

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Tinjauan Tentang Teh**

##### **2.1.1 Definisi Teh**

Teh merupakan minuman yang universal dikonsumsi di banyak Negara serta di berbagai lapisan masyarakat. Hasil survey menunjukkan bahwa teh merupakan minuman yang populer di seluruh dunia setelah air putih (tawar), lebih populer dibanding minuman anggur, *carbonated soft drink*, dan kopi. Minuman teh menduduki urutan ke-4 sebagai minuman harian di Amerika Serikat, rata-rata orang Amerika Serikat mengonsumsi teh sekitar 127-158 cangkir per tahun atau sekitar 31,7 liter teh per tahun. Penggunaan ekstrak teh hijau sebagai suplemen makanan juga berkembang pesat di Amerika Serikat.

Tanaman teh merupakan tanaman yang pada umumnya ditanam di perkebunan dan dipanen secara manual. Pohonnya kecil, karena seringnya pemangkasan maka tampak seperti perdu. Tanaman teh dapat tumbuh hingga mencapai tinggi 10-15 meter di alam liar, tetapi biasanya dibatasi hingga 2,5 meter dalam pembudidayaannya. The dapat tumbuh pada daerah dengan ketinggian 200-2300 meter di atas permukaan laut. Tanaman teh memiliki akar tunggang yang kuat. Batang tegak, berkayu, bercabang-cabang, ujung ranting dan daun muda berambut halus. Daun tunggal, berantai pendek, letak berseling, helai daun kaku seperti kulit tipis, bentuknya tipis memanjang, ujung dan pangkal runcing, tepi bergerigi halus, pertulangan menyirip, panjang 6-18 cm, lebar 2-6 cm, berwarna hijau dengan garis tengah 3-4 cm. Daun muda berwarna hijau cerah, sedangkan daun tua berwarna hijau tua dan

halus. Bunga berwarna putih cerah dengan kepala sari berwarna kuning, diameter 2,5-4 cm, berbau harum, terdiri atas 7-8 mahkota bunga, terpisah atau berkelompok, satu kelompok terdiri atas dua atau empat bunga. Buahnya berbentuk kotak, berdinding tebal, berwarna hijau saat masih muda dan saat tua berwarna coklat kehitaman. Biji keras sebanyak 1-3 biji (Widowati, 2018).

### **2.1.2 Sejarah Teh**

Tanaman teh pertama kali masuk ke Indonesia tahun 1684, berupa biji teh dari Jepang yang dibawa oleh orang Jerman bernama Andreas Cleyer. Saat itu, teh belum dibudidayakan. Teh hanya sekedar menjadi tanaman hias. Di Taman Istana Gubernur Jendral Belanda di Jakarta saat itu, Champuys, juga terdapat perdu pohon teh yang ditanam sebagai tanaman hias. Percobaan penanaman teh dalam skala besar belum berhasil karena iklim Indonesia yang berbeda dengan iklim di Cina dan Jepang. Pada tahun 1826, tanaman teh berhasil ditanam di Kebun Raya Bogor. Kemudian pada tahun 1827, ditanam di Kebun Percobaan Cisurupan, Garut, Jawa Barat.

Akhirnya pada tahun 1828, setelah kesuksesan percobaan penanaman teh skala besar di Wanayasa (Purwakarta) dan di Banyuwangi, Jacobus Isidorus Loudewijk Levian Jacobson, seorang ahli teh, mulai mendirikan perkebunan teh komersial. Dimulai usaha perkebunan teh di Jawa.

Pada masa pemerintahan Gubernur Van Den Bosch, teh menjadi salah satu tanaman yang harus ditanam rakyat melalui politik Tanam Paksa (*Culture Stelsel*). Pada tahun 1815, untuk pertama kalinya teh dari Jawa diekspor dan sebanyak 200 peti dilelangkan di Amsterdam. Pada awalnya teh yang ditanam di Indonesia adalah jenis teh *Sinensis* dari Cina, tetapi hasilnya tidak terlalu

bagus karena perbedaan iklim. The jenis *assamica* mulai masuk ke Indonesia, didatangkan langsung dari Sri Langka pada tahun 1877.

