

KETAHANAN PANAS CEMARAN *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* dan BAKTERI PEMBENTUK SPORA YANG DIISOLASI DARI PROSES PEMBUATAN TAHU DI SUDAGARAN YOGYAKARTA

Heat Resistance of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and Spore Forming Bacteria Contamination Isolated from Tofu Production at Sudagaran Yogyakarta

Reny Mailia¹, Bara Yudhistira¹, Yudi Pranoto², Saiful Rochdyanto³,
Endang Sutriswati Rahayu²

¹Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian,
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Jl. Flora No. 1, Bulaksumur, Yogyakarta 55281

²Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta,
Jl. Flora No. 1, Bulaksumur, Yogyakarta 55281

³Jurusan Teknik Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta,
Jl. Flora No. 1, Bulaksumur, Yogyakarta 55281

Email: endangsrhayu@ugm.ac.id, endangsrhayu@yahoo.com

ABSTRAK

Karakteristik tahu dengan a_w 0,89-0,90 dan kadar protein 8% atau lebih, menjadikan tahu sebagai media yang cocok bagi pertumbuhan bakteri. Hal ini menyebabkan tahu menjadi sangat mudah rusak karena cemaran bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat cemaran *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* dan Bakteri pembentuk spora pada proses pembuatan tahu dan mempelajari sifat ketahanan panas dari masing-masing cemaran. Tahapan penelitian dimulai dari pengamatan proses pembuatan tahu, isolasi dan identifikasi dan analisa kuantitatif cemaran *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* dan bakteri pembentuk spora pada proses pembuatan tahu. Isolat yang berasal dari proses pemasakan dan proses penggumpalan digunakan untuk pengujian ketahanan panas dengan melihat nilai D dan Z menggunakan regresi linier. *Escherichia coli* ditemukan pada air, kedelai, bubur kedelai, gumpalan tahu dan tahu, dengan jumlah 10^1 - 10^2 CFU/g. Isolat *Escherichia coli* dari proses penggumpalan (GMP), nilai $D_{60^\circ\text{C}}=4,83$ menit dan nilai $Z=22,73^\circ\text{C}$. *Staphylococcus aureus* ditemukan pada kedelai, gumpalan tahu dan tahu, dengan jumlah 10^1 CFU/g. Isolat *Staphylococcus aureus* GMP 4, memiliki nilai $D_{60^\circ\text{C}}=2,72$ menit dan nilai $Z=18,87^\circ\text{C}$. Untuk isolat *Staphylococcus aureus* GMP 6, nilai $D_{60^\circ\text{C}}=2,54$ menit dan nilai $Z=18,18^\circ\text{C}$. *Bacillus cereus* ditemukan pada air, kedelai, bubur kedelai, sari kedelai masak, gumpalan tahu dan tahu, dengan jumlah 10^2 - 10^3 CFU/g. Sel vegetatif *Bacillus cereus* yang berasal dari sari kedelai (SK) 2, memiliki nilai $D_{60^\circ\text{C}}=5,43$ menit dan nilai $Z=22,72^\circ\text{C}$. Untuk sel vegetatif *Bacillus cereus* SK 4, memiliki nilai $D_{60^\circ\text{C}}=5,95$ menit dan nilai $Z=22,22^\circ\text{C}$. Bakteri pembentuk spora ditemukan pada air, kedelai, bubur kedelai pada proses penggilingan, sari kedelai masak, gumpalan tahu, kecutan dan tahu, dengan jumlah 10^2 CFU/g.

Kata kunci: Tahu, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, bakteri pembentuk spora, ketahanan panas

ABSTRACT

Characteristics of tofu with higher a_w (0.89 to 0.90) and protein levels of 8% or more, made tofu to be a suitable medium for bacterial growth. This leads to out to be very easy to damage due to bacterial contamination. Contamination of bacteria is commonly found in the tofu because of contamination in the process making of tofu. Source of contamination can come out from the raw material, during the process of making tofu and hygienic sanitation level during processing. Generally, this study aimed to determine the level of contamination of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and spore-forming bacteria in the process of making tofu and study the properties of heat resistance of each isolate. Phases of of the study started with the isolation and identification and then quantitative analysis of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and spore-forming bacteria in the tofu process from raw materials to end

product, tofu, comprised from water and soybean, slurry, soymilk cooking, curd, whey and tofu. Isolates originating from the cooking process and the coagulation process was for testing the heat resistance (D value and Z value). D and Z values were calculated using linear regression. *Escherichia coli* found in the water, soybeans, soybean slurry, curd and tofu, the number 10^1 - 10^2 CFU/g. *Escherichia coli* GMP isolate had $D_{60^\circ\text{C}}=4,83$ min and the value of $Z = 22.73^\circ\text{C}$. *Staphylococcus aureus* found in soybeans and curd, showed the number of 10^1 CFU/g. The *Staphylococcus aureus* GMP 4 isolate, had $D_{60^\circ\text{C}}=2.72$ min and the value of $Z = 18.87^\circ\text{C}$. The *Staphylococcus aureus* GMP 6 isolate, had $D_{60^\circ\text{C}}=2.54$ min and the value of $Z = 18.18^\circ\text{C}$. *Bacillus cereus* found in the water, soybean, soybean slurry, soymilk cooking, curd and tofu, showed the number 10^2 - 10^3 CFU/g. *Bacillus cereus* vegetative cells SK 2 had $D_{60^\circ\text{C}}=5.43$ min and the value of $Z = 22.72^\circ\text{C}$. *Bacillus cereus* vegetative cells SK 4 had $D_{60^\circ\text{C}}=5.95$ min and the value of $Z = 22.22^\circ\text{C}$. Spore-forming bacteria found in water, soybean, soybean slurry from the grinding process, the process cooking of soymilk, the process of clotting, whey and tofu, showed the number of 10^2 CFU/g.

