

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Beras

Kata "beras" mengacu pada bagian butir padi (gabah) yang telah dipisah dari sekam. Sekam secara anatomi disebut 'palea' (bagian yang ditutupi) dan 'lemma' (bagian yang menutupi). Pada salah satu tahap pemrosesan hasil panen padi, gabah ditumbuk dengan lesung atau digiling sehingga bagian luarnya (kulit gabah) terlepas dari isinya. Bagian isi inilah, yang berwarna putih, kemerahan, ungu, atau bahkan hitam, yang disebut beras. Berikut ini adalah klasifikasi dari beras.

Tabel 2.1. Klasifikasi beras

Klasifikasi	
Kerajaan	<i>Plantae</i>
Divisi	<i>Spermatophyta</i>
Kelas	<i>Monocotyledons</i>
Bangsa	<i>Cyperales</i>
Suku	<i>Poaceae</i>
Marga	<i>Oryza L.</i>
Jenis	<i>Oryza sativa L.</i>

Sumber : <http://plants.usda.gov>

Beras merupakan bahan pangan pokok bagi sebagian besar masyarakat Indonesia. Sebagaimana bulir sereal lain, bagian terbesar beras didominasi oleh pati (sekitar 80-85%). Beras juga mengandung protein, vitamin (terutama pada bagian aleuron), mineral, dan air. Pati beras tersusun dari dua polimer karbohidrat, yaitu amilosa (pati dengan struktur tidak bercabang) dan amilopektin (pati dengan struktur bercabang dan cenderung bersifat lengket). Perbandingan komposisi

kedua golongan pati ini sangat menentukan warna (transparan atau tidak) dan tekstur nasi (lengket, lunak, keras, atau pera). Ketan hampir sepenuhnya didominasi oleh amilopektin sehingga sangat lekat, sementara beras pera memiliki kandungan amilosa melebihi 20% yang membuat butiran nasinya terpecah-pecah (tidak berlekatan) dan keras (*Winarno, 1992*).

Beras memiliki warna yang berbeda-beda, hal ini disebabkan oleh adanya perbedaan gen yang mengatur warna aleuron, warna endospermia, dan komposisi pati pada endospermia. Berikut ini adalah jenis-jenis beras yang beredar di masyarakat:

- a) Beras "biasa" yang berwarna putih agak transparan karena hanya memiliki sedikit aleuron, dan kandungan amilosa umumnya sekitar 20%. Beras ini mendominasi pasar beras.
- b) Beras merah, akibat aleuronnya mengandung gen yang memproduksi antosianin yang merupakan sumber warna merah atau ungu.
- c) Beras hitam, sangat langka, disebabkan aleuron dan endospermia memproduksi antosianin dengan intensitas tinggi sehingga berwarna ungu pekat mendekati hitam.
- d) Ketan (atau beras ketan), berwarna putih, tidak transparan, seluruh atau hampir seluruh patinya merupakan amilopektin.
- e) Ketan hitam, merupakan versi ketan dari beras hitam.

Beberapa jenis beras mengeluarkan aroma wangi bila ditanak (misalnya 'Cianjur Pandanwangi' atau 'Rajalele'). Bau ini muncul karena beras melepaskan senyawa aromatik yang memberikan efek wangi. Sifat ini diatur secara genetik dan menjadi

objek rekayasa genetika beras. Berikut ini adalah kandungan gizi yang terkandung dalam beberapa jenis beras.

Tabel 2.2. Kandungan gizi dalam 100 gram beras.

No.	Jenis Beras	Kandungan Gizi				
		Air (%)	Karbohidrat (%)	Lemak (%)	Protein (%)	Lain-lain (%)
1.	Beras pecah kulit	13	76,2	1,9	7,4	1,5
2.	Beras setengah giling	12	78,3	1,1	7,6	1
3.	Beras giling	13	78,9	0,7	6,8	0,6
4.	Beras merah, tumbuk	13	77,6	0,9	7,9	0,6
5.	Beras ketan putih	12	79,4	0,7	6,7	1,2
6.	Beras ketan hitam	13	78,0	0,7	7,0	1,3
7.	Beras parboiled	12	80,1	0,6	6,8	0,5

Sumber : Anna Poedjiadi, 1994

2.2 Nasi Putih



Gambar 2.1. Nasi putih

Nasi putih adalah jenis makanan yang dikonsumsi oleh sebagian besar masyarakat Indonesia. Cara membuatnya pun bermacam-macam, baik secara tradisional maupun modern. Secara tradisional, nasi putih dibuat dengan cara merebus beras putih dengan air secukupnya di dalam panci sampai airnya habis kemudian mengukusnya di dalam dendeng selama \pm 30 menit. Sedangkan secara modern, nasi putih dibuat dengan cara merebus beras dengan sejumlah air menggunakan alat elektronik pemasak nasi (*rice cooker*) atau yang sekarang

banyak digunakan yaitu alat penanak sekaligus penghangat nasi (*magic com*). Perubahan beras menjadi nasi terjadi karena adanya gelatinasi pada granula pati yang terdapat dalam beras. Bila pati mentah dimasukkan ke air dingin, granula patinya akan menyerap air dan membengkak. Akan tetapi, jumlah air yang terserap sedikit yaitu sekitar 30% dan pembengkakkannya pun terbatas. Pembengkakkan ini terjadi karena energi kinetik air lebih kuat daripada gaya tarik-menarik antar molekul granula pati, sehingga air dapat masuk ke dalam butir-butir pati. Penyerapan air dan pembengkakkan granula pati dapat ditingkatkan dengan cara menaikkan suhu (*Winarno, 1992*). Kandungan gizi yang terdapat dalam nasi putih ditunjukkan pada tabel 3 berikut ini.