R. E. Kerkhoven menanam bibit teh ini di kebun Gambung, Jawa Barat yang kini menjadi lokasi Pusat Penelitian Teh dan Kina Gabung. Teh jenis *assamica* ini ternyata cocok dan produksinya lebih tinggi. Dengan begitu, secara berangsur penanaman jenis teh *sinensis* digantikan dengan teh jenis *assamica*. Sejak saat itu pula, perkebunan teh di Indonesia berkembang semakin luas.

Pada tahun 1910, mulai dibangun pula perkebunan teh di luar Pulau Jawa, yaitu di Derah Silimangun, Sumatera Utara. Hingga hari ini, hampir semua kebun teh di Indonesia adalah teh jenis *assamica*. Meskipun ada beberapa perkebunan yang menanam teh jenis *sinensis* tapi jumlahnya masih sangat kecil.

Jadi, sejarah teh di Indonesia sudah berusia ratusan tahun. Pada abad ke-19, teh Indonesia dibawa ke Eropa untuk diminum oleh kaum bangsawan dan kaum kerajaan. Indonesia pernah menjadi penghasil teh ketiga terbesar di dunia (Somantri, 2014).

### 2.1.3 Klasifikasi Teh

Berikut ini klasifikasi tanaman teh, yaitu sebagai berikut :

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Spematophyta</i>
Subdivisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledoneae</i>
Subkelas	: <i>Dialypetalae</i>

Ordo	: <i>Guttiferales</i>
Familia	: <i>Tehaceae</i>
Genus	: <i>Camellia</i>
Species	: <i>Camellia sinensis</i>

Berdasarkan varieties, teh dapat dibagi menjadi :1) *Camellia sinensis* var. *sinensis* (*China tea*): daun kecil dan ujung daun agak tumpul; 2) *Camellia sinensis* var. *assamica* (*Assam tea, Indian tea*): daun agak besar dengan ujung daun runcing; 3) *Camellia sinensis* var. *waldenae* (*Hong Kong tea*); 4) *Camellia sinensis* var. *parvifolia* (*Cambodia tea*) (Widowati, 2018).

#### **2.1.4 Jenis teh dan pengolahannya**

Pada dasarnya teh diproses menjadi tiga jenis, yaitu teh hijau, teh hitam, dan teh oolong. Lebih dari tiga perempat teh di dunia atau 75% diolah menjadi teh hitam dan menjadi salah satu jenis yang paling digemari di Amerika, Eropa, dan Indonesia. Sisanya sebanyak 23% diolah menjadi teh hijau dan 2% diolah menjadi teh oolong.

Teh (*Camellia sinensis*) saat ini dibedakan berdasarkan lokasi tumbuhnya. Hal inilah yang menyebabkan dikenalnya beragam teh. Teh hijau, teh oolong, dan teh hitam berasal dari tumbuhan yang sama. Nama dan wujudnya menjadi berbeda karena proses persiapan yang dijalani berbeda.

##### **1. Teh hijau**

Untuk memproduksi teh hijau tidak bias dilakukan sembarangan. Tujuan yang ingin dicapai dalam memproduksi teh hijau adalah mempertahankan manfaat kesehatan, kemurnian, dan senyawa aktif daun teh segar sehingga semuanya dapat dirasakan ketika teh disajikan. Proses pembuatan teh hijau yang pertama yaitu pelayuan dengan pemanasan uap. Pucuk teh ditabur dan diaduk untuk mengurangi kadar air yang terbawa oleh daun. Kemudian teh dilayukan dengan dilewatkan pada silinder panas sekitar 5 menit atau melewati beberapa saat pada uap panas bertekanan tinggi. Proses

selanjutnya yaitu proses pendinginan, yang bertujuan untuk mendinginkan daun setelah melalui proses pelayuan. Selanjutnya teh melalui proses penggulungan, dengan tujuan untuk memecahkan sel-sel daun sehingga the yang dihasilkan akan mempunyai rasa yang lebih sepat. Kemudian dilanjutkan pada proses pengeringan. Proses pengeringan pertama menggunakan ECP *drier* dan pengeringan kedua menggunakan *rotary dries*. Pengeringan bertujuan untuk menurunkan kadar air menjadi 30-35% dan memekatkan cairan sel. Proses ini dilakukan pada suhu 110-135° C selama 30 menit. Proses pengeringan kedua pada suhu 70-95° C dengan waktu sekitar 60-90 menit akan memperbaiki bentuk gulungan daun. Proses ini membantu pengaturan pengeluaran senyawa alami dan aroma teh selama penyeduhan.