Keywords: Tofu, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, a spore forming bacteria, heat resistance

PENDAHULUAN

Tahu dengan kandungan protein sekitar 8% atau lebih dan a_w 0,89-0,99, menyebabkan tahu menjadi media yang cocok untuk tumbuhnya mikroba. Tingkat populasi bakteri yang tinggi akan menyebabkan perubahan mutu tahu karena metabolit yang dihasilkan selama pertumbuhan bakteri. Sumber cemaran bakteri pada tahu dapat melalui bahan baku yaitu kedelai atau air, juga lingkungan produksi dan pekerja. Tanah dan air merupakan habitat bakteri diantaranya *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus cereus* dan bakteri pembentuk spora. *Staphylococcus aureus* juga ditemukan di dalam saluran pernapasan, permukaan kulit dan rambut (Baird-Parker, 2000). *Bacillus cereus* dapat ditemukan pada berbagai jenis pangan, seperti beras, kentang dan pasta, daging dan hasil olahannya, susu dan hasil olahan susu, biji-bijian, bumbu, sayuran dan juga pada kacang-kacangan kering (Rajkovic dkk., 2013).

Beberapa hasil penelitian yang telah dipublikasikan menemukan bakteri *Enterobacteriaceae*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* (Ashraf dkk. dalam Han, 2004); *Enterobacteriaceae*, *Salmonella*, *Escherichia coli* dan *Yersinia enterocolitica* (Kooij dkk., 1985) pada tahu. Cemaran bakteri yang dipersyaratkan pada tahu, berdasarkan Standar Nasional Indonesia Nomor 01-3142-1998 adalah *Escherichia coli* (maksimum 10^3 /g) dan *Salmonella* (Negatif/25g). *Guidelines for The Assessment of Microbiological Quality of Processed Foods* yang dikeluarkan oleh *Food and Drug Administration Philippines* tahun 2013, menetapkan kualitas tahu untuk *Escherichia coli* adalah < 10 CFU/g, *Staphylococcus aureus* koagulase positif 10^2 CFU/g dan *Bacillus cereus* 10^2 CFU/g.

Proses pembuatan tahu juga melibatkan proses termal didalamnya yaitu pada proses pemasakan sari kedelai dan proses penggumpalan protein. Proses termal dalam pengolahan pangan dimaksudkan untuk menghilangkan atau mengurangi aktivitas biologis yang tidak diinginkan yang terjadi di

dalam bahan pangan, seperti aktivitas mikroorganisme. Ada beberapa bakteri yang dapat bertahan selama proses tersebut.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui total bakteri terutama *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* dan bakteri pembentuk spora lain dari proses pembuatan tahu. Tujuan berikutnya adalah mempelajari sifat ketahanan terhadap panas dari *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* dan bakteri pembentuk spora lain yang di isolasi dari proses pembuatan tahu.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Titik Pengambilan Sampel

Bahan yang digunakan adalah sampel pada alur proses pembuatan tahu pada industri rumah tangga Bapak Budiyono Jalan Sudagaran TR 3/1027 RT 38 RW 10 Tegalrejo. Sampel berupa air, kedelai, bubur kedelai hasil dari proses penggilingan, sari kedelai pada proses pemasakan, gumpalan tahu, kecutan dan tahu. Pengamatan pada alur proses pembuatan tahu mulai dari bahan baku hingga proses akhir. Pengamatan dilakukan untuk melihat titik kritis yang akan menentukan kualitas produk akhir. Baku bakteri yang digunakan adalah *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Bacillus cereus mycoides* ATCC 9632 yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.

Analisis Mikrobiologi

Enumerasi, isolasi dan identifikasi. Sampel dilakukan enumerasi total cemaran bakteri, total *coliform* dan *Escherichia coli*, total *Staphylococcus sp* dan total *Staphylococcus aureus*, total *Bacillus sp* dan total *Bacillus cereus* serta total bakteri pembentuk spora. Selanjutnya dilakukan isolasi dan identifikasi dengan uji biokimia dan

pengecatan gram atau pengecatan spora untuk pengamatan sifat-sifat biokimia dan morfologi. Media yang digunakan untuk uji enumerasi menggunakan media Plate Count Agar (PCA), Brilliance E.coli/Coliform Selective medium, Baird Pepton Agar Base (BPA), Bacillus Cereus Agar Base (BCA).

Uji ketahanan panas (nilai D dan Z) masing-masing isolat. Nilai D dan Z yang menggambarkan ketahanan panas dari bakteri akan berbeda untuk masing-masing bakteri. Semakin besar nilai D menunjukkan bahwa bakteri tersebut tahan terhadap panas pada suhu tertentu. Nilai Z adalah suhu yang diperlukan untuk menurunkan atau meningkatkan 1 siklus log nilai D. Semakin besar nilai Z berarti mikroba tersebut daya tahannya akibat perubahan suhu sangat besar dan sebaliknya jika nilai Z kecil maka mikroba sangat peka terhadap perubahan panas. Nilai Z diperoleh dengan rumus : $Nilai\ Z = 1/slope$.

Persiapan suspensi inokulum. Isolat yang digunakan adalah isolat bakteri yang masih dapat bertahan pada proses pemasakan pada suhu 93-98°C selama 15-30 menit dan pada proses penggumpalan dengan suhu 63-65°C selama 30 menit. Bakteri yang teridentifikasi sama dengan baku bakteri, diinokulasikan di atas permukaan agar miring, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Isolat ini digunakan sebagai inokulum untuk menguji ketahanan panas (nilai D dan Z). Isolat *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus cereus* diambil satu ose dan diinokulasikan kedalam 30 ml media Brain Heart Infusion Broth (BHIB), diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Masing-masing isolat bakteri dihitung dengan cara *total plate count*. Jumlah bakteri yang ditambahkan bakteri sebanyak 10^6 - 10^7 CFU/ml dalam 100 ml pada sari kedelai sebagai media pemanasan.