Tabel 2.3. Kandungan gizi dalam 100 gram nasi putih

No.	Kandungan Gizi	Jumlah (%)
1.	Karbohidrat	40,6
2.	Protein	2,1
3.	Lemak	0,1
4.	Air	57,0

Sumber : *Anna Poedjiadi, 1994*

Nasi yang telah selesai dimasak dapat disimpan dengan dua cara, yaitu di dalam bakul (baik yang terbuat dari plastik maupun dari bambu) dan di dalam alat penghangat nasi. Penggunaan bakul sebagai alat penyimpan nasi hanya cocok jika nasi langsung dikonsumsi sesaat setelah nasi matang (sekali habis), karena jika didiamkan terlalu lama nasi akan mengering dan keras. Selain itu, potensi terjadinya kontaminasi pada nasi pun tinggi sehingga nasi menjadi basi. Sedangkan alat penghangat nasi cocok digunakan jika nasi tidak langsung dikonsumsi. Akan tetapi penggunaan alat-alat ini dalam periode waktu tertentu dapat menurunkan kualitas nasi seperti nasi menjadi berbau tidak sedap, benyek, dan warnanya menjadi kekuningan. Pemakaian alat penghangat nasi untuk

mengawetkan nasi sudah menjadi hal umum di masyarakat, dan penggunaannya yang tidak tepat (dalam hal ini adalah lama waktu pemanasan) dapat menyebabkan kualitas nasi menjadi rusak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada pemanasan secara terus menerus dan dengan selang waktu 12 jam, kualitas nasi menjadi rusak setelah 36 jam, sedangkan pada pemanasan dengan selang waktu 6 jam kualitas nasi berubah menjadi rusak setelah 60 jam (Suprayogi, 2008). Berikut ini adalah beberapa cara yang biasa dilakukan oleh masyarakat untuk menjaga agar nasi tetap bagus walau disimpan lama di dalam alat penghangat nasi.

- a) Sebelum memasukkan nasi, wadah teflon yang terdapat dalam alat penghangat nasi dialasi dengan daun pisang.
- b) Mencabut stop kontak magic jar kemudian menutup mulut alat penghangat nasi dengan lap bersih pada malam hari.
- c) Mencuci beras sebersih mungkin.
- d) Memberi perasan jeruk nipis dan garam sebelum menanak nasi.

Menyimpan nasi dalam jangka waktu yang lama, baik di dalam bakul maupun di dalam alat penghangat nasi sebaiknya tidak dilakukan karena dapat menimbulkan keracunan pada makanan. Keracunan ini disebabkan oleh *Bacillus cereus* yang biasa terdapat pada nasi. Bakteri ini berasal dari beras dan dapat bertahan hidup selama proses pemasakan karena dapat membentuk spora. Ketika nasi mendingin secara perlahan, spora-spora tersebut akan berkecambah, tumbuh, dan memproduksi racun emesis yang dapat menyebabkan muntah-muntah. Memanaskan kembali nasi sebelum disajikan tidak akan menonaktifkan racun tersebut ataupun membunuh semua sel bakteri, sehingga nasi menjadi tidak aman untuk dikonsumsi. Adanya racun tersebut pada nasi tidak dapat diidentifikasi

secara kasat mata karena nasi akan terlihat, tercium, dan terasa seperti nasi yang normal (Moir, 2009). Adapun cara-cara untuk mencegah berkembangnya spora *Bacillus cereus* pada nasi adalah sebagai berikut (Foodwise, 2005).

- a) mencuci bersih beras sebelum dimasak,
- b) menggunakan peralatan masak yang bersih dan sudah didisinfeksi,
- c) menyimpan beras dan nasi di ruangan yang terpisah,
- d) memasak nasi dalam jumlah yang kecil dan hampir mendekati waktu penyajian,
- e) diusahakan untuk tidak memanaskan kembali nasi, dan
- f) diusahakan untuk tidak menyimpan nasi dalam jangka waktu yang lama.

2.3 Jeruk Nipis

Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) merupakan tumbuhan perdu dengan banyak cabang. Tanaman ini banyak ditanam di pekarangan dan kebun. Tingginya dapat mencapai enam meter. Daunnya berbentuk bulat telur, bunganya berbentuk bintang berwarna putih, batangnya berkayu keras, dan biasanya berbuah setelah 2,5 tahun. Buahnya berbentuk bulat dengan permukaan yang licin, berkulit tipis, dan berwarna hijau kekuningan jika sudah tua. Tanaman ini diduga berasal dari daerah India sebelah utara. Buahnya mengandung banyak air dan vitamin C yang cukup tinggi. Daun, buah, dan bunganya mengandung minyak atsiri. Biasanya jeruk nipis tumbuh dengan baik di daerah dataran rendah yang banyak terkena sinar matahari. Adapun syarat tumbuh bagi tanaman jeruk nipis adalah sebagai berikut:

- Ketinggian : 200-1300 m di atas permukaan laut
- Curah hujan : 1000-1500 mm/tahun

- Suhu : 20-30°C
- Kelembaban : sedang-tinggi
- Jenis tanah : latosol, aluvial, andosol
- Tekstur tanah : lempung berpasir dan lempung liat
- Drainase : baik
- Kedalaman air tanah : 40-170 cm di bawah permukaan tanah
- Kedalam perakaran : 40 cm di bawah permukaan tanah
- pH tanah : 4-9

Berikut ini adalah gambar buah jeruk nipis beserta klasifikasinya.



