORIUM
UNTUK MELACAK TEH HIJAU DAN THE HITAM YANG
MENGANDUNG AMPAS TEH**

Disusun oleh

**Eko Sugeng pribadi
Iriana Ekasari
Dadan Rohdiana**

untuk

**Direktorat Cegah Tangkal
Badan Pengawasan Obat dan Makanan**

JAKARTA

2026

PRAKATA

Ada dua peraturan perundangan-undangan yang berlaku terkait dengan perlindungan terhadap kepentingan konsumen dan makanan/minuman yang tidak membahayakan konsumen, yakni Undang-Undang Nomor 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen (UUPK) dan Undang-Undang Nomor 18 Tahun 2012 tentang Pangan (UU Pangan). Undang-Undang Nomor 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen (UUPK) telah (i) mengatur hak konsumen atas keamanan dan informasi yang benar serta jujur mengenai barang/jasa, mewajibkan pencantuman informasi komposisi dan keterangan produk pada label, dan melarang peredaran barang yang tidak sesuai standar atau yang rusak/tercemar.

Sedangkan Undang-Undang Nomor 18 Tahun 2012 tentang pencegahan cemaran yang membahayakan kesehatan manusia, kewajiban setiap pelaku rantai pasok pangan memenuhi persyaratan sanitasi dan keamanan, penggunaan bahan tambahan pangan yang wajib dibatasi agar tidak melampaui batas aman, dan kewajiban memenuhi baku keamanan dan mutu yang ditetapkan pemerintah terhadap pangan yang diperdagangkan.

teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh diduga telah digunakan oleh pelaku industri pembuat teh kering kemasan dan teh kemasan siap minum. teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh tidak memiliki lagi rasa daun teh dan menggunakan pewarna untuk menampilkan seolah berasal dari daun teh segar. Oleh karena itu, **Protokol Uji Sensorik dan Pemeriksaan Laboratorium untuk Melacak teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh** dibuat untuk menjadi acuan pemeriksaan laboratorium terhadap contoh-contoh yang diduga teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh.

Protokol ini tetap akan mengalami perubahan yang menyesuaikan kebutuhan.

Jakarta,

Direktorat Cegah Tangkal
Badan Pengawasan Obat dan Makanan

DAFTAR ISI

1. Latar belakang	1
2. Ruang Lingkup	1
3. Acuan Normatif	1
4. Istilah dan Definisi	2
5. Ampas teh (teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh)	4
6. Pemeriksaan terhadap contoh terduga ampas teh, atau teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh	5
6.1 Uji organoleptik	6
6.2 Pemeriksaan fisik	7
6.3 Pemeriksaan kimiawi	12
6.3.1 Pemeriksaan melacak kadar unsur polifenol	12
6.3.2 Pemeriksaan melacak kadar air	18
6.3.3 Pemeriksaan melacak kadar ekstrak dalam air	21
6.4 Pemeriksaan mikrobiologik	23
6.4.1 Angka lempeng total bakteri	24
6.4.2 Angka lempeng total bakteri bentuk koli (<i>coliform</i>)	26
6.4.3 Mengisolasi dan mengenali <i>Bacillus megaterium</i>	28
6.4.4 Menghitung cawan total <i>Enterobacter</i>	30
6.4.5 Penghitungan khamir-kapang total (<i>total yeast-mold count</i> , TYMC)	33
6.4.6 Penghitungan kapang <i>Aspergillus fumigatus</i> total	35
6.4.7 Penghitungan total khamir <i>Candida</i>	37
7. Bibliografi	40

DAFTAR TABEL

1. Uraian kriteria penilaian pemeriksaan organoleptik	9
2. Rangkuman kriteria penilaian uji organoleptik	10
3. Parameter pemeriksaan fisik terhadap penampakan teh kering, air seduhan dan ampas	12
4. Struktur data hasil pemeriksaan fisik teh hijau, teh hitam, dan teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh	13

5. Hasil pemeriksaan polifenol terhadap teh hijau, teh hitam, dan teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh	17
6. Hasil pemeriksaan kadar air dan ekstrak dalam air terhadap teh hijau, teh hitam, dan teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh	20
7. Hasil pemeriksaan mikrobiologik dari teh hijau, hitam, dan teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh	40

DAFTAR LAMPIRAN

1. Borang biodata panelis dalam pelaksanaan uji organoleptik	43
--	----

1. Latar Belakang

Organisasi Internasional untuk Standardisasi (*International Organization for Standardization*, ISO) mendefinisikan teh merupakan minuman aromatik yang disiapkan dari daun, kuncup, dan pucuk muda yang telah diproses dari spesies tanaman *Camellia sinensis*. Jadi, jelas bahwa minuman yang dibuat dari tumbuhan, herba, atau buah lain (seperti kamomil, pepermin, dan lainnya) tidak dapat disebut sebagai teh, tetapi infusi herba/buah. ISO 20715:2023 *Tea — Classification of tea types* menggolongkan teh menjadi teh hijau (*green tea*), teh putih (*white tea*), teh oolong (*oolong tea*), teh hitam (*black tea*), teh kuning (*yellow tea*), dan *dark tea (pu-erh)*. Sedangkan di Indonesia, SNI 1902:2016 - *Teh hitam* menjelaskan acuan mutu baku untuk teh hitam, dan SNI 3945:2016 - *Teh hijau* menjelaskan acuan mutu baku untuk teh hijau.

Saat ini sedang ramai dibicarakan mengenai penggunaan ampas teh, sering juga disebut pastol, dalam produk teh kering. Sesungguhnya, ampas teh merupakan produk samping (*by product*), malah ada beberapa yang menganggapnya sebagai limbah teh. Ampas teh seharusnya dibuang, atau dikeringkan kembali dan dimanfaatkan untuk keperluan lain. Tetapi, tidak sebagai produk teh kering karena polifenol yang terkandung di dalamnya sudah jauh berkurang. Saat ini ampas teh kering masih dicampur lagi dengan teh hijau kering dan cara ini dianggap mengabaikan hak konsumen mendapatkan seduhan teh hijau yang bermutu.

2. Ruang Lingkup

Ruang lingkup Protokol ini adalah menyediakan tata kerja pemeriksaan organoleptik, fisik, kimiawi, dan mikrobiologik untuk melacak keberadaan ampas teh (pastol).

3. Acuan Normatif

ISO 1573, *Tea — Determination of loss in mass at 103 °C*

ISO 1575, *Tea — Determination of total ash*

ISO 1576, *Tea — Determination of water-soluble ash and water-insoluble ash*

ISO 1577, *Tea — Determination of acid-insoluble ash*

ISO 1578, *Tea — Determination of alkalinity of water-soluble ash*

ISO 1839, *Tea — Sampling*

ISO 21528-2:2017 *Microbiology of the food chain - Horizontal method of the detection and enumeration of Enterobacteriaceae*

ISO 3103 - *Tea — Preparation of liquor for use in sensory tests (Teh — Penyiapan seduhan untuk digunakan dalam uji sensorik)*

ISO 5498, *Agricultural food products — Determination of crude fibre content — General method*

ISO 9768, *Tea — Determination of water extract*

ISO 14502-1, *Determination of substances characteristic of green and black tea — Part 1: Content of total Polyphenols in tea — Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent*

ISO 15598, *Tea — Determination of crude fibre content*

SNI 0428, Petunjuk pengambilan contoh padatan

SNI 1902:2016 - *Teh hitam*

SNI 3945:2016, *Teh hijau*

SNI ISO 4831, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metode horizontal untuk deteksi dan enumerasi koliform – Teknik Angka Paling Mungkin (APM)*

SNI ISO 4833-1, *Mikrobiologi rantai pangan - Metode horizontal untuk enumerasi mikroorganisme - Bagian 1: Penghitungan koloni pada suhu 30 °C dengan teknik cawan tuang (ISO 4833-1:2013, IDT)*

SNI ISO 4833- 2, *Mikrobiologi rantai pangan - Metode horizontal untuk enumerasi mikroorganisme - Bagian 2: Penghitungan koloni pada suhu 30 °C dengan teknik cawan sebar (ISO 4833-2:2013 dan Cor 1:2014, IDT)*

SNI ISO 21527-2, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metode horizontal untuk enumerasi kapang dan khamir – Bagian 2: Teknik penghitungan koloni pada produk dengan aktivitas air kurang dari atau sama dengan 0,95*

SNI 7313, Batas Maksimum Residu Pestisida pada Hasil Pertanian

SNI 2896, Cara uji cemaran logam dalam makanan

SNI 0428, Petunjuk pengambilan contoh padatan

SNI 4866, Cara uji cemaran Arsen dalam makanan

CAC/GL 50-2004 General Guideline on Sampling

Pedoman pengujian residu pestisida dalam hasil pertanian, 2006, Direktorat Jenderal Tanaman Pangan, Departemen Pertanian

4. Istilah dan Definisi

Untuk tujuan penggunaan Protokol ini, istilah dan definisi berikut ini berlaku

4.1

ampas teh, pastol

adalah sisa daun, atau serbuk teh yang tertinggal setelah diseduh dalam proses pembuatan minuman teh siap minum (*ready to drink*) dalam skala industri yang dikelompokkan sebagai limbah industri

4.2

pemeriksaan organoleptik

penilaian sensorik menggunakan indera manusia—penglihatan, penciuman, pengecap, dan sentuhan—untuk menilai mutu, profil rasa, dan penerimaan keseluruhan dari daun teh dan teh yang diseduh

4.3

polifenol

polifenol senyawa kimia yang terdapat di dalam daun teh yang membentuk 30% hingga 40% dari berat kering daun teh segar dan bertanggung jawab atas warna, aroma, rasa pahit, dan rasa sepat (sensasi kering dan kencang di mulut) pada teh. Jenis polifenol yang utama adalah epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG). catechin ©, galocatechin (GC).

4.4

aseptik

serangkaian tindakan dan tata kerja laboratorium spesifik yang digunakan untuk mencegah pencemaran bahan suci hama, media pertumbuhan, dan biakan murni oleh jasad renik yang tidak diinginkan dari lingkungan, peralatan, atau orang pelaksana

4.5

koloni, *colony forming unit* (CFU)

satuan mikrobiologik yang digunakan untuk memperkirakan jumlah bakteri, khamir, atau kapng hidup (*viable*) dalam contoh yang dapat berkembangbiak dan membentuk koloni yang terlihat

4.6

stomaker, *stomacher*

atau disebut juga penghancur laboratorium adalah peralatan laboratorium yang digunakan untuk menghomogenkan contoh padat—seperti makanan, jaringan, atau contoh lingkungan—di dalam kantong plastik suci hama sehingga jasad renik dapat dilepaskan ke suspensi cair untuk dianalisis

4.7

pewarnaan Gram

adalah teknik laboratorium cepat yang digunakan untuk mengelompokkan dan membedakan spesies bakteri menjadi dua kelompok utama—Gram-positif dan Gram-negatif—berdasarkan sifat struktural dinding selnya

4.8

biakan subkultur

adalah proses memindahkan jasad renik hidup; seperti bakteri, khamir, atau kapang; dari biakan yang sudah ada ke media pertumbuhan baru, dan dapat dilakukan antara media padat dan cair (misalnya, dari cawan petri ke media miring, dari kaldu ke cawan petri, atau dari media miring ke media miring)

4.9

NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

adalah program bioinformatika yang andal dan tersedia untuk umum yang disediakan oleh National Center for Biotechnology Information (NCBI) yang berfungsi untuk sekuens biologik dalam membandingkan sekuens DNA, RNA, atau protein yang tidak dikenal dengan basis data besar sekuens yang dikenal untuk menemukan pengenalan yang cocok, atau sangat mirip.