Persiapan medium pemanas. Sejumlah labu Erlenmeyer diisi dengan 100 ml sari kedelai, kemudian disterilisasi pada suhu 115°C selama 10 menit di autoklaf. Sari kedelai dicemari bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan sel vegetatif *Bacillus cereus* dengan konsentrasi cemaran 10^7 CFU/ml dalam 100 ml sari kedelai.

Ketahanan panas isolat. Masukkan labu Erlenmeyer kontrol kedalam penangas air dengan suhu tertentu. Pengukuran suhu bagian dalam sari kedelai dilakukan dengan memakai termometer yang dicelupkan kedalam tabung kontrol, sehingga tercapai suhu bagian dalam sari kedelai yang konstan sesuai dengan suhu percobaan. Selanjutnya sari kedelai yang telah dicemari dimasukkan ke dalam penangas air dengan suhu percobaan sampai waktu yang ditentukan, setelah waktu pemanasan tercapai, labu segera diangkat dan didinginkan dengan air dingin hingga tercapai suhu kamar.

Selanjutnya lakukan penghitungan total plate count. Suhu dan waktu yang digunakan pada pengujian ketahanan panas untuk isolat *Escherichia coli* dan *Bacillus cereus* 55,60,65,70,75°C dengan interval waktu 10 detik hingga 30 menit. Isolat *Staphylococcus aureus* 58,60,62,66,68°C; interval waktu 10 detik hingga 20 menit.

Perhitungan nilai D dan Z. Nilai D ditentukan dengan menempatkan titik-titik setiap penurunan $1\ log_{10}$ dari mikroba yang mampu bertahan pada suhu dan waktu tertentu. Nilai D ditetapkan dengan rumus regresi liner: $y = a + bx$. Nilai Z diperoleh dengan memploting nilai D yang diperoleh pada waktu tertentu, ditetapkan dengan rumus $Nilai\ Z = -1/slope$. Analisis kuantitatif dilakukan dengan *MS-excell software*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses Pembuatan Tahu

Dari hasil pengamatan di lapangan, proses pembuatan tahu di pabrik tahu Budiyono meliputi perendaman, pencucian, penggilingan, pemasakan sari kedelai, pemisahan sari kedelai dari padatan, penggumpalan dengan penambahan kecutan, pencetakan, pemotongan dan penyimpanan. Perendaman dilakukan pada suhu 28-30°C selama 6-8 jam. Perendaman yang terlalu lama akan menurunkan kadar protein dan penurunan pH.

Proses pemasakan bubur kedelai berlangsung selama 15-30 menit dengan suhu sekitar 93-98°C. Air juga ditambahkan selama proses pemasakan untuk menghasilkan ekstrak protein yang optimum dan untuk mempermudah ekstraksi protein. Pemasakan juga berfungsi untuk menginaktivkan tripsin inhibitor. Penyaringan bertujuan untuk menghilangkan partikel-partikel kedelai yang menyumbat kain saring serta untuk mengekstraksi protein dan padatan lain yang masih tertinggal pada ampas tahu.

Penggumpalan dilakukan dengan penambahan kecutan ke dalam sari kedelai sambil diaduk pelan-pelan sampai terbentuk *curd*. Kecutan merupakan larutan yang telah difermentasi selama satu malam. Penggumpalan pada suhu antara 63°-65°C dan selama 30 menit. pH kecutan yang digunakan berkisar pada 3,6-3,8 dengan suhu kecutan antara 28-38°C. Gumpalan, atau *curd* yang terbentuk kemudian dicetak menggunakan pencetak kayu.

Populasi Bakteri

Titik pengambilan sampel pada penelitian ini adalah pada kedelai, air, proses penggilingan berupa bubur kedelai, pemasakan sari kedelai, kecutan, gumpalan tahu dan tahu. Hasil perhitungan rata-rata total populasi bakteri pada titik-titik pengambilan sampel pada proses pembuatan tahu disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Populasi rata-rata bakteri pada alur proses pembuatan tahu

Sampel	TPC (CFU/g)	Total Coliform (CFU/g)	Total <i>E.coli</i> (CFU/g)	Total <i>Staph</i> (CFU/g)	Total <i>S.aureus</i> (CFU/g)	Total <i>Bacillus</i> (CFU/g)	Total <i>B.cereus</i> (CFU/g)	Bakteri pembentuk spora (CFU/g)
Air	1,0x10 ⁵	1,5x10 ³	3,6x10 ²	1,8x10 ²	< 10	1,8x10 ³	1,5x10 ²	3,2x10 ²
Kedelai	1,4x10 ⁴	1,1x10 ³	1,1x10 ²	2,6x10 ²	1,2x10 ¹	1,2x10 ³	6,3x10 ²	8,7x10 ²
Bubur kedelai	9,2x10 ³	8,1x10 ³	2,1x10 ²	5,2x10 ²	1,9x10 ¹	3,1x10 ³	8,8x10 ²	9,0x10 ²
Sari kedelai yang dimasak	1,4x10 ³	< 20	< 20	8,7x10 ¹	< 10	1,2x10 ³	4,7x10 ²	8,7x10 ²
Gumpalan tahu	2,8x10 ³	2,0x10 ²	1,9x10 ¹	2,8x10 ²	2,1x10 ¹	1,7x10 ³	2,9x10 ²	9,0x10 ²
Kecutan	1,4x10 ⁵	1,2x10 ³	< 20	< 10	< 10	1,1x10 ³	< 100	3,1x10 ²
Tahu	1,3x10 ⁴	1,2x10 ²	3,0x10 ¹	2,3x10 ²	1,0x10 ¹	1,3x10 ³	1,6x10 ²	5,3x10 ²