## 2. Teh oolong

Meski tak sepopuler teh hijau, teh oolong juga memiliki penggemar sendiri. Proses produksi untuk menghasilkan teh oolong lebih rumit lagi, tetapi tidak serumit pembuatan teh hitam. Teh ini diproses dengan menjaga agar daun tehnya tetap utuh karena dibuat dari daun-daun teh yang lebih besar dan lebih tua. Proses yang pertama adalah pelayuan dengan menggunakan sinar matahari dilakukan selama 30-60 menit. Proses selanjutnya yaitu pelayuan dalam ruangan yang dilakukan selama 6-8 hari. Daun teh diaduk-aduk dengan tangan setiap jam sekali. Tujuannya agar pinggiran daun teh rusak. Tepi daun yang rusak akan berubah menjadi merah akibat proses fermentasi, sedangkan bagian tengahnya masih hijau. Tingkat fermentasinya tergantung pada tipe teh oolong yang diinginkan. Variasinya kira-kira 20% untuk teh oolong hijau hingga 60% untuk teh oolongformosa klasik. Begitu tingkat fermentasi yang diinginkan tercapai, proses harus dihentikan segera dengan pengeringan. Kemudian dilanjutkan pada proses pengeringan dengan sistem panning. Pengeringan dengan sistem ini yakni melewati daun teh pada silinder panas pada suhu 250-300° C selama 15 menit. Selanjutnya yaitu proses penggulungan daun, penggulungan daun dilakukan selama 5-12 menit. Kemudian dilakukan

pemotongan sesuai dengan ukuran yang diinginkan. Proses terakhir yaitu proses pengeringan yang dilakukan dengan sistem *panning* selama 10 menit.

### 3. Teh hitam

Teh hitam terbaik di dunia dihasilkan di India, Sri Lanka, serta Cina. Di Negara-negara barat, konsumsi tehnya lebih dari 80% menggunakan teh hitam. Khusus di Amerika, konsumsi teh jenis ini mencapai lebih dari 90%. Tahap penolahan yang pertama yaitu pelayuan dalam ruangan yang dilakukan selama 12-18 jam. Selama proses pelayuan yang lama ini, kadar air daun berkurang menjadi lembut sehingga daun mudah digiling. Proses selanjutnya yaitu penggilingan yang bertujuan agar membrane daun hancur sehingga mengeluarkan minyak asiri yang menimbulkan aroma yang khas. Kemudian dilanjutkan pada proses fermentasi penuh. Selama proses fermentasi, warna daun menjadi gelap dan sarinya menjadi kerang pahit. Proses fermentasi dihentikan saat aroma dan rasanya sudah maksimal. Proses selanjutnya adalah proses pengeringan yang dilakukan untuk mengurangi kadar air sebanyak 2-5%. Sarnya mengering pada permukaan daun teh dan bertahan relatif tetap sampai dilepaskan oleh air panas selama penyeduhan (Soraya, 2007).

#### **2.1.5 Kandungan teh**

Daun teh mengandung 30-40% polifenol yang sebagian besar dikenal sebagai katekin. Komposisi daun teh terkenal sangat kompleks. Lebih dari 400 komponen kimiawi telah diidentifikasi terkandung dalam daun teh. Jumlah komponen kimiawi ini berbeda-beda tergantung pada tanah, iklim, dan usia daun teh ketika dipetik. Katekin (polifenol) adalah antioksidan yang kuat, lebih kuat dari pada vitamin E, C, dan  $\beta$ -karoten. Di dalam teh terdapat beberapa jenis katekin, yaitu epikatekin (EC), epikatekin galat (ECG),

epigallocatekin (EGC), epigallocatekin galat (EGCG), gallokatekin, dan katekin (Syah, 2006).

Kandungan lain yang ada di dalam teh adalah fluoride, zat ini bias membunuh bakteri penyebab bau mulut, dan menghambat pembentukan plak pada gigi. Di dalam teh juga terdapat Vitamin dan mineral, teh mengandung karoten (prekursor vitamin A), tianin (vitamin B1), riboflavin (vitamin B2), asam nikotinat, asam pantotenat, asam askorbat (vitamin C), vitamin B6, asam folat, mangan, potassium, dan fluoride.