Gambar 2.2. Buah jeruk nipis

Tabel 2.4. Klasifikasi Tumbuhan Jeruk Nipis

Klasifikasi	
Kerajaan	<i>Plantae</i>
Divisi	<i>Spermatophyta</i>
Sub divisi	<i>Angiospermae</i>
Kelas	<i>Dicotyledonae</i>
Bangsa	<i>Rutales</i>
Suku	<i>Rutaceae</i>
Marga	<i>Citrus</i>
Jenis	<i>Citrus aurantifolia</i>
Nama dagang/umum	Jeruk nipis
Nama daerah	Limau tipis (Sumatera), Jeruk nipis (Jawa Tengah)

Sumber : <http://bebas.vlsm.org>

Buah jeruk nipis mengandung beberapa jenis zat gizi, seperti yang tersaji dalam tabel 2.5 berikut.

Tabel 2.5. Kandungan gizi dalam 100 gram buah jeruk nipis

No.	Kandungan Gizi	Jumlah
1.	Karbohidrat	12,4 g
2.	Protein	0,8 g
3.	Lemak	0,1 g
4.	Air	86 g
5.	Vitamin C	27 mg
6.	Kalsium	40 mg
7.	Fosfor	22 mg
8.	Vitamin B1	0,04 mg
9.	Kalori	37 kkal

Sumber : *Sriwijaya Post*, 2005

Selain itu, buah jeruk nipis juga mengandung asam sitrat 41.1 mg (*Tomotake et al*, 2006), asam amino (triptofan, lisin), minyak atsiri (sitril, limonen, felandren, lemon kamfer, kadinen, geranil asetat, linalil asetat, aktilaldehid, nildehid), damar, glikosida, besi, dan belerang (*Sriwijaya Post*, 2005). Secara tradisional buah jeruk nipis sering digunakan untuk mengobati berbagai penyakit seperti amandel, malaria, ambeien, sesak nafas, influenza, batuk, sakit panas, sembelit, terlambat haid, perut mules saat haid, disentri, perut mulas, perut mual, lelah, bau badan, dan keriput wajah.

Banyak dari hasil penelitian menyebutkan bahwa buah jeruk nipis berkhasiat sebagai obat dari berbagai penyakit. Selain itu, buah jeruk nipis sering digunakan sebagai bahan dasar kosmetik. Akan tetapi, belum ada yang meneliti jeruk nipis sebagai pengawet makanan (khususnya nasi). Ibukun Aibinu *et al* (2007) menyebutkan bahwa ekstrak dari buah jeruk nipis memiliki aktivitas antimikrobia yang tinggi. Hal ini terlihat dari kemampuannya dalam menghambat

pertumbuhan beberapa bakteri dan jamur. Dari penelitian yang telah dilakukan tersebut lebih lanjut diperoleh hasil bahwa ekstrak dari sari buah jeruk nipis mampu menghambat pertumbuhan bakteri anaerob dan Gram-positif pada rentang konsentrasi penghambatan minimum (*minimum inhibitory concentration/ MIC*) 32-128 g/mL, sedangkan ekstrak minyak buahnya mampu menghambat *Aspergillus niger* dan *Candida albicans* pada rentang MIC 256-512mg/ml. Selain itu, ekstrak *schnapps* dari buah jeruk nipis mampu membunuh *S. aureus* dan *E. coli* dalam waktu 1 dan 3,5 jam. Sedangkan berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Chanthaphon *et al* (2008), diperoleh data bahwa ekstrak etil asetat dari kulit buah jeruk nipis mampu menghambat pertumbuhan semua bakteri Gram-positif, ragi, dan jamur, termasuk juga *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae*, dan *Aspergillus fumigatus* TISTR 3180. Selain itu, telah banyak diketahui bahwa minyak atsiri dari buah jeruk nipis dapat digunakan untuk meningkatkan ketahanan dan keamanan minimal dalam pengolahan buah-buahan, susu skim dan susu rendah lemak.

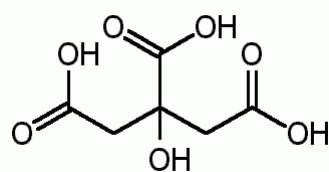
Kemampuan menghambat pertumbuhan dan membunuh mikroba tersebut karena sari buah jeruk nipis mengandung asam sitrat yang cukup banyak, yaitu 41,3 mg (Tomotake *et al*, 2006) dan minyak atsiri. Minyak atsiri ini berperan sebagai antibakteri dengan cara mengganggu proses terbentuknya membran atau dinding sel sehingga tidak terbentuk atau terbentuk tidak sempurna. Minyak atsiri yang aktif sebagai antibakteri pada umumnya mengandung gugus fungsi hidroksil (-OH) dan karbonil. Turunan fenol berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses adsorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen. Pada kadar rendah terbentuk kompleks protein fenol dengan ikatan yang lemah dan segera mengalami penguraian,

diikuti penetrasi fenol ke dalam sel dan menyebabkan presipitasi serta denaturasi protein. Pada kadar tinggi fenol menyebabkan koagulasi protein dan sel membran mengalami lisis (*Juliantina, tanpa tahun*).

2.4 Asam Sitrat

Merupakan senyawa intermedier dari asam organik yang berbentuk kristal atau serbuk putih. Asam sitrat ini mudah larut dalam air, spiritus, dan etanol, tidak berbau, rasanya sangat asam, serta jika dipanaskan akan meleleh kemudian terurai yang selanjutnya terbakar sampai menjadi arang. Asam sitrat juga terdapat dalam sari buah-buahan seperti nenas, jeruk, lemon, markisa. Asam ini dipakai untuk meningkatkan rasa asam (mengatur tingkat keasaman) pada berbagai pengolahan minum, produk air susu, dan selai (*Sediadi, 2000*).