Tabel 1 terlihat bahwa pada sampel air, kedelai dan bubur kedelai terdapat pertumbuhan semua bakteri yang dianalisis. Pada tiga titik pengambilan sampel ini diperoleh total coliform dan total *Bacillus* lebih tinggi dibanding bakteri lain. Suhu kondisi ini berkisar 28-30°C atau suhu kamar sehingga berbagai jenis bakteri dapat ditemukan. Tanah dan air merupakan habitat yang umum untuk berbagai jenis bakteri termasuk *Escherichia coli*, *Staphylococcus* dan *Bacillus cereus* dan bakteri pembentuk spora, sehingga bakteri ini mempunyai peluang besar untuk mencemari makanan selama proses pembuatannya.

Pemilihan kedelai sebagai bahan baku tahu menurut SNI 01-3922-1995 syarat mutu kedelai, kedelai yang baik untuk diolah menjadi tahu adalah kedelai yang sudah cukup tua, tidak bercampur dengan benda asing, berukuran seragam, utuh, tidak berjamur, dan tidak berbau, serta berwarna normal (Rahayu dkk., 2012).

Penurunan total populasi bakteri pada proses pemasakan dibandingkan proses sebelumnya sekitar 2 log cycle. Bakteri yang dapat bertahan pada proses dengan suhu 93-98°C selama 15-30 menit adalah bakteri yang tahan terhadap panas dan bakteri pembentuk spora. Pada proses ini *Staphylococcus* dan *Bacillus* masih dapat bertahan karena *Staphylococcus* memiliki beberapa galur yang tahan terhadap panas terutama pada pangan dengan aktivitas air yang tinggi. *Bacillus cereus* akan membentuk spora untuk melindungi dirinya, dan spora ini akan bergerminasi membentuk sel vegetatif (Granum dkk., 2000).

Air yang digunakan total populasi bakteri hingga 10⁵ CFU/g dapat mencemari sari kedelai yang telah dimasak, sehingga bakteri yang mampu bertahan pada suhu pemasakan ini dapat tumbuh kembali. Penambahan air menyebabkan penurunan suhu dan memberikan kesempatan pada bakteri untuk berkembang biak. Suhu pada proses penggumpalan lebih rendah dibanding suhu pemasakan yaitu berkisar

antara 63°C – 65°C selama 30 menit, sehingga beberapa bakteri masih dapat bertahan hidup seperti *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan sel vegetatif *Bacillus cereus*. Air yang digunakan untuk produksi pangan harus memenuhi persyaratan sebagai air bersih.

Total populasi bakteri pada kecutan 1,4 x 10⁵ CFU/g. Hasil ini hampir sama dengan hasil penelitian yang pernah dilaporkan oleh Rahayu, dkk. 2012, pada whey dengan volume 40 liter sekitar 10⁶ CFU/g. pH kecutan berkisar pada rentang 3,6 – 3,8 dengan suhu berkisar 28°C. Saat disimpan selama semalam, akan terbentuk asam-asam organik oleh aktivitas mikroorganisme yang ada di dalam kecutan. suhu Whey akan turun perlahan-lahan hingga mencapai 30°C setelah 14-15 jam. *Bacillus*, coliform dan bakteri pembentuk spora juga ditemukan pada kecutan dengan jumlah hingga mencapai 10³ CFU/g. Bakteri patogen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus cereus* tidak ditemukan pada kecutan.

Tahu yang diuji adalah tahu yang segera setelah selesai diproduksi dan belum mengalami penyimpanan. Berdasarkan *Guidelines for The Assessment of Microbiological Quality of Processed Foods* yang dikeluarkan oleh *Food and Drug Administration Philippines* tahun 2013 menetapkan kualitas tahu untuk *Escherichia coli* adalah < 10 CFU/g, *Staphylococcus aureus* koagulase positif 10² CFU/g dan *Bacillus cereus* 10² CFU/g. Tahu yang diproduksi oleh pabrik tahu Budiyo memiliki total rata-rata populasi *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* koagulase positif dan *Bacillus cereus* adalah 3,0x10¹ CFU/g; 1,0 x 10¹ CFU/g dan 1,6 x 10² CFU/g secara berurutan. Hasil tersebut untuk *Escherichia coli* dan *Bacillus cereus* melebihi yang dipersyaratkan.

Karakteristik spora yang mampu dan dapat bertahan dalam menghadapi kondisi lingkungannya, misalnya ketahanan terhadap panas, asam, kadar garam, dan sebagainya membuat spora sulit untuk dihilangkan. Dibutuhkan suhu yang lebih tinggi untuk membunuh spora bakteri biasanya diatas 100°C.

Isolasi dan Identifikasi

Isolat hasil pengujian kuantitatif dilakukan identifikasi dengan pengamatan morfologi dan sifat-sifat biokimia. Pada tahapan ini digunakan bakteri referensi sebagai pembanding, bakteri referensi yang digunakan adalah *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Bacillus cereus mycoides* ATCC 9632. Juga berdasarkan referensi *Bacteriological Analytical Manual*.

Escherichia coli

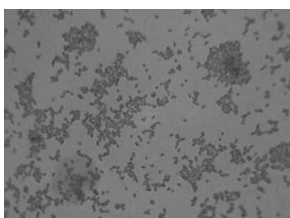
Empat isolat *Escherichia coli* yang diisolasi dari proses penggumpalan dilakukan uji biokimia dan peroleh hasil fermentasi glukosa positif, fermentasi manitol positif, Nitrat broth positif, Sulfur negatif, indol positif, motil positif, merah metil positif, voges prokuer negatif. Pengamatan mikroskop dengan pewarnaan gram berbentuk batang pendek, gram negatif. Hanya dua isolat yang hasilnya sesuai dengan bakteri referensi dan *Bacteriological Analytical Manual*. Isolat ini diidentifikasi sebagai *Escherichia coli* dengan kode *Escherichia coli* GMP (dapat dilihat pada Gambar 1).