Di dalam teh juga mengandung kafein. Bukan hanya kopi yang mengandung kafein. Namun, kadar kafein dalam teh lebih kecil dari pada dalam kopi. Dalam satu cangkir kopi kira-kira terkandung 135 mg kafein, sementara satu cangkin teh hanya mengandung 30-40 mg kafein. Di dalam teh ada juga Theophylline. Zat ini hanya ditemukan dalam teh dan bias mengimbangi efek kafein (Soemantri dkk, 2011).

### **2.1.6 Manfaat Teh**

#### **A). Manfaat teh sebagai antiobesitas**

Tanaman herbal mengandung mineral dan senyawa yang memiliki efek antiobesitas, antara lain penurunan berat badan, lingkar pinggang, dan penurunan lemak tubuh. Selain itu terdapat beberapa pengaruh lain yang relevan dengan sifat antiobesitas, meliputi penurunan TG, LDL, rasio LDL/HDL, total kolesterol (TC), *C reactive protein* (CRP), leptin, lipid serum, lemak liver, adiponekin, apolipoprotein B-100, kadar glukosa darah, stress oksidatif dan terjadi peningkatan HDL, antioksidan, metabolisme tubuh dan kualitas hidup.

Mekanisme sebagai antiobesitas pada teh terkait dengan beberapa *pathway* seperti modulasi keseimbangan energy, sistem endokrin, *intake* makanan, metabolisme lipid dan karbohidrat serta status redoks.

#### B). Manfaat teh sebagai antihiperkolesterolemia

Teh dapat berperan sebagai antihiperkolesterolemia, melalui mekanisme sebagai berikut: 1). Mengurangi akumulasi lemak intraseluler; 2). Meningkatkan antioksidan; 3). Mengurangi absorpsi lipid; 4). Meningkatkan garam empedu; 5). Meningkatkan ekskresi lipid melalui feses; 6). Menghambat inflamasi.

#### C). Manfaat teh sebagai antiarthritis

Arthritis merupakan peradangan pada sendi. Teh yang merupakan bahan alami dan mengandung berbagai macam polifenol dapat bermanfaat sebagai anti-arthritis, dengan beberapa aktivitas yaitu: 1). Melindungi kartilago dan kondrosit, dengan menghambat ekspresi IL-1 $\beta$ , iNOS, COX-2, MMP-1, MMP-8, MMP-13, ADAMTS-5, TNF- $\alpha$ ; 2). Melindungi tulang, dengan mengurangi kehilangan proteoglikan dan fibrilasi kartilago; 3). Aktivitas pada fibroblas sinovial, menghambat kemokin MCP-1/CCL-2, produksi ENA-78/CXCL5, menghambat MMP-2, menghambat produksi IL-6; 4). Mengurangi rasa sakit pada penyakit OA; 5). Melindungi dari radikal bebas melalui aktivitas antioksidan, mengurangi produksi NO dan PGE2; 6). Sebagai antiinflamasi, menurunkan ekspresi sitokin-sitokin proinflamasi.

#### D). Manfaat teh sebagai antiosteoporosis

Teh yang mengandung berbagai senyawa aktif golongan *catechin*, flavonoid, kafein, dan berbagai senyawa mineral dapat membantu untuk



melindungi kepadatan tulang, melalui aktivitas sebagai berikut: 1). Mengurangi kehilangan masa tulang melalui aktivitas antioksidan, dengan mengurangi pembentukan deposit Ca yang diinduksi stress oksidatif serta pengurangan kerusakan stress oksidatif lainnya; 2). Mengurangi kehilangan masa tulang melalui aktivitas anti inflamasi; 3). Meningkatkan proses *osteoblastogenesis*, pembentukan tulang; 4). Menekan osteoklastogenesis; 5). Memiliki peran dalam aktivitas osteoimunologi, dengan menghambat diferensiasi osteoklas melalui sinyal RANKL, dan mengatur produksi sitokin oleh sel imun.