Berikut ini adalah struktur dari asam sitrat.



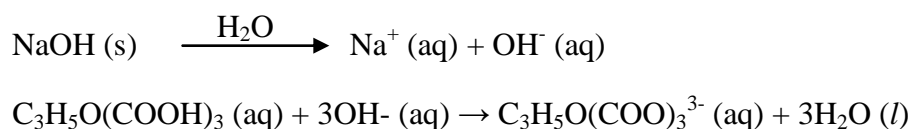
Gambar 2.3. Asam sitrat

Asam sitrat merupakan asam organik tri-potik (pK1 3,13; pK2 4,76; pK3 6,40) yang biasa digunakan sebagai zat pengasam dalam industri makanan dan minuman. Fungsi utama dari zat pengasam produk-produk makanan dan minuman tersebut adalah untuk mengawetkan dengan cara menurunkan pH dan menghambat pertumbuhan sekaligus membunuh mikroorganisme pembusuk. Adapun mekanisme penghambatan dan pembunuhan mikroorganisme tersebut adalah dengan cara mengkhelat ion logam divalen pada medium dan mengganggu keseimbangan energi dalam metabolisme mikroorganime, yaitu menurunkan

jumlah etanol dan ATP serta meningkatkan produksi gliserol. Selain itu, asam sitrat mampu menginduksi perubahan-perubahan yang terjadi di transkriptom dan proteom dalam tubuh *S. cereviceae* pada pH 3,5 (Nielsen et al, 2007).

Seperti yang kita ketahui bahwa magnesium merupakan kofaktor esensial dari beberapa enzim glikolitik yang terdapat dalam tubuh ragi, sehingga penipisan jumlah magnesium dalam medium akan menghambat glikolisis. Dalam kondisi anerobik, pembentukan etanol dan gliserol dibutuhkan untuk memelihara keseimbangan redoks ragi. Jika produksi etanol terhambat, maka tubuh ragi akan meningkatkan jumlah produksi gliserol. Hal ini dapat mengganggu keseimbangan metabolismenya sehingga terjadi penurunan ATP. Dengan berkurangnya jumlah ATP tersebut maka ragi akan kekurangan energi dan mati (Marina et al, 2007).

Kadar asam sitrat dalam buah-buahan dapat ditentukan dengan metoda titrasi asam-basa (Pater, 2007). Ketika asam sitrat dititrasi dengan larutan NaOH, terjadi reaksi ionisasi antara ketiga gugus karboksilat dari asam sitrat dengan ion OH⁻ dari larutan NaOH. Berikut ini adalah persamaan reaksinya:



2.5 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus adalah bakteri Gram-positif yang mampu mengubah bentuk menjadi spora dan dapat menyebabkan keracunan pada makanan. Adapun jenis penyakit yang dapat ditimbulkan oleh bakteri ini adalah diare dan emetik (muntah). Saat ini terdapat tiga jenis racun enterotoksin yang dapat menyebabkan sindrom diare, yaitu hemolisin BL (HBL), enterotoksin non-hemolitik (NHE), dan

sitotoksin K, HBL dan NHE merupakan protein dengan tiga komponen, sedangkan sitotoksin K merupakan protein tunggal. Gejala yang disebabkan oleh sitotoksin lebih hebat dan bahkan dapat menyebabkan kematian. Secara umum, gejala keracunan akan timbul dalam waktu 6-24 jam setelah mengonsumsi makanan yang terkontaminasi. Keracunan makanan yang disebabkan oleh *B.cereus* sering kali diremehkan karena pendeknya waktu penyakit (~24 jam).

B.cereus pertama kali diisolasi dari udara di sebuah menara oleh Frankland Bersaudara pada tahun 1887. Di alam *B.cereus* terdapat dimana-mana, akan tetapi habitat aslinya adalah tanah. Bakteri ini seringkali terdapat dalam bahan pangan seperti daging sapi, daging unggas, susu, sereal, tepung kanji, tanaman herbal, dan rempah-rempah. Bahan-bahan pangan terkontaminasi *B.cereus* yang biasanya menyebabkan diare adalah susu, sayuran, daging sapi, dan ikan. Sedangkan bahan-bahan pangan terkontaminasi *B.cereus* yang menyebabkan muntah adalah produk-produk berbasis beras, kentang, pasta, dan produk-produk keju. Selain itu, bahan-bahan pangan seperti saus, kue kering, sup, puding, dan salad disinyalir juga sebagai media wabah keracunan makanan. Dari berbagai jenis bahan pangan yang rentan terhadap kontaminasi *B.cereus*, produk-produk berbasis beras-lah yang seringkali terkontaminasi oleh bakteri ini. Jumlah bakteri ini dapat mencapai lebih dari 10^3 CFU/g pada beras, nasi, dan produk serealnya di seluruh dunia (Grande, 2005). Berikut ini adalah tabel bahan pangan yang positif terkontaminasi *B.cereus*.

Tabel 2.6. Bahan pangan yang positif terkontaminasi *B.cereus*

Bahan Pangan	Persentase Kemungkinan Terkontaminasi
Daging babi	4-7
Daging sapi	11-63
Daging ayam	0-7
Daging giling	39
Susu mentah	9
Susu terpasteurisasi	35
Produk olahan susu	0-63
Beras	100
Pasta dan tepung	0
Makanan laut	1

Sumber : Tajkarimi, 2007

B.cereus membutuhkan kondisi lingkungan tertentu untuk hidup dan berkembangbiak. Berikut ini adalah faktor-faktor yang berpengaruh terhadap pertumbuhan *B.cereus*.