Staphylococcus aureus

Enam isolat *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari proses penggumpalan dilakukan uji biokimia dan peroleh hasil fermentasi glukosa positif, fermentasi manitol positif, Sulfur negatif, indol negatif, motil negatif, uji koagulase plasma darah positif. Hanya 4 isolat yang hasil ini sesuai dengan bakteri referensi dan *Bacteriological Analytical Manual*. Isolat ini diidentifikasi sebagai *Staphylococcus aureus* dengan kode *Staphylococcus aureus* GMP (dapat dilihat pada Gambar 2).

Sel Vegetatif *Bacillus cereus*

Enam isolat *Bacillus cereus* yang diisolasi dari proses pemasakan sari kedelai dilakukan uji biokimia dan peroleh hasil fermentasi glukosa positif, fermentasi manitol negatif, Sulfur negatif, indol positif, motil negatif, Nitrat broth negatif, voges prokuer positif. Pengamatan mikroskop dengan pewarnaan spora menunjukkan isolat berbentuk batang berwarna merah dengan letak spora ditengah-tengah atau subterminal dan berwarna hijau. Hanya empat isolat yang

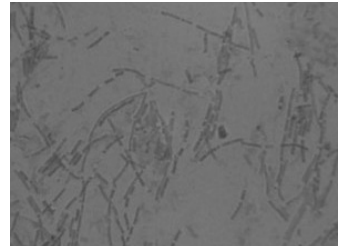


Gambar 1. Isolat *Escherichia coli*



Gambar 2. Koagulase positif Isolat *Staphylococcus aureus*

hasil ini sesuai dengan bakteri referensi dan *Bacteriological Analytical Manual*. Isolat ini diidentifikasi sebagai *Bacillus cereus* dengan kode *Bacillus cereus* SK (dapat dilihat pada Gambar 3).



Gambar 3. Isolat *Bacillus cereus*

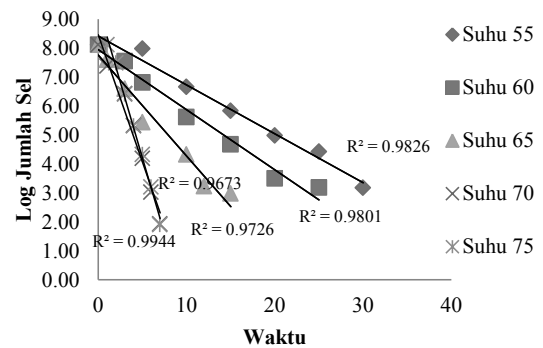
Kurva Kecepatan Kematian

Isolat *Escherichia coli* GMP. Untuk isolat *Escherichia coli* GMP, diperoleh nilai $D_{60^{\circ}C}=4,83$ menit dan nilai $Z=22,72^{\circ}C$.

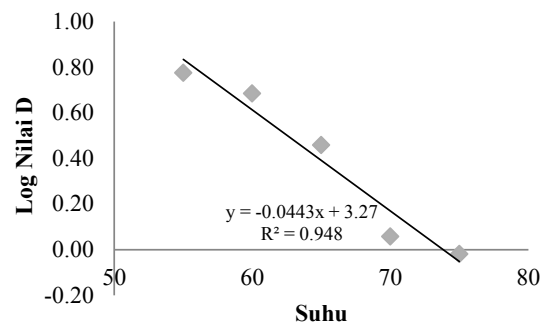
Tabel 2. Nilai D dan Z *Escherichia coli* GMP

Isolat	Sumber	Nilai D (menit)					Nilai Z (°C)
		55°C	60°C	65°C	70°C	75°C	
<i>E.coli</i>	Proses	5,95	4,83	2,87	1,14	0,96	22,72 (r ²
GMP	penggumpalan						=0,95)

Pada Gambar 4 dan 5 dapat dilihat kurva nilai D dan kurva kecepatan kematian isolat *Escherichia coli*.



Gambar 4. Kurva Nilai D *E.coli* GMP



Gambar 5. Kurva TDT *E.coli* GMP

Nilai *Z Escherichia coli* pada penelitian ini sama dengan penelitian Martin dkk. (2006) yang mengukur profil termal inaktivasi *Escherichia coli* pada susu kambing, hasil penelitian diperoleh nilai $D_{63^{\circ}\text{C}}=3,9$ menit; $D_{65^{\circ}\text{C}}=3,5$ menit; $D_{67^{\circ}\text{C}}=2,8$ menit dan $D_{75^{\circ}\text{C}}=1,5$ menit dengan nilai $Z=23,1^{\circ}\text{C}$. Penelitian yang pernah dilaporkan oleh Asselt dan Zwietering (2005) dimana nilai *Z* untuk *Escherichia coli* dalam berbagai jenis produk $10,6^{\circ}\text{C}$. Rajkowski dkk, (2012) melaporkan *Escherichia coli* 0157 H:7 933, A9218-C1, 45753-35 pada produk ikan, nilai $D_{55^{\circ}\text{C}}=7,03$ menit, $D_{60^{\circ}\text{C}}=0,93$ menit dan $D_{65^{\circ}\text{C}}=4,2$ detik dengan Nilai $Z=4-6^{\circ}\text{C}$.