#### E). Manfaat teh sebagai antikanker

Teh dan senyawa teh dapat menjadi bahan antikanker, dengan efeknya melalui modulasi menggunakan proses yang kompleks antara lain: 1). Menghambat tahap inisiasi kanker melalui penghambat aktivitas karsinogen dan mutagen; 2). Menghambat tahap promosi kanker; 3). Mengatur siklus sel kanker; 4). Menghambat tahap progresi kanker, dan mengatur MMP; 5). Menginduksi kematian sel; 6). Antiangiogenesis.

#### F). Manfaat teh sebagai antidiabetes

Teh dan senyawa didalamnya memiliki aktivitas hipoglikemik atau menurunkan glukosa darah berdasarkan uji *in vivo* model DM atau uji klinis melalui mekanisme: 1). Teh mampu menghambat aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase; 2). Teh mampu menghambat enzim  $\alpha$ -amilase saliva, pancreas; 3). Teh mampu menghambat penyerapan glukosa; 4). Teh memperbaiki resistensi insulin; 5). Teh menurunkan glukoneogenesis; 6). Teh memiliki aktivitas antioksidan.

G).Manfaat teh sebagai antioksidan

Teh memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi karena mengandung *catechin* dan polifenol, yang berguna dalam memerangkap *reactive oxygen species* (ROS) dan radikal bebas. Teh dapat menghambat stres oksidatif di dalam tubuh sehingga mencegah berbagai jenis penyakit yang diakibatkan oleh radikal bebas (Widowati, 2018).

## **2.2 Tinjauan tentang bakteri *Coliform***

### **2.2.1 Definisi bakteri *Coliform***

Bakteri *coliform* merupakan flora normal didalam usus manusia dan akan menimbulkan penyakit bila masuk kedalam organ atau jaringan lain, seperti pneumonia, endocarditis, infeksi pada luka, abses pada berbagai organ, meningitis dan dapat menyebabkan penyakit diare. Penyebaran bakteri ini pada makanan dapat melalui pencemaran air ataupun dari lingkungan. Bakteri ini secara relatif mudah dibunuh dengan pemanasan yaitu akan mati pada suhu 60°C selama 30 menit (Falamy dkk, 2013).

Bakteri ini mudah menyebar dengan cara mencemari air dan mengontaminasi bahan-bahan yang bersentuhan dengannya. Jika didapatkan kontaminasi bakteri ini pada suatu makanan maka merupakan suatu indikasi bahwa makanan tersebut pernah tercemar oleh kotoran manusia (Falamy dkk, 2013).

Kelompok bakteri golongan *Coliform* antara lain *Escherechia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, dan *Enterobacter*. Beberapa sumber juga menambahkan *Serratia*, *Salmonella*, *Shigella* sebagai kelompok bakteri golongan *Coliform* (Astika, 2019).

### 2.2.2 Ciri-ciri bakteri *Coliform*

Bakteri *Coliform* dicirikan sebagai golongan bakteri aerob atau fakultatif aerobik, termasuk bakteri golongan gram negatif, berbentuk batang, tidak membentuk spora, mampu memfermentasi lactose yang menghasilkan asam dan gas pada suhu  $35 \pm 0.5$  °C dalam 48 jam. Gas yang dihasilkan dari terfermentasinya lactose yaitu gas CO<sub>2</sub>. Bakteri ini akan mati pada suhu 60 °C selama 30 menit (Surono dkk, 2018).

### 2.2.3 Jenis-jenis bakteri *Coliform*

Bakteri *Coliform* berdasarkan sifat dan asalnya di bagi menjadi dua yaitu *Coliform* fekal dan *Coliform* non fekal.

#### a. *Coliform* fekal

Bakteri *Coliform* yang termasuk bakteri *Coliform* fekal yaitu *Escheichia coli* dan *Citobacter*. Bakteri tersebut merupakan bakteri yang berasal dari manusia dan hewan. *Coliform* fekal adalah bakteri fakultatif anaerob berbentuk batang, gram negative, dan non-sporulasi. *Coliform* fekal mampu tumbuh dan menghasilkan asam dan gas dari laktosa dalam waktu 48 jam di suhu  $44 \pm 0,5$  °C. *Coliform* fekal seperti bakteri lainnya, bias dapat dihambat pertumbuhannya dengan air mendidih atau dengan memperlakukan dengan klorin.