Tabel 2.7. Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan *B. cereus*

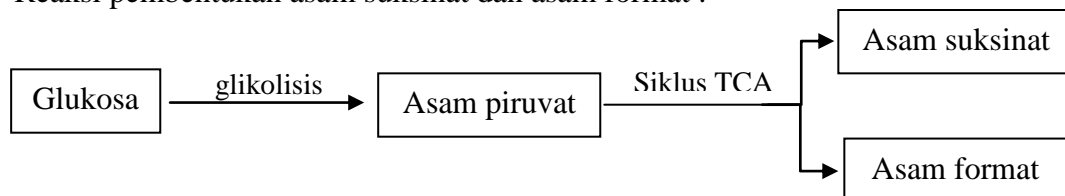
Faktor	Kondisi
Suhu pertumbuhan	7–49°C, dengan suhu minimum 4–5°C dan suhu maksimum 48–50°C
Suhu pengecambahan spora	8–30°C
pH	4,9-9,3
A _w minimum	0,91-0,93
Toleransi garam	< 10%
Waktu resistensi spora pada suhu 100°C	≥ 3 menit
Dosis resistensi terhadap radiasi	- spora = 1.25-4kGy - sel vegetatif = 0.17-0.65 kGy

Sumber : Tajkarimi, 2007

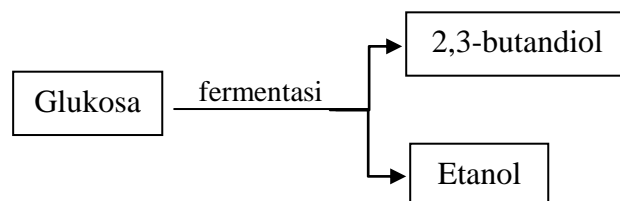
Bacillus cereus berbentuk batang besar, tergolong Gram-positif, dan fakultatif aerob. Kebanyakan anggota spesies ini adalah organisme saprofit yang lazim terdapat dalam tanah, air, udara, dan tumbuh-tumbuhan. Bakteri ini memiliki ukuran sel yang khas yaitu 0,5-0,25 µm dan 1,2-10 µm, sering bersusun

sepasang atau rantai yang melingkar, dalam satu sel hanya terdapat satu spora, dan bersifat motil. Spora biasanya terletak di tengah basil yang tidak bergerak, resisten terhadap perubahan lingkungan, tahan terhadap panas dan disinfektan kimia tertentu dalam waktu yang cukup lama, dan dapat hidup bertahun-tahun di dalam tanah kering. *B.cereus* membutuhkan glukosa, threonin, leusin, dan valin (Jääskeläinen, 2008) untuk kebutuhan energi dan pertumbuhannya serta mengeluarkan asam-asam organik (seperti asam asetat, asam laktat, asam format, asam suksinat), alkohol, senyawa karbonil, dan karbon dioksida sebagai hasil metabolisemenya (Wang, 2001). Berikut adalah reaksi metabolisme yang terjadi pada *B. cereus*.

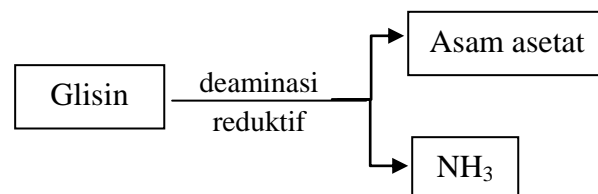
Reaksi pembentukan asam suksinat dan asam format :



Reaksi pembentukan 2,3-butandiol dan etanol :



Reaksi pembentukan asam asetat :

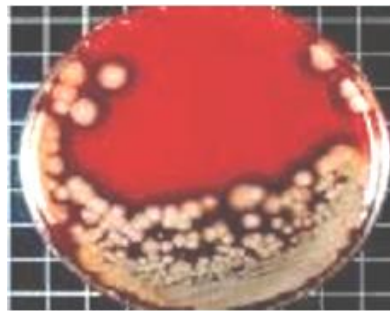


Berikut ini adalah klasifikasi, gambar dan pola fase pertumbuhan dari *B.cereus*.

Tabel 2.8. Klasifikasi *B.cereus*

Klasifikasi	
Divisi	Bacteria
Sub divisi	Firmicutes
Kelas	Bacilli
Bangsa	Bacillales
Suku	Bacillaceae
Marga	Bacillus
Jenis	<i>Bacillus cereus</i>

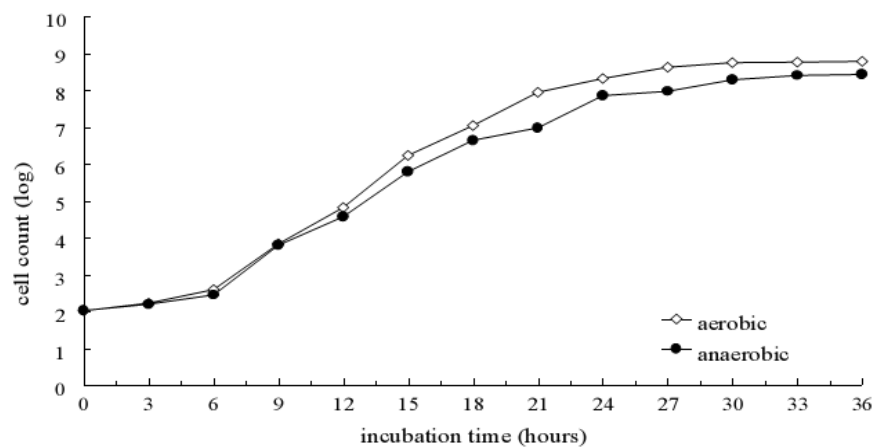
Sumber : www.wikipedia.com



(a)