4.10

media selektif

merupakan media biakan khusus yang mendorong pertumbuhan jasad renik sasaran tertentu sambil secara aktif menekan, atau membunuh jasad renik lain yang tidak diinginkan dengan menambahkan agen penghambat tertentu, seperti antibiotika, pewarna (seperti kristal violet atau metilen biru), kadar garam tinggi, garam empedu, atau penyesuaian tingkat pH

5. Ampas teh (teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh)

Ampas teh adalah sisa daun, atau serbuk teh yang tertinggal setelah proses penyeduhan. Meski sering dianggap sebagai limbah rumah tangga, atau industri, ampas ini masih menyimpan berbagai nutrisi dan senyawa aktif. Kandungan utama yang masih dikandung oleh ampas teh diantaranya polifenol, katekin, epigallo katekin galat (EGCG), vitamin C, vitamin E, vitamin K, nitrogen, fosfor, kalium, magnesium, dan tanin.

Ampas teh oleh pihak pabrik akan disingkirkan dari pabrik sebagai limbah dan menggunakan pihak ketiga untuk mengangkutnya dari pabrik. Akan tetapi, ada pihak-pihak yang tidak bertanggung-jawab yang memanfaatkan ampas teh yang diambil dari pabrik. Ampas teh tersebut akan dikeringkan lagi dan dicampur dengan teh hijau dan teh hitam yang dibeli dari kebun, atau pedagang sebagai upaya untuk melengkapi volume daun teh yang akan dijual kembali ke pabrik RTD. Tindakan ini tentu saja akan mengganggu tata niaga pucuk teh dari kebun. Dampak lainnya adalah ampas teh tidak memberikan manfaat kesehatan kepada konsumen peminum teh.

Ditinjau dari aspek keamanan, penggunaan ampas teh sebagai bahan campuran teh konsumsi dinilai berisiko tinggi bagi konsumen dan cenderung melanggar baku sanitasi. Meskipun ampas teh industri diekstrak dalam kondisi bersih pada awalnya, statusnya telah berubah menjadi **limbah organik basah**. Proses pengumpulan, penyimpanan, hingga pengeringan kembali yang tidak terpantau ketat di luar jalur produksi resmi memicu tiga potensi bahaya utama, diantaranya

- 1) bahaya hayati oleh jasad renik bakteri, khamir (*yeast*), dan kapang (*mold*). Ampas teh memiliki kadar air yang sangat tinggi. Jika tidak langsung dikeringkan dengan mesin baku industri, misalnya dibiarkan menumpuk atau dijemur manual di ruang terbuka, ampas tersebut menjadi media yang sangat disukai oleh bakteri, khamir, dan kapang. Konsumsi produk yang tercemar dapat memicu masalah pencernaan seperti diare, mual, hingga keracunan makanan;
- 2) bahaya fisik dan kimiawi karena risiko cemaran zat asing. Karena dianggap limbah pabrik, penanganan teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh sering kali tidak menerapkan prinsip *good manufacturing practices* (GMP). Ampas teh rawan terpapar debu, kotoran, atau bahkan zat kimia dari lingkungan sekitar tempat penampungan limbah;
- 3) penurunan mutu dan gizi. Ampas teh yang sudah melewati proses ekstraksi industri, biasanya menggunakan teknik pemanasan suhu tinggi seperti UHT, sudah kehilangan mayoritas senyawa esensialnya. Menyeduh kembali ampas teh ini berarti konsumen mendapatkan minuman yang kandungan antioksidan sudah jauh berkurang, kehilangan aroma alami, serta rentan mengalami perubahan rasa menjadi sangat sepat atau asam.

Ditinjau dari peraturan perundang-undangan yang berlaku di Indonesia, Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) mewajibkan setiap produk pangan komersial wajib dihasilkan dari bahan baku segar (*virgin raw materials*) yang memenuhi baku mutu nasional. Menggunakan limbah sisa produksi sebagai bahan pangan tanpa izin terdaftar resmi dan pengujian laboratorium yang sah dikategorikan sebagai tindakan ilegal karena membahayakan kesehatan publik.

6. Pemeriksaan terhadap contoh terduga ampas teh, atau teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh

Beberapa pemeriksaan laboratorik harus dilakukan untuk menegaskan dugaan adanya ampas teh, atau teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh. Beberapa pemeriksaan laboratorik diantaranya uji organoleptik, fisik, kimiawi, dan mikrobiologik.

6.1 Uji organoleptik

Pemeriksaan organoleptik mengacu pada pedoman penyeduhan internasional seperti yang disetarakan dalam ISO 3103.

6.1.1 Pengambilan contoh

6.1.1.1 Peralatan dan persiapan

- 1) Sekop, sendok, atau alat pelubang yang bersih dan kering;
- 2) Gunakan wadah kedap udara, bersih, kering, dan terbuat dari bahan lembam (*inert*) yang tidak akan bereaksi dan melepaskan bahan kimia ke dalam teh;
- 3) Hindari paparan terhadap kelembapan tinggi, sinar matahari langsung, atau bau menyengat selama proses pengambilan contoh berlangsung

6.1.1.2 Tata kerja pengambilan contoh

- 1) Contoh terduga teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh
 - Contoh primer: Sebagian kecil contoh diambil dari bagian atas, tengah, dan bawah wadah besar, atau dari beberapa kemasan ritel di seluruh tempat penjualan
 - Contoh massal (*bulk*): Gabungkan semua contoh primer dan aduk hingga merata di permukaan yang bersih
 - Memisahkan contoh laboratorium: Kurangi contoh campuran dalam jumlah besar menggunakan alat pengaduk, atau menggunakan metode pembagian empat bagian untuk mendapatkan jumlah akhir contoh laboratorium minimal 100 - 200 g
 - Segel dan tanda: Isi wadah sepenuhnya untuk meminimalkan ruang udara, segel rapat, dan tempelkan tanda yang mencantumkan nomor *batch*, tanggal, dan sumber.
 - Pengiriman segera: Kirim contoh ke laboratorium dalam kotak yang kokoh dalam waktu 48 jam untuk mencegah kerusakan atau perubahan kelembapan

2) Contoh pengendali (*control sample*)

Contoh pengendali diambil dari tempat yang menghasilkan contoh yang diketahui memiliki mutu yang sudah pasti. Contoh pengendali digunakan untuk membandingkan hasil pemeriksaan contoh sasaran dan contoh pengendali.

6.1.2 Peralatan uji

- 1) Teko (*pot*) dan mangkuk (*bowl*) pengujian: harus terbuat dari porselen putih, atau keramik berglasir putih dengan pinggiran corong yang bergerigi untuk

menahan daun teh ketika menuangkan hasil seduhan. Warna putih ini wajib agar penguji bisa melihat warna asli dari air seduhan teh dengan akurat

- 2) Teko: ditentukan dalam dua standar ukuran (besar dan kecil). Teko besar memiliki daya tampung maksimal 310 mL (berat 200 g), sedangkan teko kecil memiliki daya tampung maksimal 150 mL (berat 118 g)
- 3) Penutup teko harus longgar dan memiliki lubang kecil agar udara bisa bersirkulasi
- 4) Mangkuk diperlukan untuk menampung hasil seduhan teh. Mangkuk besar berdaya tampung 380 mL, berat 200 g. Mangkuk kecil berdaya tampung 200 mL, berat 105 g.

6.1.3 Tata cara pemeriksaan

- 1) Menggunakan 2,5 g teh per 100 mL air bersuhu 85 °C (dengan toleransi ketepatan $\pm 2\%$);
- 2) Penyeduhan dilakukan menggunakan air tanpa mineral (yang diproses secara osmosis terbalik, *reverse osmosis*) bersuhu 85 °C;
- 3) Masukkan daun teh kering yang sudah ditimbang ke dalam teko;
- 4) Air mendidih dituangkan ke dalam teko hingga menyisakan jarak 4 - 6 mm dari bibir teko;
- 5) Setelah enam menit, seluruh air seduhan dituangkan secara perlahan dari teko ke dalam mangkuk porselen. Daun teh akan tertahan oleh gerigi teko;
- 6) Penutup teko diletakkan dengan posisi terbalik, lalu letakkan daun teh yang telah terekstraksi (*infused leaf*) di atas penutup teko tersebut untuk diuji aromanya secara terpisah;
- 7) Pemeriksaan yang sama dilakukan juga terhadap contoh pengendali.

6.1.4 Penilaian

Penilaian dilakukan terhadap tiga unsur utama, meliputi

- 1) daun teh kering: Dinilai penampilan fisik dan warnanya
- 2) daun teh basah (*infused leaf*): Dinilai penampakan warna dan aroma setelah diseduh
- 3) air seduhan (*liquor*): Dinilai kejernihan warna, kekuatan aroma, serta profil rasa (*flavor*)

Dasar penilaian mengacu pada Tabel 1 dan 2 di bawah.

6.2 Pemeriksaan fisik

Berdasarkan SNI 3945:2016 - *teh hijau* dan SNI 1902:2016 - *Teh hitam*, parameter yang digunakan dalam pemeriksaan fisik dan organoleptik pada teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh adalah kenampakan kering, air seduhan, dan ampasnya disajikan dalam Tabel 3.

6.2.1 Penyiapan contoh

Pengambilan contoh teh yang diduga mengandung ampas teh kering dan teh pengendali (teh hijau dan teh hitam bermutu) harus mengikuti tata kerja pengambilan contoh padatan yang merata (homogen).