#### b. *Coliform* non fekal

Bakteri *Coliform* yang termasuk bakteri *Coliform* non fekal yaitu *Klebsiella*, *Enterobacter aerogens*, *Edwardsiella*, *Serratia*, dan *Paracolon*. Biasanya bakteri tersebut ditemukan pada hewan atau tanaman yang telah mati. Jenis mikroorganisme ini sering dijumpai pada alat-alat pencernaan hewan,

baik yang sudah ditenakkan atau yang masih liar. Tempat diperolehnya jenis organisme yang terbanyak yang sehubungan dengan suplay bahan pangan manusia adalah sapi, domba, babi, dan ayam (Astika, 2019).

#### **2.2.4 Higienis dan Sanitasi**

Selama proses produksi dan konsumsi, pangan akan bersentuhan dengan berbagai orang yang menangani pangan, termasuk dengan orang yang bekerja di pertanian, petugas penanganan pangan di restoran, toko, supermarket, dan di rumah. Manusia dapat menjadi sumber kontaminasi mikroorganisme patogen yang selanjutnya menyebabkan penyakit bawaan pangan, khususnya pada pangan siap santap. Tangan dan pakaian yang tidak bersih, serta rambut dapat menjadi sumber utama kontaminasi mikroba pada pangan. Luka ringan dan infeksi pada tangan atau bagian tubuh, serta penyakit yang umum seperti flu, radang tenggorokan, atau stadium awal hepatitis dapat meningkatkan kontaminasi mikroba. Pelatihan yang tepat mengenai higienis, pemeriksaan kesehatan, dan pemeliharaan sanitasi, serta penggunaan standar etika diperlukan untuk mereduksi kontaminasi yang berasal dari manusia (Wardah, 2014).

Ditinjau dari ilmu kesehatan lingkungan, istilah higienis dan sanitasi mempunyai tujuan yang sama erat kaitannya antara satu dengan yang lainnya yaitu melindungi, memelihara, dan mempertinggi derajat kesehatan manusia (individu maupun masyarakat). Tetapi dalam penerapannya, istilah higienis dan sanitasi memiliki perbedaan yaitu higienis lebih mengarahkan aktivitasnya kepada manusia, sedangkan sanitasi lebih menitikberatkan pada faktor-faktor lingkungan hidup.

Higienis adalah upaya kesehatan dengan cara memelihara dan melindungi kebersihan individu subjeknya. Misalnya mencuci tangan untuk melindungi kebersihan tangan, mencuci piring untuk melindungi kebersihan piring. Membuang bagian makanan yang rusak untuk melindungi keutuhan makanan secara keseluruhan. Untuk mencegah kontaminasi makanan dengan zat-zat yang dapat mengakibatkan gangguan kesehatan diperlukan penerapan sanitasi lingkungan.

Kata sanitasi diambil dari bahasa latin sanitas, yang artinya kesehatan. Kata ini digunakan lebih jauh untuk industri makanan, sanitasi adalah sebuah ciptaan dan pemeliharaan untuk kebersihan dan kondisi yang sehat. Sanitasi merupakan suatu usaha pencegahan penyakit yang menitik beratkan kegiatan pada usaha kesehatan lingkungan. Hal ini berguna untuk mencegah terjadinya pencemaran makanan dan racun yang disebabkan oleh zat aditif. Pelaksanaan sanitasi ini sangat penting untuk menjaga keamanan makanan (Marsanti, 2018).

## **2.3 Tinjauan tentang Most Probable Number (MPN)**

### **2.3.1 Definisi Most Probable Number**

Pemeriksaan adanya bakteri *Coliform* dapat dilakukan dengan menggunakan metode Most Probable Number (MPN). MPN *Coliform* adalah suatu metode penentuan angka mikroorganisme dengan metode Angka Paling Mungkin yang digunakan luas di lingkungan sanitasi untuk menentukan jumlah koloni *Coliform* di dalam air, susu dan makanan lainnya. Metode MPN dapat digunakan untuk menghitung jumlah bakteri yang dapat memfermentasi laktosa gas, misalkan bakteri *Coliform*.

Pengujian menggunakan metode MPN terdiri atas dua cara, yaitu menggunakan deretan 3 tabung dan deretan 5 tabungreaksi. Lebih banyak tabung yang digunakan menunjukkan ketelitian dan kepekaan yang lebih tinggi, tetapi alat gelas yang digunakan juga lebih banyak. Namun pada prinsipnya cara penentuan menggunakan deretan 5 tabung sama dengan menggunakan deretan 3 tabung.