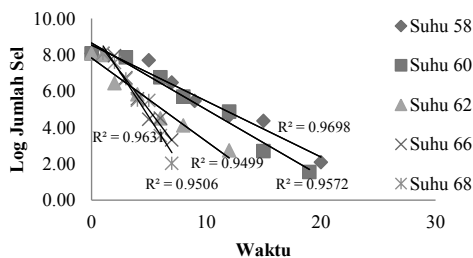
Isolat *Staphylococcus aureus*. Isolat *Staphylococcus aureus* GMP4 memiliki nilai $D_{60^{\circ}\text{C}}=2,72$ menit dan nilai $Z=18,87^{\circ}\text{C}$; sedangkan untuk Isolat *Staphylococcus aureus* GMP 6, nilai $D_{60^{\circ}\text{C}}=2,54$ menit dan nilai $Z=18,18^{\circ}\text{C}$.

Tabel 3. Nilai D dan Z *Staphylococcus aureus* GMP

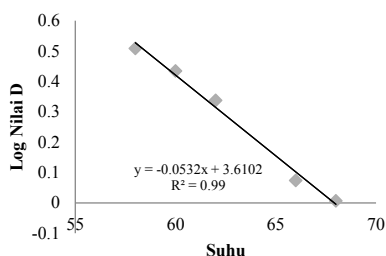
Isolat	Sumber	Nilai D (menit)					Nilai Z ($^{\circ}\text{C}$)
		58 $^{\circ}\text{C}$	60 $^{\circ}\text{C}$	62 $^{\circ}\text{C}$	66 $^{\circ}\text{C}$	68 $^{\circ}\text{C}$	
<i>S.aureus</i> GMP 4	Proses penggumpalan	3,23	2,72	2,17	1,18	1,01	18,87 ($r^2=0,99$)
<i>S.aureus</i> GMP 6	Proses penggumpalan	3,12	2,54	1,66	0,99	0,95	18,18 ($r^2=0,97$)

Isolat *Staphylococcus aureus* yang berasal dari sumber yang sama memiliki respon terhadap panas yang berbeda yang ditunjukkan dengan nilai *Z* yang diperoleh. Hasil penelitian yang dilaporkan oleh Sukasih dkk (2005) nilai *Z* bakteri gram positif pada puree mangga adalah $21,23^{\circ}\text{C}$.

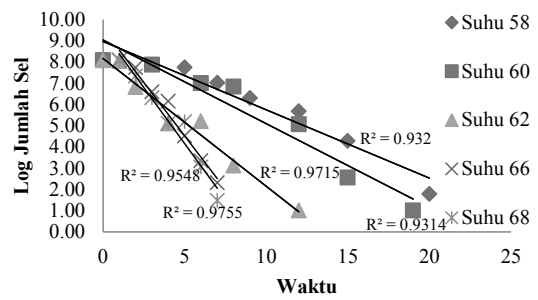
Pada Gambar 6-Gambar 9 dapat dilihat kurva nilai D dan kurva kecepatan kematian untuk masing-masing isolat.



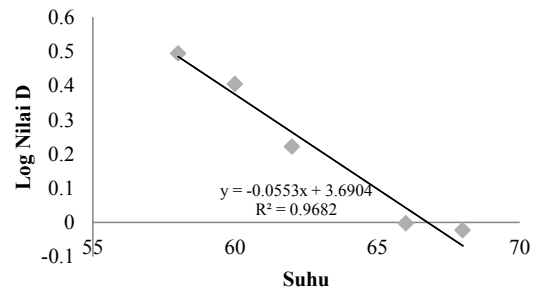
Gambar 6. Kurva nilai D *S. aureus* GMP4



Gambar 7. Kurva TDT *S. aureus* GMP4



Gambar 8. Kurva nilai D *S. aureus* GMP6



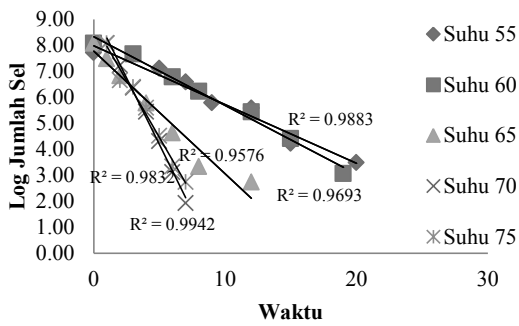
Gambar 9. Kurva TDT *S. aureus* GMP6

Isolat *Bacillus cereus*. Isolat *Bacillus cereus* SK 2, nilai $D_{60^{\circ}\text{C}}=5,43$ menit dan nilai $Z=22,72^{\circ}\text{C}$. Isolat *Bacillus cereus* SK 4, nilai $D_{60^{\circ}\text{C}}=5,95$ menit dan nilai $Z=22,22^{\circ}\text{C}$.

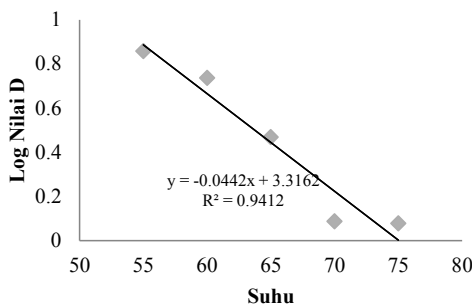
Tabel 4. Nilai D dan Z *Bacillus cereus* SK

Isolat	Sumber	Nilai D (menit)					Nilai Z ($^{\circ}\text{C}$)
		55 $^{\circ}\text{C}$	60 $^{\circ}\text{C}$	65 $^{\circ}\text{C}$	70 $^{\circ}\text{C}$	75 $^{\circ}\text{C}$	
<i>B.cereus</i> SK 2	Proses pemasakan sari kedelai	7,19	5,43	2,93	1,22	1,19	22,72 ($r^2=0,94$)
<i>B.cereus</i> SK 4	Proses pemasakan sari kedelai	6,76	5,95	3,52	1,29	1,05	22,22 ($r^2=0,93$)