- 1) Contoh teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh dan teh pengendali kering dicampurkan secara merata dalam wadah bersih sebelum ditimbang untuk menghindari bias ukuran partikel daun
- 2) Contoh teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh dan teh pengendali kering ditimbang secara tepat menggunakan timbangan analitik. Untuk keperluan pengujian teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh kering, umumnya ditimbang sebanyak 2,8 g untuk cangkir kapasitas 140 mL, atau 5,6 g (sering dikenakan menjadi lima gram) jika menggunakan cangkir kapasitas 280 mL

6.2.2 Peralatan

- 1) Timbangan analitik yang memiliki ketelitian minimal 0,01 g
- 2) Cangkir pencoba porselen (*tasting cup*) berwarna putih dengan volume sekitar 140 mL atau 280 mL yang dilengkapi dengan tutup. Tutup ini memiliki lubang kecil untuk mengalirkan udara saat dituang
- 3) Mangkok pencoba porselen (*tasting bowl*) berwarna putih bersih untuk menampung dan mengamati air seduhan teh
- 4) Teko perebus air dan pemanas listrik untuk mendidihkan air suling/bebas mineral
- 5) Pengukur waktu (*timer/stopwatch*) untuk memastikan lama penyeduhan tepat selama lima menit
- 6) Nampan/meja uji putih dengan permukaan putih bersih dan datar untuk menghamparkan daun teh kering untuk memeriksa rupa, bentuk gulungan, dan warna

Tabel 1. Uraian kriteria penilaian pemeriksaan organoleptik

Uraian karakteristik	Kriteria penilaian									
	A	Skor	B	Skor	C	Skor	D	Skor	E	Skor
<u>I. Penampilan daun teh</u>	Dibuat dengan baik	(24 s/d 30)	Baik	(18 s/d 23)	<i>Fair made</i>	(12 s/d 17)	Tidak memuaskan	(6 s/d 11)	Jelek	0
1. Warna	Kehitaman dan mekar	6 - 7	Kehitaman	4 - 5	Agak hitam, kecoklatan, keabuan, daun sedikit hijau	3 - 4	Keabuan	1 - 2	Kemerahan, kasar (0 s/d 9)	0
2. Kerataan	Rata 100%	6 - 8	Rata 96-99%	5 - 7	Agak rata 90-97%	3 - 5	Tidak merata 80-89%	2 - 3	Kasar tidak beraturan, bercampur	0
3. Kebersihan	Bersih 100%	6 - 8	Bersih 90%	5 - 6	<i>Few fihres</i> , sedikit bertangkai, agak bersih 96%, sedikit berbubuk 2%	3 - 4	Beberapa berserat, beberapa bertangkai, berbubuk	2 - 3	<i>Fibrous, solky owder</i> , terlalu kasar, rapuh, terlalu tebal	0
4. Bentuk dan ukuran	Berbutir, miring	6 - 7	Agak butir, some lips, few lips	4 - 5	<i>Rather choppy, rather flake</i> , sedikit terbuka	3 - 4	Terbuka/rapuh, kecil, tebal	1 - 3	Terlalu kecil	0 - 3

Uraian karakteristik	Kriteria penilaian									
	A	Skor	B	Skor	C	Skor	D	Skor	E	Skor
<u>II. Air seduhan</u>	Sangat bagus	(49 s/d 60)	Bagus	(37 s/d 48)	Sedikit bagus	(16 s/d 36)	Tidak memuaskan	(13 s/d 24)	Jelek	(0 s/d 1)
1. Warna air	Merah cerah & berwarna <i>Good strength, body</i>	16 - 20	Merah cerah <i>Strength, some strength</i>	12 - 16	<i>Fairly bright, light in cup,</i> kurang kuat, <i>slight dry</i>	5 - 12	Gelap di dalam cangkir, pahit, kasar, lembut, kering, kehijauan, topi, polos (<i>plain</i>)	4 - 8	Kusam	0 - 4
2. Kekuatan	Bermutu, bagus	17 - 20	<i>Brisk</i>	13 - 16	<i>Fair strength, brisk</i>	5 - 12	<i>Less brisk, over forced</i>	5 - 8	<i>Tainted (spicey, oily, smoky, musty, sour, fruity, raw, bakey, burn)</i>	0 - 4
3. Aroma	Beraroma	16 - 20	Beraroma	12 - 16	Normal	5 - 12	Sedikit tua	4 - 8	<i>Gone off, tainted</i>	0 - 4
<u>III. Daun teh basah</u>	Sangat bagus	(8 s/d 10)	Bagus	(6 s/d 7)	Agak bagus	(4 s/d 5)	Tidak memuaskan	(2 s/d 3)	Jelek	1
1. Warna	Sangat cerah, <i>coppery</i>	5	Cerah, <i>coppery</i>	4	Agak cerah	3	Agak keruh, kehijauan	2	Kusam/gelap	1
2. Kerataan	Rata >90%	5	Rata >83%	3	Rata >80%	2	Tidak rata	1	<i>Tainted, bercampur</i>	0

Sumber: PT. Perkebunan Nusantara I (Holding)

Tabel 2. Rangkuman kriteria penilaian uji organoleptik

Uraian	Kriteria penilaian				
	A	B	C	D	E
1. Tampilan	A	B	C	D	E
2. Warna air	5	4	3	2	1
3. Kekuatan (zat terlarut)	45 - 49	39 - 43	33 - 37	27 - 31	21 - 23
4. Aroma	F(5) ¹	H(4) ²	N(3) ³	O(2) ⁴	T(1) ⁵
5. Ampas	A	B	C	D	E
6. Skor mutu	81 - 100	61 - 80	41 - 60	21 - 40	0 - 20

Sumber: PT. Perkebunan Nusantara I (Holding)

Keterangan:

¹F(5): *Flavoury*, nilai 5, aroma/ flavor sangat baik, khas, dan nyata

²H(4): *Has flavoury*, nilai 4, ada karakter *Flavoury* yang baik

³N(3): Normal, nilai 3, aroma normal, tetapi tidak menonjol

⁴O(2): *Oldies*, nilai 2, ada kesan agak tua/*stale*

⁵T(1): *Tainted*, nilai 1, ada aroma/rasa asing, atau cacat/tercemar

Kriteria penerimaan

A & B : Diterima

C : Ditolak, kecuali atas pertimbangan dan kebijakan tersendiri

D & E : Ditolak untuk diperbaiki (teh sortiran/campuran/mutu rendah)

6.2.3 Tata kerja pemeriksaan

6.2.3.1 Pemeriksaan kenampakan kering

- 1) Contoh teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh dan teh pengendali disiapkan secukupnya secara acak
- 2) Amati warna daun teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh dan teh pengendali
- 3) Lakukan pemeriksaan bentuk dan kehalusan, atau keragaman ukuran partikel
- 4) Gunakan seperangkat alat ayakan baku untuk menentukan besarnya ukuran partikel teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh dan teh pengendali yang diperiksa

6.2.3.2 Pemeriksaan seduhan dan ampas

- 1) Sejumlah dua gram teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh dan teh pengendali diseduh menggunakan air panas bersuhu 95 °C untuk teh hitam dan teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh; dan 85 °C untuk teh hijau dalam waktu lima menit
- 2) Amati warna air seduhan sesuai dengan karakter contoh teh pengendali
- 3) Cium aroma seduhan dalam keadaan panas dan agak dingin
- 4) Cicipi rasa seduhan di lidah untuk menilai sifat astringen dan rasa khasnya
- 5) Amati bentuk dan warna ampas seduhan setelah airnya dibuang untuk menilai keteraturan helai daun

6.2.4 Pencatatan hasil

Mencatat hasil pemeriksaan dengan struktur data seperti yang disajikan dalam Tabel 3 dan 4 di bawah.

6.3 Pemeriksaan kimiawi

Berdasarkan SNI 3945:2016 - *teh hijau* dan SNI 1902:2016 - *Teh hitam*, pemeriksaan mutu melalui pemeriksaan kimiawi, beberapa parameter wajib yang diperiksa meliputi:

- 1) kadar air: yang menentukan batas maksimal kandungan air dalam teh kering untuk menjaga daya simpan;
- 2) kadar abu total: yang mengukur kandungan mineral total setelah proses pengabuan contoh;
- 3) kadar abu larut dalam air: yang menilai persentase abu total yang dapat larut dalam air.

Tabel 3. Parameter pemeriksaan fisik terhadap penampakan teh kering, air seduhan dan ampas

Parameter	Pengamatan
<u>1. Penampakan kering</u>	
1.1 Warna	Hijau kehitaman hingga kuning kecokelatan
1.2 Bentuk	Melilit, atau melengkung rumit hingga bentuk batang, atau bubuk
1.3 Aroma	Normal khas teh hijau kering
1.4 Tekstur	Kering dan renyah
1.5 Keragaman ukuran	Keseragaman partikel, atau ukuran daun teh
1.6 Benda asing	Bebas dari kotoran atau material asing di luar bagian tanaman teh
<u>2. Air seduhan dan ampas</u>	
2.1 Warna air seduhan	Hijau kekuningan hingga kuning kemerahan yang cerah
2.2 Aroma seduhan	Normal dan harum khas seduhan teh hijau
2.3 Rasa	Sepat khas teh yang normal dan tidak menyimpang
2.4 Ampas seduhan	Menunjukkan kenampakan sisa seduhan daun yang seragam
2.5 Kadar air	Maksimal 8% untuk teh hijau kering

Tabel 4. Struktur data hasil pemeriksaan fisik teh hijau, teh hitam, dan teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh

Parameter	Penafsiran hasil		
	Teh hijau ¹	Teh hitam ²	teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh
<u>Kenampakan kering</u>			
1 Bentuk	Serpihan daun utuh, tergulung, bulat, atau sedikit melintir akibat proses pengeringan	Teh hitam Orthodox dicirikan oleh partikel yang tergulung kuat, melingkar, dan keriting. Sedangkan teh metode CTC (Crush, Tear, Curl) dicirikan oleh butiran-butiran bulat yang seragam dan padat	
2 Warna kering	Hijau zaitun, hijau tua, atau agak kecoklatan cerah (bukan hitam seperti teh hitam)	Warna hitam berkilau (blackish/bright)	
3 Kebersihan	Bebas dari debu berlebih, kotoran asing, atau tangkai kasar di luar standar mutu	Bebas dari pencemaran benda asing. Persentase tulang daun (stalk) dan tangkai (stem) harus seminimal mungkin	

Hasil seduhan

Penafsiran hasil			
Parameter			
		Teh hijau ¹	Teh hitam ²
			teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh
4	Warna air seduhan	Kuning pucat, hijau kekuningan, hingga hijau jernih dan transparan (tidak keruh)	berwarna merah terang, jernih, hingga coklat keemasan. Warna merah gelap yang pekat namun bersih menandakan pembentukan senyawa theaflavin dan thearubigin yang optimal selama oksidasi
5	Aroma seduhan	Segar khas tanaman (vegetal), herbal, atau bau asbut yang lembut	
6	Rasa	Khas teh hijau yang menyegarkan dengan dominan rasa sepat dan sedikit pahit alami	
7	Kecerahan		Tampak hidup dan berkilau di pinggir cangkir (bright), bukan keruh (dull) atau berlumpur
8	Ampas daun	Daun yang diseduh akan mekar kembali memperlihatkan struktur helaian daun aslinya yang berwarna hijau segar	Berwarna coklat kemerahan cerah seperti warna tembaga (coppery). Warna ampas harus merata di seluruh lembaran atau partikel daun

¹Pratama *et al.* 2024; ²Sinaga *et al.* 2023

- 4) kadar abu tidak larut dalam asam: yang menjadi petunjuk tingkat pencemaran mineral luar, seperti pasir atau tanah
- 5) alkalinitas abu larut dalam air: yang mengukur sifat basa dari abu yang larut guna melacak penambahan bahan kimia tertentu
- 6) kadar serat kasar: yang menilai kandungan selulosa, atau bagian tanaman yang tua/keras (seperti terlalu banyak batang)
- 7) cemaran logam berat: yang menentukan batas maksimal kandungan logam berbahaya seperti timbal (Pb), kadmium (Cd), merkuri (Hg), dan arsen (As)
- 8) cemaran jasad renik: yang menentukan batas ambang angka lempeng total (ALT) serta angka total kapang dan khamir (AKK) untuk memastikan aspek higienitas produk.