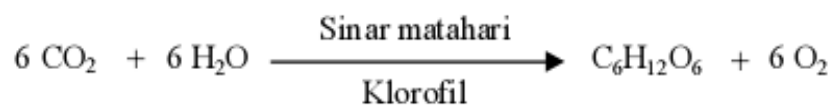
(b)

Gambar 2.4. (a) Koloni *B.cereus*, (b) Morfologi *B.cereus*Gambar 2.5. Pola fase log pertumbuhan *B. cereus*

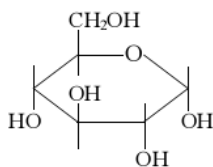
2.6 Nutrisi dalam Bahan Pangan

2.6.1 Karbohidrat

Karbohidrat merupakan sumber energi utama bagi manusia dan hewan yang harganya relatif murah. Semua karbohidrat berasal dari tumbuh-tumbuhan, yaitu produk dari fotosintesis.



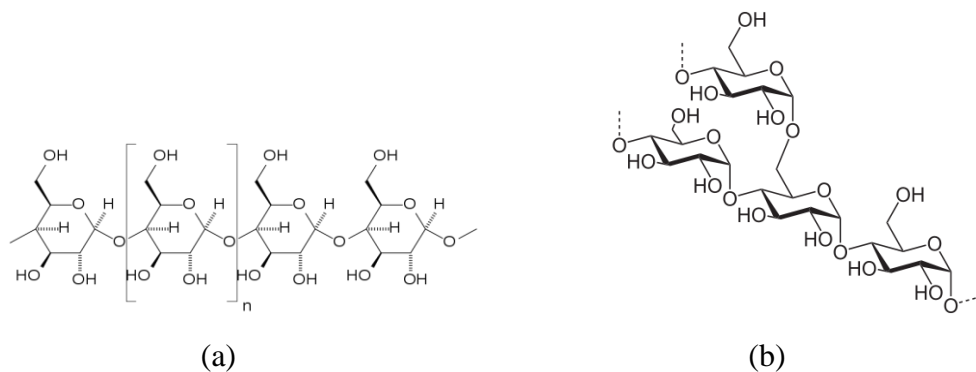
Karbohidrat dibagi menjadi dua, yaitu karbohidrat sederhana dan karbohidrat kompleks. Karbohidrat sederhana dapat berupa monosakarida (glukosa, fruktosa, dan galaktosa) atau disakarida (sukrosa, maltosa, dan laktosa). Karbohidrat yang dihasilkan dari proses fotosintesis adalah karbohidrat sederhana (glukosa). Struktur kimia glukosa dapat dilihat pada gambar 2.6.



Gambar 2.6. Struktur glukosa

Karbohidrat kompleks terdiri dari polisakarida, dan serat/polisakarida nonpati. Polisakarida merupakan karbohidrat kompleks yang mengandung lebih dari dua ikatan monosakarida seperti pati. Pati merupakan homopolimer glukosa dengan ikatan -glikosidik yang terdiri dari dua fraksi, yaitu amilosa dan amilopektin. Amilosa mempunyai struktur lurus dengan ikatan -(1,4)-D-glukosa, sedangkan amilopektin mempunyai cabang pada ikatan -(1,6)-D-glukosa (Winarno, 1992). Struktur kimia pati ditunjukkan pada gambar 2.7.

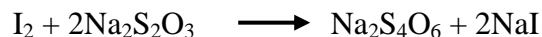
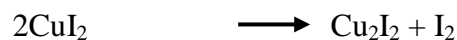
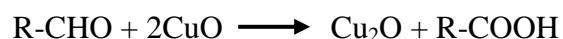
Serat merupakan karbohidrat kompleks yang tidak dapat dicerna oleh tubuh dengan sedikit atau tidak menghasilkan kalori tetapi dapat meningkatkan volume feses. Yang termasuk kategori serat adalah selulosa dan hemiselulosa dari dinding sel tanaman, pektin, dan gum. Serat yang kaya selulosa akan merangsang pemindahan bahan makanan dalam/melalui saluran pencernaan. Pektin yang banyak membawa air dalam bentuk gel dan gum menghambat pengosongan lambung. Hal ini terjadi karena adanya pembentukan gel dalam usus yang akan menghambat penyerapan di- dan monosakarida (*Miranti, 2008*).



Gambar 2.7. Struktur kimia pati, (a) amilosa, (b) amilopektin

Fungsi karbohidrat bagi tubuh yaitu sebagai sumber energi utama, penghemat protein, pengatur metabolisme lemak, dan membantu pengeluaran feces. Bila tidak ada karbohidrat, asam amino dan gliserol yang berasal dari lemak dapat diubah menjadi glukosa untuk keperluan energi otak dan sistem saraf pusat. Oleh sebab itu, tidak ada ketentuan tentang kebutuhan karbohidrat sehari untuk manusia. Untuk memelihara kesehatan, WHO (1990) menganjurkan agar 55-75 % konsumsi energi total berasal dari karbohidrat kompleks dan paling banyak hanya 10 % berasal dari gula sederhana. Sementara itu, untuk serat dianjurkan untuk dikonsumsi sebanyak 20-30 g sehari (*Almatsier, 2004*).