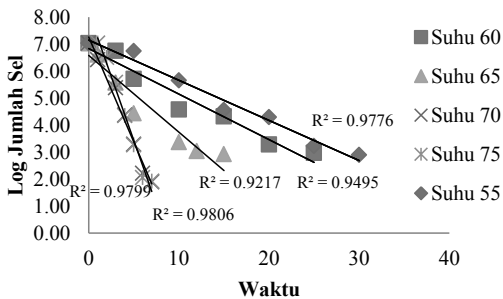
Isolat *Bacillus cereus* juga menunjukkan respon yang berbeda terhadap ketahanan panas. Nilai *Z* sel vegetatif *Bacillus cereus* pada penelitian ini hampir sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Desai dan Varadaraj (2010) nilai D untuk sel vegetatif *Bacillus cereus* CFR 1521 dan CFR 1532 pada susu berkisar antara 3,45 menit pada suhu 60°C dan 10,6 menit pada suhu 56°C dalam larutan salin. Nilai *Z* yang diperoleh $9,3^{\circ}\text{C}$ dalam larutan kultur dan nilai $Z=24^{\circ}\text{C}$ dalam susu. Pada Gambar 10- Gambar 13 dapat dilihat kurva nilai D dan kurva kecepatan kematian untuk masing-masing isolat *Bacillus cereus*.



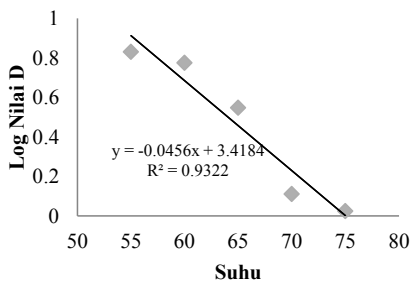
Gambar 10. Kurva nilai D *B.cereus* SK2



Gambar 11. Kurva TDT *B.cereus* SK2



Gambar 12. Kurva nilai D *B.cereus* SK4



Gambar 13. Kurva TDT *B.cereus* SK4

Rangkuman dari ketahanan panas (nilai D dan Z) dari masing-masing isolat yang diisolasi pada alur proses pembuatan tahu dan kondisi proses (Tabel 5).

Pada proses pemasakan untuk menginaktifkan *Bacillus cereus* SK membutuhkan suhu 82,22°C selama 0,595 menit. Pada kondisi proses seperti ini seharusnya *Bacillus cereus* SK dapat diinaktifkan. Rata-rata total populasi *Bacillus cereus* 4,7x10² CFU/g. Spora *Bacillus cereus* akan bergerminasi dan membentuk sel vegetatif jika sudah berada dalam kondisi yang optimum untuk pertumbuhannya. Air sumur dengan total rata-rata populasi *Bacillus cereus* 1,5x10² CFU/g dapat menjadi penyebab masih ditemukannya *Bacillus cereus*.

Pada proses penggumpalan, untuk menginaktifkan *Escherichia coli* GMP membutuhkan waktu 2,72 menit pada suhu 60°C, total rata-rata populasi 1,9x10¹ CFU/g. Menginaktifkan *Staphylococcus aureus* GMP membutuhkan waktu antara 2,54 hingga 2,72 menit pada suhu 60°C, total rata-rata populasi 2,1x10¹ CFU/g. Pada pabrik tahu Budiyo, sebelum proses penggumpalan juga ditambahkan air sumur.

Ketahanan panas bakteri dipengaruhi oleh komposisi pangan seperti jumlah karbohidrat, protein dan lemak, perbedaan strain, perbedaan faktor lingkungan seperti suhu pertumbuhan, media pertumbuhannya, paparan terhadap panas. Jumlah mikroba pada bahan juga mempengaruhi ketahanan mikroba terhadap panas (Bryne, 2006). Setiap bakteri akan mempunyai penyesuaian terhadap kondisi lingkungan dengan cara yang berbeda-beda, seperti pada saat nutrisi berkurang, penurunan pH atau pada kondisi dimana suhu menurun atau meningkat (Henge-Aronis, 2002 dalam Ouazzou dkk., 2012).

Komposisi dari media cair yang digunakan untuk pemanasan seperti jumlah karbohidrat, protein dan lemak juga mempengaruhi ketahanan panas dari bakteri. Komposisi pangan dan medium pemanasan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sari kedelai dari pabrik tahu Budiyo, kandungan sari kedelai berdasarkan uji proksimat yang dilakukan memiliki kadar protein, kadar lemak, kadar karbohidrat yang tinggi (data tidak dipublikasikan). Adanya lemak dalam media pemanasan akan meningkatkan ketahanan panas bakteri karena lemak dapat melindungi sel dari panas disamping itu lemak juga dapat melindungi spora dari kerusakan karena panas (Desai dan Varadaraj, 2010).

Perbedaan strain juga mempengaruhi ketahanan terhadap panas, hal ini dikarenakan strain menunjukkan asal isolat tersebut di isolasi. Masing-masing akan memiliki kondisi lingkungan yang berbeda-beda seperti suhu pertumbuhannya, media pertumbuhannya, penerimaan panas sebelumnya seperti *heat stress*. Pada penelitian ini isolat berasal dari kondisi lingkungan dengan suhu diatas suhu pertumbuhan bakteri tersebut, yaitu proses penggumpalan dengan suhu 63-65°C dan proses pemasakan dengan suhu 93-98°C, sehingga isolat yang masih dapat bertahan pada kondisi tersebut memiliki ketahanan panas lebih tinggi ditunjukkan dengan nilai D dan Z yang besar. Kenaikan suhu dapat