Selain parameter di atas, beberapa parameter yang terkait dengan polifenol yang dikandung daun teh meliputi

- 1) Kadar total polifenol: 25–35% dari berat kering daun
- 2) Kadar total katekin: 30–42% dari total padatan yang dapat diekstraksi dalam daun
- 3) Kadar epigallocatechin gallate (EGCG): 40–69% dari total katekin yang ada
- 4) Kadar epigallocatechin (EGC): 12–23% dari katekin
- 5) Kadar epicatechin gallate (ECG): 13–21% dari katekin
- 6) Kadar epicatechin (EC): 5–9% dari katekin

(Nain *et al.* 2022; Radeva-Ilieva *et al.* 2025;

6.3.1 Pemeriksaan melacak kadar unsur polifenol

Pemeriksaan kimia terhadap teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh diutamakan memeriksa kadar unsur polifenol yang dikandung oleh teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh.

6.3.1.1 Penyiapan contoh

- 1) Pengambilan contoh di kebun
 - a) Petik tunas teratas dan dua atau tiga daun muda di bawahnya dari tanaman teh hijau (*Camellia sinensis*) yang sehat
 - b) Ambil contoh pada jam-jam pagi yang tetap untuk mengurangi keragaman lingkungan
 - c) Segera masukkan contoh ke kantong plastik berpenanda di dalam kotak pendingin, atau wadah berlapis/kedap
- 2) Stabilisasi dan Inaktivasi Enzim
 - a) Cegah kerusakan polifenol yang disebabkan oleh enzim polifenol oksidase (PPO) endogen

- b) Contoh dibekukan secara cepat di lapangan menggunakan nitrogen cair, atau es kering
- c) Cara lain, menghentikan kerja enzim lakukan dengan cara memanaskan daun segar dalam oven bersuhu 120 °C selama enam menit (Xu *et al.* 2023)

3) Pengeringan dan penggilingan

- a) Kering bekukan daun beku untuk mempertahankan katekin peka agar tetap optimal, atau dikeringkan dalam oven pada suhu 90 °C sampai dengan 100 °C hingga beratnya tetap (konstan)
- b) Haluskan daun kering menggunakan penggiling dingin, atau penggiling laboratorium baku hingga menjadi bubuk halus
- c) Saring bubuk yang sudah digiling menggunakan saringan berukuran 80 mesh (atau 250 mikron) untuk memastikan ukuran partikel seragam

4) Penyimpanan dan ekstraksi

- a) Simpan bubuk yang telah diayak dalam wadah kedap udara dan gelap pada suhu sangat rendah (-20 °C, atau lebih rendah) hingga dilakukan pemeriksaan
- b) Bubuk teh hijau (0,50 g) dan etanol (18 mL) dicampur dalam tabung sentrifus 50 mL. Ekstraksi polifenol teh hijau dilakukan pada suhu ruang 25 °C sambil digoyangkan selama 24 jam (Luo *et al.* 2020).

6.3.1.2 Peralatan dan bahan

- a) Perangkat kromatografi cair kinerja tinggi (*high performance liquid chromatography*, HPLC)
- b) Tabung sentrifus 50 mL
- c) *Orbital shaker*
- d) Ayakan/saringan 80 mesh (atau 250 mikron)
- e) Kotak kedap udara
- f) Penggiling dingin untuk membuat bubuk teh
- g) Nitrogen, atau es kering
- h) Asam format
- i) Asetonitril
- j) polifenol standar komersil: epigallocatechin (EGC) (waktu penahanan 9,9 menit), epicatechin (EC) (waktu penahanan 13,5 menit), epigallocatechin gallate (EGCG) (waktu penahanan 13,8 menit), dan epicatechin gallate (ECG) (waktu penahanan 20,3 menit)

6.3.1.3 Tata kerja pemeriksaan

Melacak unsur polifenol dilakukan menggunakan teknik kromatografi cair kinerja tinggi (*high performance liquid chromatography*, HPLC).

- 1) Ekstrak teh hijau yang diperoleh dianalisis menggunakan HPLC menggunakan kolom Agilent XDB C18 (5 μ m, 4,6 mm 250 mm)
- 2) Fase gerak terdiri dari pelarut A (0,1% (v/v) asam format dalam air) dan pelarut B (asetonitril)
- 3) Analisis dilakukan dengan program elusi gradien: 0 menit, 5% B (v/v); 10 menit, 16% B (v/v); 15 menit, 16% B (v/v); 20 menit, 30% B (v/v); 25 menit, 100% B (v/v); 28 menit, 100% B (v/v); 29–35 menit, 5% B (v/v)
- 4) Volume injeksi contoh adalah 5 L, dan laju alir diatur pada 1,0 mL/menit
- 5) Waktu penahanan (retensi) dan spektrum senyawa fenolik dibandingkan dengan senyawa baku (*standard*) dan dihitung berdasarkan luas puncak
- 6) Hasilnya dinyatakan dalam “mg/g” berat kering (*dry weight*).

6.3.1.4 Pencatatan hasil

Hasil pemeriksaan polifenol untuk membandingkannya dalam teh hijau, teh hitam, dan teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh disajikan dalam Tabel 5.

Tabel 5. Hasil pemeriksaan polifenol terhadap teh hijau, teh hitam, dan teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh

Parameter	Kadar senyawa dalam contoh		
	Teh hijau	Teh hitam	teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh
1. Polifenol ^{1,2}			
1.1 Epigallocatechin (EGC)(mg/g berat kering)	22 $\pm$ 1	10 - 42	
1.2 Epicatechin (EC)(mg/g berat kering)	6,9 $\pm$ 0,2		
1.3 Epigallocatechin galate (EGCG)(mg/g berat kering)	92 $\pm$ 2	10 - 42	

1.4 Epigcatechin galate	35,4	±
(ECG)(mg/g berat kering) (mg/g berat kering)	0,4	

¹Dalam ekstraksi etanol ²Luo *et al.* 2020

6.3.2 Pemeriksaan melacak kadar air

Pemeriksaan kimiawi untuk melacak kadar air dalam contoh teh dilakukan mengacu SNI-01-3836-2000 - *Teh kering dalam kemasan*

6.3.2.1 Pengambilan contoh

- 1) Ambil contoh yang mewakili dari lot, atau kemasan teh secara acak sesuai dengan jumlah besaran partai barang
- 2) Alat pengambil contoh harus bersih, kering, dan tidak memengaruhi kelembapan contoh
- 3) Masukkan contoh primer yang diambil ke dalam wadah yang bersih, kering, kedap udara, dan tertutup rapat untuk mencegah perubahan kadar air akibat kelembapan udara luar
- 4) Homogenkan contoh gabungan sebelum diambil bagian untuk pengujian laboratorium

6.3.2.2 Penyiapan contoh

- 1) Aduk contoh yang diterima di laboratorium sampai merata tanpa mengubah kelembapannya
- 2) Hindari pemanasan, atau penggilingan berlebih yang dapat menyebabkan susut air (penguapan) prematur pada contoh
- 3) Ambil sejumlah massa tertentu dari contoh (umumnya sekitar dua gram, atau mengikuti metode baku susut pengeringan) secara cepat untuk menghindari penyerapan, atau pelepasan uap air dari udara sekitar

6.3.2.3 Alat dan bahan

- 1) Oven pengering (berventilasi, mampu menjaga suhu tetap pada kisaran $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- 2) Cawan timbang (terbuat dari kaca atau logam, lengkap dengan penutup yang pas)
- 3) Neraca analitik (ketelitian hingga 0,1 mg)
- 4) Desikator (berisi silika gel atau agen pengering yang efektif)

6.3.2.4 Tahap persiapan cawan

- 1) Cawan timbang dan tutupnya dibersihkan, lalu dipanaskan di dalam oven pada suhu **105 °C selama minimal satu jam**
- 2) Cawan dan tutupnya dipindahkan ke dalam desikator menggunakan penjepit
- 3) Dibiarkan dingin hingga mencapai suhu ruang (sekitar 20–30 menit)

- 4) Timbang cawan kosong tersebut beserta tutupnya menggunakan neraca analitik. Bobotnya dicatat sebagai M_0

6.3.2.5 Tahap penimbangan contoh

- 1) Sebanyak dua gram hingga lima gram contoh teh kering ditempatkan ke dalam cawan yang telah ditera sebelumnya
- 2) Contoh diratakan di dasar cawan secara merata
- 3) Cawan segera ditutup dan ditimbang kembali. Bobot cawan + contoh awal dianggap sebagai M_1

6.3.2.6 Tahap pengeringan (oven)

- 1) Tutup cawan berisi contoh dibuka, lalu cawan beserta tutupnya (secara terpisah/berdampingan) dimasukkan ke dalam oven yang telah mencapai suhu $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 2) Pemanasan contoh di dalam oven dilakukan selama **tiga jam**
- 3) Setelah waktu tercapai, tempatkan kembali tutup cawan saat masih di dalam oven (atau segera saat dikeluarkan), lalu cawan tersebut dipindahkan ke dalam desikator
- 4) Cawan didinginkan di dalam desikator hingga suhu ruang, kemudian timbang kembali
- 5) Untuk memastikan bobotnya benar-benar tetap, cawan dimasukkan kembali ke dalam oven selama 30 menit hingga satu jam. Didinginkan kembali di desikator dan timbang lagi. Proses ini diulangi sampai selisih penimbangan berturut-turut kurang dari 0,001 g (satu miligram). Bobot akhir dicatat sebagai M_2

6.3.2.7 Perhitungan kadar air

Kadar air dalam persen fraksi massa (% b/b) dihitung menggunakan rumus berikut

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0} \times 100\%$$

untuk

- M_0 : bobot cawan kosong + tutupnya (g)
 M_1 : bobot cawan + tutup + contoh sebelum dikeringkan (g)
 M_2 : bobot cawan + tutup + contoh setelah dikeringkan/konstan (g)

8. Hasil yang diperoleh dicatat untuk dibandingkan antar teh hijau, teh hitam, dan teh pastel seperti dalam Tabel 6.

Tabel 6. Hasil pemeriksaan kadar air dan ekstrak dalam air terhadap teh hijau, teh hitam, dan teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh

Parameter	Kadar senyawa dalam contoh		
	Teh hijau	Teh hitam	teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh
1. Kadar air, maksimal	8%	7%	
2. Kadar ekstrak dalam air, minimal (b/b)	32%	32%	

6.3.3 Pemeriksaan melacak kadar ekstrak dalam air

Pemeriksaan untuk melacak kadar ekstrak dalam air mengacu pada SNI-01-3836-2000 dan ISO 9768 - *Tea — Determination of water extract*.