Penetapan kadar karbohidrat dalam suatu bahan pangan dapat mengacu pada SNI 01-2891-1992. Penentuan kadar karbohidrat dalam nasi dalam penelitian ini ditentukan melalui cara Luff Schoorl. Pada metode ini, sampel direaksikan dengan pereaksi Luff Schoorl yang mengandung kuprioksida (CuO). Gula pereduksi yang ada di dalam sampel akan mereduksi kuprioksida menjadi kuprooksida (Cu₂O). Kuprioksida yang tidak bereaksi, akan membebaskan iod dari garam kalium iodida. Banyaknya iod yang dibebaskan dapat ditentukan melalui titrasi dengan Na₂S₂O₃. Pada penentuan kadar karbohidrat dengan cara Luff Schoorl, dilakukan penentuan kuprioksida dalam larutan sebelum direaksikan dengan gula pereduksi (titrasi blanko) dan sesudah direaksikan dengan sampel gula pereduksi (titrasi sampel). Selisih titrasi blanko dengan titrasi sampel ekuivalen dengan kuprooksida yang terbentuk, dan juga ekuivalen dengan jumlah gula pereduksi yang ada dalam sampel (*Miranti, 2008*). Reaksi yang terjadi pada penentuan kadar karbohidrat dengan cara Luff Schoorl dapat dilihat pada persamaan reaksi berikut :



2.6.2 Lemak

Lemak merupakan gabungan antara gliserol dan asam lemak. Lemak dapat berwujud padat maupun cairan yang tergantung dari jenis asam lemak yang diikatnya. Lemak padat mengandung asam lemak jenuh, sedangkan lemak cair (minyak) mengandung asam lemak tidak jenuh. Lemak termasuk ke dalam

kelompok senyawa lipida, yaitu lemak dan senyawa organik yang mempunyai sifat fisika seperti lemak. Sifat fisika lipida, yaitu : (1) tidak larut dalam air, tetapi larut dalam satu atau lebih pelarut organik; (2) memiliki hubungan dengan asam lemak atau esternya; (3) mempunyai kemungkinan digunakan oleh makhluk hidup (*Poedjiadi, 1994*). Dalam bahan makanan terdapat dalam tiga bentuk utama lipida, yaitu gliserida, fosfolipid dan sterol.

Gliserida merupakan bentuk lemak yang disimpan untuk energi dan merupakan bentuk yang paling banyak dalam bahan makanan dan jaringan. Trigliserida merupakan 95-98% dari seluruh bentuk lemak dikonsumsi pada semua bentuk makanan dan persentasenya sama dengan yang ada di dalam tubuh manusia. Fosfolipid dan kolesterol dikonsumsi dalam jumlah sedikit dan merupakan komponen utama dinding sel dan selubung mielin. Kolesterol tidak didapatkan dalam bahan makanan nabati dan dinding sel tanaman tidak mengandung kolesterol maupun lipid yang serupa (fitosterol) dalam jumlah banyak (*Miranti, 2008*).

Berat jenis lemak lebih rendah daripada air. Sifat fisik lemak ditentukan oleh asam lemak yang membentuknya. Titik cair akan meningkat dengan bertambah panjangnya rantai asam lemak dan tingkat kejenuhannya. Semakin banyak mengandung asam lemak rantai panjang-jenuh, semakin padat lemak tersebut (*Almatsier, 2004*). Lemak hampir terdapat dalam semua bahan pangan dengan kandungan yang berbeda-beda. Lemak merupakan sumber energi yang lebih efektif dibanding karbohidrat dan protein. Satu gram lemak dapat menghasilkan energi sebanyak 9 kkal, sedangkan karbohidrat dan protein hanya menghasilkan 4 kkal/gram (*Winarno, 1992*).

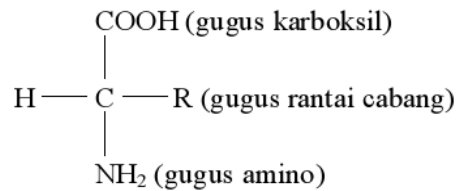
Fungsi lemak bagi tubuh yaitu sebagai sumber energi cadangan, sumber asam lemak esensial (asam linoleat dan linolenat), alat angkut vitamin larut dalam lemak, penghemat protein, sebagai pelumas (membantu pengeluaran sisa pencernaan, memelihara suhu tubuh, dan pelindung organ-organ tubuh vital. Kebutuhan lemak tidak dinyatakan secara mutlak. WHO (1990) menganjurkan konsumsi lemak sebanyak 15-30 % kebutuhan energi total dianggap baik untuk kesehatan. Jumlah ini memenuhi kebutuhan akan asam lemak esensial dan untuk membantu penyerapan vitamin larut lemak. Diantara lemak yang dikonsumsi sehari dianjurkan paling banyak 10 % dari kebutuhan energi total berasal dari lemak jenuh, dan 3-7 % dari lemak tidak jenuh ganda. Konsumsi kolesterol yang dianjurkan adalah 300 mg sehari (*Almatsier, 2004*).

Penentuan kadar lemak dalam suatu bahan pangan ditentukan melalui metode soxhletasi. Metode ini didasarkan pada proses ekstraksi lemak dalam bahan pangan menggunakan pelarut organik yang diawali dengan proses hidrolisis menggunakan HCl. Sehingga akan didapatkan lemak total kasar dalam bahan pangan tersebut.

2.6.3 Protein

Protein adalah molekul makro yang terdiri atas rantai-rantai panjang asam amino, yang terikat satu sama lain dengan ikatan peptida. Asam amino terdiri atas atom karbon yang terikat pada satu gugus amino (-NH₂), satu atom hidrogen dan satu gugus rantai cabang. Struktur kimia asam amino dapat dilihat pada gambar 8. Berdasarkan rantai cabangnya, terdapat dua puluh jenis asam amino yang terdiri atas asam amino esensial (asam amino yang tidak dapat disintesis oleh tubuh) dan

sebelas asam amino nonesensial. Tabel 2.8 menunjukkan macam-macam asam amino sesuai dengan jenisnya.