Tabel 5. Ketahanan panas isolat dan kondisi proses

Isolat	Sumber	Nilai D(menit)	Nilai Z(°C)	Kondisi proses
<i>Escherichia coli</i> GMP	Gumpalan tahu	D _{60°C} =4,83.	22,72	63-65°C selama 30 menit
<i>Staphylococcus aureus</i> GMP 4	Gumpalan tahu	D _{60°C} =2,72	18,87	63-65°C selama 30 menit
<i>Staphylococcus aureus</i> GMP 6	Gumpalan tahu	D _{60°C} =2,54	18,18	63-65°C selama 30 menit
<i>Bacillus cereus</i> SK 2	Sari kedelai masak	D _{60°C} =5,43	22,72	93-98°C selama 15-30 menit
<i>Bacillus cereus</i> SK 4	Sari kedelai masak	D _{60°C} =5,95	22,22	93-98°C selama 15-30 menit

menyebabkan bakteri meningkatkan toleransinya terhadap panas terutama pada bakteri yang menyebabkan kebusukan pada pangan dan bakteri patogen (Cebrian, dkk., 2009).

Semakin banyak jumlah mikroba pada bahan, maka suhu yang dibutuhkan lebih tinggi dengan waktu yang lebih lama untuk menurunkan jumlah mikroba tersebut. Pada penelitian ini menggunakan jumlah cemaran 1,0 x 10⁷ CFU/ml, jumlah ini cukup tinggi sehingga suhu dan waktu yang dibutuhkan lebih tinggi dan lama maka nilai D dan Z yang didapat juga lebih tinggi. Bakteri yang digunakan mempunyai termo toleran karena terbiasa tumbuh pada lingkungan dengan suhu yang tinggi.

KESIMPULAN

Perbedaan ketahanan panas untuk masing-masing isolat berbeda-beda ditunjukkan dengan nilai D dan Z walau diisolasi dari sumber yang sama dan juga berbeda dengan beberapa hasil penelitian yang telah dipublikasikan. Semakin besar nilai D menunjukkan bahwa bakteri tersebut tahan terhadap panas pada suhu tertentu. Semakin banyak jumlahnya maka waktu yang dibutuhkan untuk menginaktifkan bakteri tersebut akan semakin lama dan juga dibutuhkan suhu yang lebih tinggi. Air yang digunakan pada proses pangan harus memiliki kualitas air bersih dengan standar yang telah ditetapkan oleh pemerintah atau dapat menggunakan air panas untuk pada proses pemasakan dan proses penggumpalan untuk mencegah kontaminasi bakteri.

DAFTAR PUSTAKA

Anonim (2013). *Guidelines for The Assessment of Microbiological Quality of Processed Foods. Food and Drug Administration Philippines.*

Anonim (1995). *SNI 01-3922-1995 Syarat Mutu Kedelai Secara Fisik.* Badan Standarisasi Nasional Indonesia.

Asselt, E.D. dan Zwietering, M.H. (2005). A systematic approach to determine global thermal inactivation

parameters for various food pathogens. *International Journal of Food Microbiology* **107**: 73-82.

Baird-Parker, T.C. (2000). *Staphylococcus aureus.* Dalam: Lund, B.M., Baird-Parker, T.C. dan Gould, G.W. (ed). *The Microbiological Safety and Quality of Food*, hal. 1317-1331. Volume II, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.

Byrne, B., Dunne, G. dan Bolton, D.J. (2006). Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll, *International Journal of Food Microbiology* **23**: 803-808.

Cebrian, G., Condon, S. dan Manas, P. (2009). Heat adaptation induced thermotolerance in *Staphylococcus aureus* influence of the alternative factor OB. *International Journal of Food Microbiology* **135**: 274-280.

Desai, S.V. dan Varadaraj, M.C. (2010). Behavioural pattern of vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* as affected by time-temperature combinations used in processing of India traditional foods. *Journal Food Science and Technology* **47**(5): 549-556.

Granum, P.E. dan Baird-Parker, T.C. (2000). *Bacillus* species. Dalam: Lund, B.M., Baird-Parker, T.C. dan Gould, G.W. (ed). *The Microbiological Safety and Quality of Food*, Hal. 1029-1039. Volume II, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland.

Han, B.Z., Sesenna, B., Rijkelt, R.B. dan Nout, R.M. J. (2005). Behaviour of *Staphylococcus aureus* during sufu production at laboratory scale. *Food Control* **16**: 243-247.

Kooij, J.A. dan Boer, E.D. (1985). A survey of the microbiological quality of commercial tofu in the Netherlands. *International Journal of Food Microbiology* **2**: 349-354.

Martins, P.R., Mateus, C., Teixeira, J.A. dan Vicente, A.A. (2006). Death kinetics of *Escherichia coli* in goat milk and *Bacillus licheniformis* in cloudberry jam treated by ohmic heating. *33rd International Conferences of SSCHE.* May 22-26: 112.1-112.7.

- Ouazzou, A.A., Manas, P., Condon, S., Pagan, R. dan Gonzalo, G.D. (2012). Role of general stress-response alternative sigma factors σ^S (RpoS) and σ^B bacterial heat resistance as a function of treatment medium pH. *International Journal of Food Microbiology* **153**: 358-364.
- Rahayu, E.S., Rahayu, S., Sidar, A., Purwadi, T. dan Rochdyanto, S. (2012). *Teknologi Proses Produksi Tahu*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Rajkovic, A., Kljajic, M., Smigic, N., Devlieghere, F. dan Uyttendale, M. (2013). Toxin producing *Bacillus cereus* persist in ready-to-reheat spaghetti bolognese mainly in vegetative state. *International Journal of Food Microbiology* **167**: 236-243.
- Rajkowski, K. T. (2012). Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on Catfish and Tilapia. *Food Microbiology* **30**: 427-431.