6.3.3.1 Pengambilan contoh

- 1) Ambil contoh yang mewakili dari lot, atau kemasan teh secara acak sesuai dengan jumlah besaran partai barang
- 2) Alat pengambil contoh harus bersih, kering, dan tidak memengaruhi kelembapan contoh
- 3) Masukkan contoh primer yang diambil ke dalam wadah yang bersih, kering, kedap udara, dan tertutup rapat untuk mencegah perubahan kadar air akibat kelembapan udara luar
- 4) Homogenkan contoh gabungan sebelum diambil bagian untuk pengujian laboratorium

6.3.3.2 Penyiapan Contoh

- 1) Contoh kerja dimasukkan ke dalam wadah bersih, kering, kedap udara, dan bebas dari bau asing
- 2) Contoh dijaga agar tidak tercemari, atau terpapar udara luar terlalu lama
- 3) Jika ukuran partikel tidak seragam, dilakukan pengecilan ukuran, atau pencampuran cepat secara hati-hati tanpa menaikkan suhu contoh

6.3.3.3 Peralatan dan bahan

- 1) Labu refluks/labudidih (kapasitas 500 mL) dilengkapi kondensor
- 2) Penangas air (*water bath*, atau *hot plate*)
- 3) Cawan penguap (jika menggunakan metode penguapan filtrat), atau kertas saring bebas abu (jika menggunakan metode penimbangan residu)
- 4) Oven pengering (mampu menjaga suhu $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- 5) Desikator
- 6) Neraca analitik dengan ketelitian 0,0001 g

6.3.3.4 Tata kerja pemeriksaan

- 1) Contoh ditimbang dengan teliti sekitar dua gram hingga lima gram yang telah dihomogenkan. Bobotnya dicatat sebagai bobot awal contoh (W)
- 2) Proses ekstraksi (*Reflux*)
- 3) Contoh dimasukkan ke dalam labudidih. Lalu ditambahkan sekitar 200 mL air murni/suling mendidih
- 4) Labu dihubungkan dengan kondensor, lalu panaskan di atas alat pemanas
- 5) Lakukan proses refluks (perebusan konstan) selama satu jam

Setelah satu jam, pemanas dimatikan dan dibiarkan sedikit mendingin. Larutan disaring selagi hangat menggunakan kertas saring ke dalam labu ukur (jika ingin mengukur volume filtrat), atau memisahkan ampasnya secara kuantitatif jika menggunakan metode pengukuran residu. Bilas labu dan ampas dengan sedikit air mendidih untuk memastikan tidak ada ekstrak yang tertinggal

6.3.3.5 Pengeringan dan Penimbangan

- 1) *Metode alikuot filtrat*: sejumlah volume filtrat tertentu (misalnya 50 mL) diambil dan dimasukkan ke dalam cawan penguap yang bobot kosongnya sudah konstan (W_0). Uapkan di atas penangas air hingga kering, lalu keringkan di dalam oven pada suhu 103 °C hingga bobotnya tetap. Dinginkan dalam desikator dan timbang (W_1).
- 2) *Metode residu ampas*: Kertas saring yang berisi ampas teh dikeringkan di dalam oven pada suhu 103 °C hingga bobotnya tetap. Lalu hitung selisih beratnya terhadap berat teh awal setelah dikoreksi dengan faktor kadar air teh asal

6.3.3.6 Perhitungan kadar ekstrak

Jika menggunakan metode penguapan filtrat (alikuot), kadar ekstrak dalam air dihitung dengan rumus

$$\text{Kadar Ekstrak dalam Air (\% b/b)} = \frac{W_1 - W_0}{W} \times \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{alikuot}}} \times 100\%$$

untuk

- W_1 : bobot cawan + ekstrak kering setelah dikeringkan dengan oven (g)
 W_0 : bobot cawan kosong tetap (g)
 W : bobot contoh teh awal (g)
 W_{total} : volume total filtrat hasil penyaringan (mL)
 W_{alikuot} : volume filtrat yang dipipet/diuapkan (mL)

Hasil yang diperoleh dicatat dan dibandingkan dengan teh hijau, teh hitam, dan teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh seperti dalam Tabel 6.

6.4 Pemeriksaan mikrobiologik

Pemeriksaan mikrobiologik dalam teh hijau berdasarkan 3945:2016 - *Teh hijau* dan teh hitam berdasarkan 1902:2016 - *Teh hitam* dilakukan terhadap jasad-jasad renik dalam bentuk angka lempeng total (ALT, *total plate count*, TPC), bakteri bentuk koli (*coliform*), dan angka lempeng khamir dan kapang (*total yeast mould count*, TYMC). Beberapa kelompok jasad renik yang perlu dikenali juga terhadap pemeriksaan teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh, diantaranya bakteri *Bacillus* sp., Enterobacteriaceae (*Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp.); kapang *Aspergillus* sp.; dan khamir *Candida* sp.

Alat dan bahan

Alat dan bahan yang digunakan untuk pemeriksaan mikrobiologik, diantaranya

- 1) Ruang keselamatan hayati (*Biosafety cabinet*, BSC)/*laminar airflow*
- 2) Oven
- 3) Otoklaf
- 4) Inkubator
- 5) Penangas air (*waterbath*)
- 6) Cawan petri
- 7) Batang kaca penyapu berbentuk huruf L
- 8) Gelas piala 100 mL
- 9) Tabung reaksi
- 10) Pipet volumetrik 10 mL
- 11) Rak tabung
- 12) Vortex
- 13) Alat penghitung (*counter*)
- 14) Sendok atau sekop anti karat
- 15) Plate Count Agar
- 16) Nutrient Agar (NA)
- 17) Tryptic Soy Agar (TSA)
- 18) Simmons Citrate Agar
- 19) MacConkey Agar (MCA)
- 20) Agar Eosin Metilen Biru (EMB)
- 21) Agar Violet Red Bile Glucose (VRBG)
- 22) Violet Red Bile (VRB)
- 23) Dichloran-Glycerol 18% Agar (DG-18)
- 24) Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC)
- 25) Sabouraud Dextrose Agar (SDA)
- 26) Potatoes Dextrose Agar (PDA)
- 27) Larutan 0,85% NaCl
- 28) Larutan penyangga air pepton

Pengambilan contoh

Pengambilan contoh dilakukan mengikuti acuan pada SNI 19-0428-1998 - *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

- 1) Berat maksimum satu partai teh hijau adalah empat ton
- 2) Contoh diambil secara acak sekurang-kurangnya 10% dari jumlah kemasan (peti triplek atau kantong kertas) dalam satu partai
- 3) Pengambilan dilakukan secara aseptik dan higienis, menggunakan alat pengambil contoh suci hama (steril) dan dihindarkan dari sentuhan tangan langsung agar terhindar dari pencemaran jasad renik luar

Penyiapan contoh

Beberapa perlakuan diterapkan ke contoh sebelum dilakukan pemeriksaan, diantaranya

- 1) Contoh dimasukkan ke wadah, atau kantong suci hama yang bersih, kering, dan tertutup rapat
- 2) Contoh disiapkan dalam ruang suci hama, atau *laminar airflow*, atau ruang keselamatan hayati (*biosafety cabinet*, BSC) menggunakan peralatan laboratorium yang telah disucihamakan menggunakan oven
- 3) Campur dan aduk contoh teh secara merata sebelum ditimbang agar mewakili
- 4) Timbang bobot contoh secara aseptik untuk pengujian parameter sesuai acuan yang digunakan

6.4.1 Angka lempeng total bakteri

Angka lempeng total (total plate count, TPC)—juga disebut *Aerobic Plate Count* (APC), atau *Standard Plate Count* (SPC)—adalah uji laboratorium kuantitatif yang mengukur jumlah jasad renik aerobik yang hidup—termasuk bakteri, khamir, dan kapang—yang mampu tumbuh pada cawan agar dalam keadaan suhu dan oksigen tertentu.

6.4.1.1 Persiapan

- 1) Bersihkan area kerja dan sucihamakan semua peralatan kaca, cawan petri, dan media agar
- 2) Buat larutan pengencer cair suci hama seperti larutan buffer fosfat atau larutan garam
- 3) Lelehkan media agar (seperti Plate Count Agar, PCA, atau Nutrient Agar. NA) dan dinginkan dalam penangas air hingga mencapai suhu 45–50 °C

6.4.1.2 Pengenceran serial

- 1) Campurkan 1,0 mg contoh teh ke dalam tabung pengenceran pertama berisi 9,0 mL cairan pengencer (larutan penyangga fosfat, atau larutan 0,85% NaCl). Dianggap sebagai pengenceran 10^{-1}
- 2) Ambil 1,0 mL dari tabung pertama dan pindahkan ke tabung berikutnya yang berisi 9,0 mL cairan pengencer baru. Dianggap sebagai pengenceran 10^{-2}
- 3) Langkah ini diulangi untuk membuat rangkaian pengenceran 10^{-3} , dan 10^{-4} .

6.4.1.3 Inokulasi (*plating*) dan inkubasi

Ada dua teknik inokulasi yang dapat digunakan yaitu (i) teknik tuang, dan (ii) teknik sebar yang cukup dipilih satu teknik saja.

- 1) Teknik tuang: Sebanyak 1,0 mL suspensi contoh dari setiap tabung pengenceran ke dalam masing-masing cawan petri kosong suci hama. Tuangkan agar cair hangat dari penangas air di atasnya dan aduk perlahan dengan gerakan angka 8 hingga tercampur merata.
- 2) Metode Sebar: Sebanyak 1,0 mL suspensi contoh dari setiap tabung pengenceran ke atas cawan agar padat. Cairan disebar secara merata di bagian atas media agar padat menggunakan batang kaca berbentuk huruf L suci hama

Biarkan semua agar yang diinokulasi mengeras sepenuhnya. Balikkan cawan petri.

Tempatkan di dalam inkubator pada suhu 35–37 °C selama 24 hingga 48 jam.

6.4.1.4 Penghitungan

- 1) Setelah masa inkubasi tercapai, pilih cawan petri yang menunjukkan jumlah koloni yang mudah dihitung, biasanya antara 30 dan 300 koloni
- 2) Hitung koloni menggunakan penghitung manual, atau digital
- 3) Kalikan jumlah akhir koloni dengan faktor pengenceran untuk menemukan jumlah unit pembentuk koloni (*colony forming unit*, CFU), atau koloni per gram, atau mililiter

Hasil pemeriksaan dicatat dalam Tabel 7 untuk dibandingkan antara teh hijau, teh hitam, dan teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh.

6.4.2 Angka lempeng total bakteri bentuk koli (*coliform*)

Bakteri bentuk koli (*coliform*) berfungsi sebagai jasad renik penanda untuk mengukur tingkat kebersihan, efektivitas sanitasi, dan peluang pencemaran setelah-pemrosesan.