Pengujian MPN dilakukan dengan sampel cair, apabila sampel yang akan digunakan berbentuk padatan maka sampel tersebut harus dibuat cair (suspensi) lebih dahulu dengan perbandingan 1:10 (Yusmaniar dkk, 2017).

### **2.3.2 Tahap uji Most Probable Number**

Tahapan uji *Coliform* secara lengkap terdiri dari tiga tahap, yaitu:

#### **1. Uji Penduga**

Uji pendugaan merupakan uji spesifik untuk deteksi bakteri *Coliform*. Sampel yang dicurigai mengandung *Coliform* dimasukkan ke dalam media *lactose broth* dalam tabung yang sudah diberi tabung durham untuk indikator pembentukan gas. Bakteri *Coliform* mampu menggunakan laktosa sebagai sumber karbon. Tabung yang berisi *lactose broth* ini diinokulasi dengan sampel sebanyak 10 ml, 1 ml, dan 0,1 ml. Terbentuknya gas pada tabung menunjukkan hasil uji pendugaan yang positif (Lestari arsanti dkk, 2018).

#### **2. Uji Penegasan**

Uji penegasan dilakukan dengan memindahkan sebanyak 1 ose biakan dari tabung yang membentuk gas pada media *lactose broth* ke dalam tabung yang berisi 10 ml *Brilliant Green Lactose Bile broth*. Semua

tabung diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Gas yang terbentuk pada tabung durham dalam media BGLB memperkuat bukti adanya bakteri *Coliform*.

### 3. Uji Pelengkap

Uji pelengkap dilakukan untuk mengidentifikasi jenis bakteri *Coliform* dalam sampel yang menunjukkan tabung positif pada uji penegasan. Tabung yang menunjukkan hasil positif diambil 1 ose biakan dan digoreskan di atas media *Eosin Methylene Blue* (EMB) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C. Jika hasil uji pelengkap menunjukkan terbentuknya koloni hijau metalik pada media EMB, hasil tersebut menyatakan bahwa terdapat bakteri *Escherichia coli* pada sampel. Jika hasil uji pelengkap menunjukkan terbentuknya koloni berwarna merah tanpa kilap hijau metalik, hasil tersebut menyatakan bahwa bakteri *Coliform* yang terkandung dalam sampel bukan *Escherichia coli* tetapi kemungkinan jenis lain dari bakteri *Coliform* (Yusminar dkk, 2017).

### 2.3.3 Tujuan uji Most Probable Number

1. Untuk mengetahui jumlah koloni pada sampel makanan dan minuman
2. Untuk mengetahui cara atau teknik isolasi dan identifikasi bakteri pada makanan dan minuman
3. Untuk mengidentifikasi bakteri yang terdapat pada sampel makanan dan minuman (Soedjoto dkk, 2019).

### 2.3.4 Prinsip uji Most Probable Number

Prinsipnya adalah menghitung jumlah tabung yang positif yang ditumbuhi oleh mikroba setelah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu. Tabung pada pengujian MPN dinyatakan positif apabila timbul kekeruhan dan atau terbentuknya gas di dalam tabung Durham (Yusmaniar dkk, 2017).

### 2.3.5 Kriteria cemaran Most Probable Number

**Table 2.4** kriteria cemaran Most Probable Number

No.	Jenis minuman	Parameter uji	Batas maksimum
1	Air minum dalam kemasan	MPN <i>Coliform</i>	<2/100 ml
2	Sari buah dan sari sayuran		$2 \times 10^1$ koloni /ml
3	Minuman berkarbonat		1/100 ml
4	Minuman isotonic		1/100 ml
5	Sirup		20/ ml
6	Serbuk minuman		<3/g
7	Minuman squash		20/ ml
8	Minuman tidak berkarbonat berperisa		20/ ml
9	Teh kering dalam kemasan		<3/ g
10	Minuman teh dalam kemasan		<2/100 ml
11	Kopi campur		20/ g
12	Minuman kopi dalam kemasan		<2/100 ml

(sumber: Akib thamrin, 2009).