6.4.2.1 Pengumpulan contoh

- 1) Bersihkan dan cuci hamakan sendok, atau wadah pengambilan contoh menggunakan alkohol isopropil 70%
- 2) Sebagian contoh teh kering dikumpulkan minimal 25 g langsung ke dalam kantong penyaring suci hama, atau wadah bermulut lebar
- 3) Contoh kering disimpan pada suhu ruangan (25 °C sampai dengan 27 °C) hingga diperiksa dalam waktu 36 jam setelah pengumpulan

6.4.2.2 Persiapan dan pengenceran contoh

- 1) Timbang 25 g contoh teh kering campuran ke dalam kantong penyaring suci hama yang berisi 225 mL pengencer suci hama, seperti larutan penyangga fosfat, atau air pepton
- 2) Homogenkan campuran dalam *stomacher* selama kurang lebih dua menit untuk melepaskan jasad renik ke dalam fase cair. Campuran ini dianggap sebagai pengenceran 10^{-1}
- 3) Pindahkan satu mililiter larutan pengenceran 10^{-1} ke dalam sembilan mililiter pengencer suci hama untuk membuat larutan pengenceran 10^{-2} , dan ulangi langkah-langkah serial selanjutnya jika diperkirakan akan terdapat beban bakteri yang tinggi

6.4.2.3 Inokulasi ke media pertumbuhan

- 1) Masukkan satu mililiter dari masing-masing pengenceran yang telah disiapkan ke dalam beberapa cawan petri suci hama
- 2) Tuangkan sekitar 10–15 mL media Violet Red Bile (VRBA) cair (suhu sekitar 45 °C), lalu homogenkan dengan gerakan membentuk angka 8. Biarkan hingga media memadat
- 3) Setelah memadat, tuangkan kembali 3–4 mL media VRBA cair di atas permukaan agar yang telah memadat sebagai lapisan penutup
- 4) Media yang telah diinokulasi diinkubasi pada suhu 35 °C sampai dengan 37 °C selama 24 jam

6.4.2.4 Mengenali dan penghitungan TPC bakteri bentuk koli

- 1) Setelah masa inkubasi dicapai, dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan bakteri. Cawan yang diamati adalah cawan yang terdapat

koloni bakteri dalam perkiraan jumlah koloni pada kisaran 25 sampai dengan 250 koloni

- 2) Koloni bakteri umumnya berdiameter 0,5 mm, atau lebih besar
- 3) Koloni bakteri bentuk kuli berwarna merah tua hingga merah keunguan (*purplish-red*) di permukaan media VRBA. Warna ini terbentuk karena bakteri menghasilkan asam dari fermentasi laktosa, yang menurunkan pH media dan mengubah warna indikator merah netral (*neutral red*)
- 4) Koloni bakteri dikelilingi zona halo kemerahan (presipitat garam empedu) di sekitar koloni. Hal ini terjadi karena asam yang dihasilkan mengendapkan garam empedu (*bile salts*) di dalam media
- 5) Perhitungan hitung cawan total (*total plate count*, TPC) dilakukan menggunakan rumus:

$$\text{Jumlah Koloni (CFU/mL atau CFU/g)} = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)] \times d}$$

untuk

$\sum C$: total jumlah koloni yang dihitung dari seluruh cawan yang masuk rentang

n_1 : jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung

n_2 : jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung

d : faktor pengenceran pertama yang dihitung

Hasil pemeriksaan dicatat dalam Tabel 7 untuk dibandingkan antara teh hijau, teh hitam, dan teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh

6.4.3 Mengisolasi dan mengenali *Bacillus megaterium*

6.4.3.1 Persiapan contoh dan kejutan panas (isolasi selektif)

- 1) Sebanyak 10 g teh kering ditimbang dalam keadaan aseptik
- 2) Masukkan/campurkan ke dalam gelas piala yang berisi 90 mL larutan garam suci hama (0,85% NaCl), atau larutan penyangga air pepton
- 3) Aduk untuk menghomogenkan suspensi secara menyeluruh
- 4) Pindahkan sebagian suspensi ke dalam tabung reaksi suci hama
- 5) Inkubasi dalam penangas air pada suhu 80 °C selama 10 hingga 15 menit
- 6) Segera dinginkan tabung hingga mencapai suhu 25 °C sampai 27 °C di bawah air mengalir, atau dalam rendaman es untuk mencegah kerusakan spora akibat panas

6.4.3.2 Pengenceran serial dan inokulasi

- 1) Pengenceran serial desimal (10^{-1} hingga 10^{-5}) disiapkan dari suspensi yang telah dipanaskan menggunakan larutan garam suci hama
- 2) Sebanyak 0,1 mL dari setiap pengenceran dipindahkan ke cawan berisi Nutrient Agar (NA) atau Tryptic Soy Agar (TSA)
- 3) Tetesan suspensi diratakan secara merata menggunakan batang penyebar kaca bentuk L, atau plastik suci hama
- 4) Jika tetesan di atas permukaan agar sudah kering, cawan diinkubasi dalam posisi terbalik pada suhu 30 °C hingga 37 °C selama 24 hingga 48 jam dalam kondisi aerobik

6.4.3.3 Penapisan secara morfologik

Periksa cawan petri untuk koloni yang sesuai dengan karakteristik visual *Bacillus megaterium*

- 1) Morfologi koloni: Setelah masa inkubasi dicapai, perhatikan koloni yang sangat besar (seringkali berdiameter tiga milimeter sampai dengan lima milimeter). Koloni umumnya tampak berwarna putih krem hingga krem kekuningan, berbentuk bulat hingga tidak beraturan, sedikit cembung, halus, dan mungkin memiliki tepi bergelombang atau utuh (Das *et al.* 2026)
- 2) Pemeriksaan mikroskopik (pewarnaan Gram): Pewarnaan Gram pada koloni yang dicurigai menggunakan teknik pewarnaan Gram. Bakteri *B. megaterium* akan tampak sebagai sel berbentuk batang Gram-positif yang luar biasa besar (panjang 2--5 μm) yang sering tersusun dalam

rantai, mengandung endospora elipsoidal sentral, atau sub-terminal (Kumar *et al.* 2012)

6.4.3.4 Pengenalan biokimiawi

Pembuatan biakan subkultur perlu dilakukan pada satu koloni murni ke cawan petri NA yang baru dan melakukan uji fenotipik untuk membedakan *B. megaterium* dari spesies *Bacillus* lainnya (seperti *B. subtilis*, atau *B. cereus*).

Karakter biokimiawi *B. megaterium* adalah katalase positif, oksidase positif, Voges-Proskauer (VP) negatif, tidak memproduksi indole, sitrat positif, menghidrolisis pati, dan memfermentasi manitol.

6.4.3.5 Penetapan molekuler (identifikasi pasti)

Untuk memastikan pengenalan, perlu dilakukan pemeriksaan secara molekuler.

Ekstrak DNA genom dari isolat murni. Amplifikasi gen 16S rRNA melalui reaksi rantai polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR) menggunakan primer universal (misalnya, 27F dan 1492R). Urutkan produk yang diperkuat dan seajarkan menggunakan database NCBI BLAST untuk memeriksa kecocokan identitas >99% dengan *B. megaterium*.

Tahapan pengerjaan menggunakan teknik PCR mengikuti Kadyan *et al.* (2013) dan N'zi *et al.* (2022) yang disajikan sebagai berikut

- 1) ekstraksi DNA: Mengisolasi DNA genom murni dari satu koloni bakteri menggunakan kit baku, atau kejutan termal
- 2) amplifikasi PCR: Menggunakan primer 16S rDNA universal (misalnya, 27F dan 1492R) untuk menyalin wilayah sasaran
- 3) elektroforesis Gel: Pastikan keberhasilan amplifikasi dengan memeriksa ukuran pita yang benar (~1.500 bp untuk 16S) pada gel agarosa
- 4) pengurutan dan BLAST: Urutkan produk PCR yang dimurnikan melalui metode Sanger, atau NGS, kemudian cari urutan tersebut di Database BLAST NCBI untuk memastikan identitas tingkat spesies
- 5) sasaran alternatif: Untuk penyaringan fungsional yang cepat, ssarkan gen spesifik seperti gen polihidroksialkanoat sintase (*phaC*) yang unik untuk *B. megaterium*

6.4.4 Menghitung cawan total *Enterobacter*

Penghitungan total *Enterobacter* digunakan sebagai penanda tingkat kebersihan yang penting.

6.4.4.1 Pengambilan contoh

Untuk melakukan pemeriksaan terhadap Enterobacteriaceae (famili yang mencakup genus *Enterobacter*) dalam contoh teh kering, harus mencegah pencemaran dari luar dan memastikan daun kering terhidrasi dengan baik untuk melepaskan bakteri yang terperangkap.

Tata kerja untuk mengumpulkan, menghidrasi, dan menyiapkan contoh teh kering mengikuti acuan internasional, seperti ISO 21528-2 dan AOAC protokol. Tahapannya sebagai berikut

- 1) Contoh teh kering yang mewakili dikumpulkan menggunakan sendok, atau sekop anti karat (*stainless steel*) yang telah disucihamakan. Jangan menyentuh teh dengan tangan kosong
- 2) Masukkan sekitar 200 g contoh teh kering komposit ke dalam kantong contoh suci hama (misalnya, kantong Whirl-Pak atau *stomacher*), atau wadah kedap udara suci hama
- 3) Kantong disegel untuk melindunginya dari kelembapan, atau uap air lingkungan. Beri label dengan jelas dengan nomor batch, tanggal, dan waktu pengumpulan
- 4) Kirim contoh langsung ke laboratorium. Simpan di tempat yang sejuk dan gelap untuk menghindari perubahan beban jasad renik awal

6.4.4.2 Persiapan, homogenisasi, dan pengenceran contoh

- 1) Sebanyak 10,0 g daun teh kering ditimbang secara aseptik menggunakan timbangan yang telah ditera dan dimasukkan ke kantong *stomacher* 400 mL suci hama
- 2) Tuangkan 90 mL pengencer suci hama, seperti air pepton 0,1%, buffer air pepton, atau larutan NaCl steril 0,9%, ke dalam kantong. Campuran ini dianggap sebagai pengenceran awal sebesar 10^{-1} .
- 3) Tempatkan kantong teh di dalam *stomacher* mekanik (*bag mixer*) dan campur selama 60 hingga 120 detik. Jika alat pengaduk (*stomacher*) tidak tersedia, kocok campuran dengan kuat selama 60 detik, lalu putar sebentar menggunakan vortex untuk menyebarkan jasad renik di dalam campuran secara merata
- 4) Isi serangkaian tabung reaksi dengan sembilan mililiter pengencer suci hama air pepton 0,1%

- 5) Lakukan seri pengenceran sepuluh kali lipat dengan cara memindahkan satu mililiter dari suspensi *stomacher* 10^{-1} awal ke dalam tabung sembilan mililiter pertama untuk membuat pengenceran 10^{-2} . Suspensi dikocok hingga tercampur rata. Kemudian, pindahkan satu mililiter dari tabung 10^{-2} ke tabung sembilan mililiter berikutnya untuk membuat pengenceran 10^{-3} . Ulangi proses ini hingga 10^{-5} , atau 10^{-6} , tergantung pada tingkat pendugaan pencemaran yang diharapkan pada contoh teh kering.

6.4.4.3 Membiakkan ke media selektif

- 1) Beberapa media selektif dapat dipilih salah satunya digunakan untuk membiakkan bakteri *Enterobacter*, diantaranya
 - MacConkey Agar (MCA): Merupakan media yang paling umum digunakan. Gram-negatif *Enterobacter* memfermentasi laktosa, menghasilkan koloni berwarna merah muda, seringkali berlendir.
 - Agar Eosin Metilen Biru (EMB): *Enterobacter* tumbuh sebagai koloni besar, berlendir, berwarna coklat kemerahan dengan bagian tengah berwarna gelap (tidak seperti *Escherichia coli*, yang biasanya menghasilkan kilau metalik hijau)
 - Agar Violet Red Bile Glucose (VRBG): Koloni *Enterobacter* berwarna merah muda hingga merah dengan zona pengendapan empedu
- 2) Ada dua teknik yang dapat digunakan untuk membiakkan ke media selektif, yakni
 - a) teknik sebar di atas permukaan agar
 - Menggunakan pipet, ambil 0,1 mL dari setiap tabung pengenceran dan dilepaskan ke atas permukaan cawan agar selektif yang dipilih dan yang telah dituangkan dan dipadatkan sebelumnya
 - Sucihamakan batang kaca berbentuk L (tongkat hoki) menggunakan alkohol dan api.
 - Biarkan batang mendingin, lalu sebar cairan secara merata ke seluruh permukaan agar sambil memutar cawan Petri.
 - Setelah permukaan agar kering, inkubasi cawan petri pada suhu 35°C - 37°C selama 24 sampai dengan 48 jam
 - b) teknik agar tuang

- Menggunakan pipet, ambil 0,1 mL dari setiap tabung pengenceran dan dilepaskan ke dasar cawan Petri kosong dan suci hama
- Tuangkan sekitar 15–20 mL agar selektif yang dipilih (yang telah dilelehkan dan didinginkan hingga 45–50 °C agar tidak membunuh bakteri) di atas tetesan suspensi.
- Putar cawan secara perlahan dengan gerakan angka delapan untuk mencampur media dan contoh secara menyeluruh dengan agar. Biarkan hingga mengeras
- Setelah media mengeras, inkubasi seluruh cawan petri pada suhu 35 °C - 37 °C selama 24 sampai dengan 48 jam.

6.4.4.4 Penghitungan TPC

Setelah masa inkubasi dicapai, periksa pertumbuhan koloni pada cawan petri. Pilih cawan petri yang berisi antara 30 dan 300 koloni.

- 1) Jika satu cawan petri memiliki lebih dari 300 koloni, catat sebagai TNTC (terlalu banyak untuk dihitung, *too numerous to count*)
- 2) Jika satu cawan petri memiliki kurang dari 30 koloni, batas kesalahan statistiknya terlalu tinggi

Penentuan angka TPC dilakukan menggunakan rumus

$$\text{Jumlah sel (koloni/ml atau koloni/g)} = \sum C \times \frac{1}{d}$$

untuk

$\sum C$: total jumlah koloni yang dihitung dari seluruh cawan yang masuk rentang

d : faktor pengenceran pada cawan yang dihitung (contoh: 10^{-2} , 10^{-3} , dan seterusnya)

Hasil pemeriksaan dicatat dalam Tabel 7 untuk dibandingkan diantara teh hijau, teh hitam, dan teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh.

6.4.5 Penghitungan khamir-kapang total (*total yeast-mold count*, TYMC)

Parameter jumlah total khamir dan kapang (TYMC) adalah penanda mutu dan keamanan mikrobiologik yang penting untuk teh kering. Jumlah khamir dan kapang yang tinggi menunjukkan keadaan sanitasi yang buruk selama panen, penanganan, pembuatan, atau pengemasan. Jumlah khamir dan kapang yang rendah mencerminkan kepatuhan terhadap praktik manufaktur yang baik (*good manufacturing practice*, GMP) dan pengendalian proses yang tepat.

6.4.5.1 Pengumpulan teh kering

- 1) Kumpulkan contoh teh kering menggunakan sendok dan penjepit yang telah disuci-hamakan sekurang-kurangnya 50–100 g
- 2) Tempatkan contoh teh kering ke dalam kantong, atau wadah suci hama dan kedap udara
- 3) Jaga agar contoh teh kering tetap kering dan sejuk, hindari kelembapan, atau pencemaran uap air sebelum pengujian.

6.4.5.2 Persiapan dan homogenisasi contoh

- 1) Timbang 25 g contoh teh kering secara aseptik ke dalam kantong *stomacher* suci hama
- 2) Ukur dan tambahkan 225 mL air pepton 0,1% suci hama, atau air pepton yang berpenyangga, secara aseptik
- 3) Campurkan bahan-bahan tersebut dalam *stomacher* laboratorium selama satu sampai dengan dua menit untuk melepaskan kapang dan khamir dari matriks tanaman kering, dan menghasilkan pengenceran primer 10^{-1} .

6.4.5.3 Pengenceran serial

- 1) Pindahkan satu mililiter suspensi pengenceran 10^{-1} ke dalam tabung yang berisi sembilan mililiter air pepton 0,1% suci hama untuk membuat pengenceran 10^{-2} , dan kocok hingga tercampur rata
- 2) Ulangi langkah 1) secara berurutan, memindahkan satu mililiter ke dalam sembilan mililiter, untuk mencapai pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , atau lebih tinggi tergantung pada perkiraan beban kapang dan khamir.

6.4.5.4 Pembiakan

- 1) Gunakan media dengan aktivitas air rendah yang disarankan; seperti agar Dichloran-Glycerol 18% Agar (DG-18) (SNI ISO 21527-2), atau agar Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC); yang dilengkapi dengan agen antibakteri (seperti kloramfenikol) untuk menghentikan pertumbuhan bakteri

- 2) Tuangkan 0,1 mL (teknik penyebaran permukaan), atau 1 mL (teknik tuang/petrifilm) contoh teh kering yang telah diencerkan ke atas cawan agar. Lakukan pengulangan dua kali
- 3) Balikkan cawan dan inkubasi pada suhu 25 °C sampai dengan 28 °C selama lima hari (penghitungan biasanya dibaca sekitar hari ke-3 hingga ke-5).

6.4.5.5 Penghitungan total khamir-kapang

- 1) Amati pengenceran duplikat dan pilih hanya cawan petri yang memiliki antara 10 dan 150 koloni
- 2) Hitung rata-rata jumlah koloni dari cawan satu pengenceran
- 3) Penghitungan total khamir-kapang (TYMC) dilakukan menggunakan rumus di bawah ini

$$\text{TYMC (CFU/g, atau CFU/mL)} = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2) \times d}$$

untuk

$\sum C$ = jumlah koloni yang dihitung dalam cawan yang dipilih
 n_1 = jumlah koloni yang dihitung dalam cawan pengenceran terendah
 n_2 = jumlah koloni yang dihitung dalam cawan pengenceran tertinggi
 d = faktor pengenceran dari pengenceran pertama yang digunakan

Hasil pemeriksaan dicatat ke dalam Tabel 7 untuk dibandingkan antara teh hijau, teh hitam, dan teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh.

6.4.6 Penghitungan kapang *Aspergillus fumigatus* total

Parameter jumlah total *A. fumigatus* merupakan penanda mikrobiologik penting yang digunakan untuk menilai kebersihan, keamanan kesehatan, dan mutu pengolahan teh kering. Meskipun genus *Aspergillus* terkadang terlibat dalam fermentasi teh spesial, seperti Pu-erh, pemantauan *A. fumigatus* secara khusus sangat penting karena beberapa alasan.

6.4.6.1 Pengumpulan contoh teh kering

- 1) Gunakan peralatan yang suci hama (seperti sendok, atau penjepit suci hama) dan wadah, atau kantong suci hama, kedap udara, dan anti bocor untuk mengumpulkan teh kering
- 2) Kumpulkan porsi yang mewakili, misalnya 25 g hingga 50 g, atau beberapa kantong teh/contoh curah individual) dari berbagai bagian *batch*, atau jalur pemrosesan (titik *conveyor*, rantai pencampuran, atau kemasan ritel)
- 3) Jaga agar contoh tetap kering, sejuk, dan terlindungi dari kelembapan atau pencemaran dari luar selama dibawa ke laboratorium. Olah contoh sesegera mungkin (idealnya dalam 24 jam).

6.4.6.2 Penyiapan dan homogenisasi contoh

- 1) Timbang secara aseptik sebagian contoh yang mewakili (umumnya 10 g hingga 25 g teh kering) menggunakan timbangan laboratorium yang telah ditera
- 2) Untuk ekstraksi yang seragam, teh kering dapat dihomogenkan secara lembut dan aseptik menggunakan lesung dan alu suci hama, atau dilumatkan menggunakan blender hingga ukuran partikel merata;
- 3) Suspensi awal (pengenceran):
 - pindahkan contoh teh yang telah ditimbang ke dalam kantong penyaring suci hama, labu Erlenmeyer, atau wadah
 - tambahkan pengencer suci hama yang sesuai—biasanya 90 mL hingga 225 mL air pepton 0,1% suci hama, larutan garam fisiologis 0,9% dengan 0,05% Tween 80, atau air suling suci hama (dengan mempertahankan rasio pengenceran awal baku 1:10, misalnya, 10 g contoh teh dalam 90 mL pengencer), untuk mendapatkan pengenceran 10^{-1} .
 - Buat pengenceran serial berikutnya 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , dan 10^{-5}

6.4.6.3 Homogenkan campuran secara menyeluruh menggunakan mesin *stomacher* (selama satu sampai dengan dua menit), atau

pengaduk/vortex listrik (selama lima sampai dengan 15 menit) untuk melepaskan spora kapang dari daun teh kering ke dalam suspensi cair.

6.4.6.4 Inokulasi dan penempatan di cawan (teknik sebaran di atas cawan)

- 1) Menggunakan pipet suci hama, ambil 0,1 mL (atau 100 µL) dari setiap pengenceran ke permukaan cawan SDA atau PDA yang telah disiapkan
- 2) Gunakan penyebar kaca, atau plastik suci hama untuk menyebarkan cairan secara merata di permukaan cawan agar
- 3) Gandakan, atau rangkap tiga cawan setiap pengenceran untuk memastikan ketepatan secara statistik
- 4) Inkubasi cawan petri pada suhu 25 °C hingga 28 °C selama lima sampai dengan tujuh hari untuk memungkinkan pertumbuhan kapang secara total (Karena *A. fumigatus* adalah kapang termotoleran, lakukan juga inkubasi paralel pada suhu 45 °C untuk mendukung pertumbuhannya sambil menghambat pertumbuhan kapang pencemar lainnya).

6.4.6.5 Pengenalan dan perhitungan

- 1) Amati cawan petri yang menunjukkan pertumbuhan koloni kapang sebanyak antara 15 dan 150 koloni
- 2) Pastikan morfologi koloni *A. fumigatus*:
 - makroskopik: cari koloni yang tumbuh cepat, berwarna hijau keabu-abuan, bertekstur beludru, atau seperti bubuk dengan batas putih;
 - mikroskopis: buat preparat selotip, atau preparat basah menggunakan laktofenol kapas biru. Dalam pengamatan mikroskopik, *A. fumigatus* menunjukkan vesikel berbentuk labu khas yang mengandung fialida uniseriat (baris tunggal) yang mengarah ke atas, menghasilkan kolom konidia hijau.
- 3) Hitung populasi total *A. fumigatus* dalam unit pembentuk koloni per gram (CFU/g) menggunakan rumus

$$\text{Populasi (CFU/g)} = \frac{\text{Jumlah koloni} \times \text{faktor pengencer}}{\text{Volume yang ditempatkan dalam cawan}}$$

Hasil pemeriksaan dicatat ke dalam Tabel 7 untuk dibandingkan antara teh hijau, teh hitam, dan teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh.

6.4.7 Penghitungan total khamir *Candida*

Dalam produksi teh, pemantauan parameter keamanan mikrobiologik, seperti *Candida*, sangat penting untuk memastikan kesehatan konsumen, mutu bahan baku, dan umur simpan jangka panjang. Meskipun *Candida* bukanlah agen "fermentasi" utama dalam teh tradisional, keberadaannya berfungsi sebagai penanda utama kebersihan dan efisiensi pengolahan.

Protokol yang digunakan untuk mengukur dan menghitung khamir *Candida* dalam contoh teh kering adalah SNI ISO 21527-2.

6.4.7.1 Pengumpulan contoh teh kering

- 1) Ambil contoh yang dapat mewakili (minimal 25 g) dari kumpulan teh kering menggunakan spatula, atau sendok suci hama
- 2) Tempatkan contoh ke dalam wadah suci hama kedap udara, kantong *stomacher*, atau kantong Whirl-Pak yang dapat disegel
- 3) Simpan contoh teh kering pada suhu ruangan, atau keadaan sejuk dan kering yang terlindungi dari kelembapan hingga dilkukn analisis untuk mencegah perubahan beban mikroba.

6.4.7.2 Persiapan dan homogenisasi contoh

- 1) Timbang 25 g contoh teh kering secara aseptik ke dalam kantong *stomacher* suci hama. Tambahkan 225 ml pengencer suci hama—biasanya air pepton 0,1%, atau air pepton berpenyangga—untuk membuat pengenceran awal (10^{-1})
- 2) Campur, atau proses kantong dalam mesin *stomacher* untuk pelumatan selama sekitar satu sampai dengan dua menit hingga contoh benar-benar seragam
- 3) Lakukan pengenceran serial berikutnya hingga diperoleh pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , dan 10^{-2} .

6.4.7.3 Inokulasi

- 1) Gunakan media agar DRBC, atau Sabouraud Dextrose Agar (SDA) yang dilengkapi dengan antibiotika (seperti kloramfenikol) untuk menghambat pertumbuhan bakteri
- 2) Menggunakan pipet yang suci hama, ambil 0,1 ml (100 μ l), atau satu mililiter masing-masing pengenceran yang sesuai ke permukaan agar padat. Sebarkan inokulum secara merata menggunakan kaca suci hama, atau penyebar berbentuk L. Siapkan juga pengendali (media dan pengencer pengendali) untuk menilai kesuci-hamaan

- 3) Inkubasi cawan petri yang telah diinokulasi pada posisi terbalik pada suhu 25 °C sampai dengan 30 °C (biasanya sekitar 25–28 °C untuk khamir dan kapang pada umumnya) selama tiga sampai dengan lima hari.

6.4.7.4 Penghitungan koloni

- 1) Hitung koloni pada cawan petri yang menunjukkan pertumbuhan koloni antara 15 dan 150 CFU
- 2) Kenali koloni *Candida* berdasarkan morfologi khamir yang khas, yakni halus, cembung, dan lembut, dan dipastikan menggunakan pemeriksaan mikroskopik (sel khamir bertunas bersifat Gram-positif), atau tes biokimia/kromogenik
- 3) Hitung jumlah total per gram teh kering menggunakan rumus:

$$\text{Populasi } \textit{Candida} \text{ (CFU/g)} = \frac{\sum C}{(1 \times n_1 + 0,1 \times n_2) \times d}$$

untuk

$\sum C$ = jumlah koloni yang dihitung dalam cawan yang dipilih
 n_1 = jumlah koloni yang dihitung dalam cawan pengenceran terendah
 n_2 = jumlah koloni yang dihitung dalam cawan pengenceran tertinggi
 d = faktor pengenceran dari pengenceran pertama yang digunakan

Hasil pemeriksaan dicatat ke dalam Tabel 7 untuk dibandingkan antara teh hijau, teh hitam, dan teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh.

Tabel 7. Hasil pemeriksaan mikrobiologik dari teh hijau, hitam, dan yang mengandung ampas teh

No.	Parameter mikrobiologik	Kandungan dalam		
		Teh hijau	Teh hitam	teh hijau dan hitam yang mengandung ampas teh
1	Angka lempeng total, maksimum (CFU ¹⁾ /g)	3×10^3	3×10^3	
2	Bakteri bentuk koli (APM ²⁾ /g)	< 3	< 3	
3	Total bakteri <i>B. megaterium</i> ³			
4	Total bakteri <i>Enterobacter</i> ³⁾			
5	Kapang dan khamir, maksimum (CFU/g)	5×10^2	5×10^2	
6	Kapang (CFU/g) - Daun teh kering, atau dalam kantong teh (teh putih, teh hijau, teh hitam, teh oolong, <i>scented tea</i>)(SNI 7388:2009)	5×10^2	5×10^2	
7	Kapang dan khamir (CFU/g) - Teh dikemas siap diminum (<i>ready to drink</i>)(SNI 7388:2009)	10^2	10^2	
8	Total kapang <i>A. fumigatus</i> ³⁾			
9	<i>Candida</i> (CFU/g) - Daun teh kering (teh putih, teh hijau, teh hitam, teh oolong, <i>scented tea</i>)(SNI 7388:2009)	10^2	10^2	
10	<i>Candida</i> (CFU/g) - Teh dikemas siap diminum (<i>ready to drink</i>)(SNI 7388:2009)	10^2	10^2	

¹⁾CFU = *colony forming unit* (koloni) ²⁾APM = angka paling mungkin (*most probable number*)

³⁾Tidak diatur dalam SNI

7. Bibliografi

- Abdul-Kareem, F., Al-Nazzal, A.I., and Yaseen, A.A. 2021. Isolation, Diagnosis and Characterization of *Aspergillus* sp from Tea Bags Samples and Its Ability to Produce Ochratoxin A. *Tikrit J Agric Sci.*, 21(3): 11-19. doi: 10.25130/tjas.21.3.2
- Das M., Prasad A., Divyashree, Parthiban, Dinakaran. 2026. Isolation and identification of bacteria from green tea bags. *IJNTI*, 4(5): a69-a75.
- Luo Q., Zhang J-R., Li H-B., Wu D-T., Geng F., Corke H., Wei X-L., Gan R-Y. 2020. Green Extraction of Antioxidant Polyphenols from Green Tea (*Camellia sinensis*). *Antioxidants*, 9(9):785. <https://doi.org/10.3390/antiox9090785>
- Kadyan S., Panghal M., Singh K., Yadav JP. 2013. Development of a PCR based marker system for easy identification and classification of aerobic endospore forming bacilli. *SpringerPlus*, 2(1), 596. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-596>
- Kumar A., Kumar A., Thakur P., Patil S., Payal C., Kumar A., Sharma P. 2012. Antibacterial activity of green tea (*Camellia sinensis*) extracts against various bacteria isolated from environmental sources. *Recent Res Sci Technol.*, 4(1): 19-23.
- Nain CW., Mignolet E., Herent M-F., Quetin-Leclercq J., Debier C. Page MM. Larondelle Y. 2022. The Catechins Profile of Green Tea Extracts Affects the Antioxidant Activity and Degradation of Catechins in DHA-Rich Oil. *Antioxidants*, 11: 1844. <https://doi.org/10.3390/antiox11091844>
- N'zi K., Attchelouwa C., N'guessan KF., Tano K. 2022. Molecular Identification of *Bacillus* Species during Spontaneous Fermentation of Lima Bean Flour (*Phaseolus lunatus*). *Biotechnol J Int*, 26(1): 1-8. DO - 10.9734/bji/2022/v26i130160
- Pakshir, K., Mirshekari, Z., Nouraei, H., Zareshahrabadi, Z., Zomorodian, K., Khodadadi, H., Hadaegh, A. 2020. Mycotoxins Detection and Fungal Contamination in Black and Green Tea by HPLC-Based Method. *J Toxicol.*, 2456210, 7 pages, <https://doi.org/10.1155/2020/2456210>
- Pratama AY., Arianti V.; Adrianto D., Krismayadi. 2024. Perbandingan Standarisasi Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis* L.) dengan Pelarut yang Berbeda. *Indonesian J Health Sci.*, 4(6s): 785-794.
- Radeva-Ilieva M., Stoeva S., Hvarchanova N., Georgiev KD. 2025. Green Tea: Current Knowledge and Issues. *Foods*. 14(5):745. <https://doi.org/10.3390/foods14050745>
- Sinaga STD., Putri SH., Pujianto T. 2023. Analisis Pengendalian Kualitas Pada Proses Produksi Teh Hitam Menggunakan Metode Statistical Quality Control. *TEKNOTAN*, 17(2): 153-160. DOI 10.24198/jt.vol17n2.10

- Viegas, C., Dias, M., Carolino, E., Sabino, R. 2021. Culture Media and Sampling Collection Method for *Aspergillus* spp. Assessment: Tackling the Gap between Recommendations and the Scientific Evidence. *Atmosphere*, 12(1):23. <https://doi.org/10.3390/atmos12010023>
- Wardani DCK., Tabina AG., Maulana H., Rahadi VP., Bagaskara F., Prayoga MK. 2025. Analisis Korelasi Antar Parameter Organoleptik dalam *Quality Control* Teh Hijau di Pusat Penelitian Teh dan Kina. *Jurnal Sains Teh dan Kina*, 4(2): 77-88.
- Xu J., Qu F., Shen B., Huang Z., Li X., Weng H., Ye D., Wu R. 2023. Rapid Detection of Tea Polyphenols in Fresh Tea Leaves Based on Fusion of Visible/Short-Wave and Long-Wave near Infrared Spectroscopy and Its Device Development. *Appl. Sci.*, 13: 1739. <https://doi.org/10.3390/app13031739>

Lampiran 1. Borang biodata panelis dalam pelaksanaan uji organoleptik

Nama Lengkap (tanpa gelar)	:		
Jenis Kelamin	:	(...) Laki – Laki	(...) Perempuan
Usia	:	(...) 15 – 20 Tahun	(...) 21 – 25 Tahun
		(...) 26 – 30 Tahun	(...) 31 – 35 Tahun
		(...) 36 – 40 Tahun	(...) 41 – 45 Tahun
		(...) 46 – 50 Tahun	(...) 51 – 55 Tahun
Tanggal Pengujian	:		
No kontak (HP/WA)	:		
Status	:	(...) Sudah menikah	(...) Belum menikah (...) Duda/Janda ¹⁾
Domisili	:		
Pendidikan terakhir	:	(...) SD	(...) SMP
		(...) SMA/SMK	(...) D3
		(...) S1	(...) S3
		(...) S2	
Pekerjaan	:	(...) Mahasiswa	(...) Aparatur Negeri Sipil
		(...) Wiraswasta	(...) Karyawan BUMN/BUMD
		(...) Karyawan / Buruh / Pegawai / Pekerja Bebas	(...) Tidak memiliki pekerjaan
Kekerapan meminum teh	:	(...) Satu hari satu kali	(...) Satu minggu dua kali
		(...) Satu hari dua kali	(...) Dua minggu satu kali
		(...) Satu minggu satu kali	(...) Satu bulan Satu kali
Apakah anda termasuk perokok?	:	(...) Iya (...) Tidak	
Apakah anda memiliki alergi terhadap minuman teh?	:	(...) Iya (...) Tidak	

¹⁾Coret yang tidak dipilih