Gambar 2.8. Struktur asam amino

Tabel 2.9. Pembagian asam amino esensial dan nonesensial

Asam Amino Esensial	Asam Amino Non-esensial
Leusin	Prolin
Isoleusin	Serin
Valin	Arginin
Triptofan	Tirosin
Fenilalanin	Sistein
Metionin	Trionin
Treonin	Glisin
Lisin	Glutamat
Histidin	Alanin
	Aspartat
	Glutamin

Sumber : Sunita Atmasier, 2004

Protein berfungsi sebagai pengendalian pertumbuhan dan pemeliharaan sel-sel tubuh, pembentuk antibodi dan ikatan-ikatan esensial tubuh, sebagai media perambatan impuls syaraf, mengatur keseimbangan air, memelihara netralitas tubuh, mengangkut zat-zat gizi, sumber energi cadangan, dan sebagai enzim. Protein dalam bahan pangan diklasifikasikan menjadi dua kelompok, yaitu protein hewani yang berasal dari bahan pangan hewani (daging, telur, susu, dan ikan) dan protein nabati yang banyak terdapat dalam polong-polongan.

Penentuan kadar protein kasar suatu bahan pangan ditentukan melalui metode Kjeldahl. Metode ini disebut juga penentuan kadar protein secara tidak langsung karena yang dianalisis dengan metode ini adalah nitrogennya sebab unsur N ini terdapat dalam semua asam amino. Dengan mengalikan hasil analisis tersebut dengan faktor konversi, akan diperoleh nilai protein dalam bahan makanan tersebut. Faktor konversi untuk setiap bahan makanan berbeda, tergantung pada asam amino yang dikandung bahan makanan. Pada penelitian ini, faktor konversi yang digunakan sebesar 6,25 karena jenis asam amino yang terkandung dalam produk belum diketahui secara pasti (*Winarno, 1992*).

Analisa protein dengan metode Kjeldahl dibagi menjadi tiga tahapan, yaitu proses destruksi, proses destilasi, dan tahap titrasi. Metode Kjeldahl pada prinsipnya didasarkan pada senyawa nitrogen yang diubah menjadi ammonium sulfat oleh H_2SO_4 . Ammonium sulfat yang terbentuk diuraikan dengan NaOH menghasilkan amoniak. Amoniak yang dibebaskan diikat oleh asam borat, yang kemudian dititrasi dengan larutan baku HCl . Reaksi yang terjadi pada penentuan kadar protein dengan metode Kjeldahl ditunjukkan persamaan reaksi berikut :

Tahap destruksi :



Tahap destilasi :



Tahap titrasi :



2.6.4 Vitamin

Vitamin adalah zat-zat organik kompleks yang dibutuhkan dalam jumlah sangat kecil tetapi penting dalam pertumbuhan dan pemeliharaan tubuh serta agar proses metabolisme dapat berlangsung dengan baik. Pada umumnya vitamin tidak dapat dibentuk oleh tubuh, sehingga vitamin hanya dapat diperoleh dari luar, yaitu dari makanan. Vitamin terbagi menjadi dua jenis, yaitu vitamin larut lemak dan vitamin larut air.

Vitamin larut lemak terdiri dari vitamin A, D, E, dan K. sebagian besar vitamin larut lemak diabsorpsi bersama lipida lain. Absorpsi membutuhkan cairan empedu dan pankreas. Vitamin larut lemak diangkut ke hati melalui sistem limfe sebagai bagian dari lipoprotein, kemudian disimpan di berbagai jaringan tubuh dan biasanya tidak dikeluarkan melalui urin (*Almatsier, 2004*).

Vitamin larut air terdiri dari vitamin C dan B kompleks. Vitamin B kompleks terdiri dari tiamin (vitamin B1), riboflavin (vitamin B2), niasin, asam pantotenat, piridoksin (vitamin B6), biotin, folasin, dan sianokobalamin (vitamin B12). Sebagian besar vitamin larut air merupakan komponen sistem enzim yang banyak terlibat dalam membantu metabolisme energi. Vitamin larut air biasanya tidak disimpan di dalam tubuh dan dikeluarkan melalui urin dalam jumlah kecil. Dalam bahan pangan hanya terdapat vitamin dalam jumlah yang relatif kecil dan terdapat dalam bentuk yang berbeda-beda, diantaranya ada yang berbentuk provitamin atau calon vitamin (prekursor) yang dapat diubah dalam tubuh menjadi vitamin yang aktif. Segera setelah diserap oleh tubuh, provitamin mengalami perubahan kimia sehingga menjadi satu atau lebih bentuk yang aktif (*Winarno, 1992*).

2.6.5 Mineral

Mineral merupakan bagian dari tubuh dan memegang peranan penting dalam pemeliharaan fungsi tubuh, baik pada tingkat sel, jaringan, organ, maupun fungsi tubuh secara keseluruhan. Selain itu, mineral juga berperan dalam berbagai tahap metabolisme, terutama sebagai kofaktor aktivitas enzim-enzim. Mineral digolongkan ke dalam mineral makro dan mineral mikro. Mineral makro merupakan mineral yang dibutuhkan tubuh dalam jumlah lebih dari 100 mg sehari, yang terdiri dari Na, Cl, K, Ca, P, Mg dan S. Sementara itu, mineral mikro merupakan mineral yang dibutuhkan kurang dari 100 mg sehari, yang terdiri dari Fe, Zn, I, Se, Cu, Mn, F, Cr, Mo, As, Ni, Si dan B.

Sebagian besar bahan makanan (sekitar 95%) terdiri dari zat organik dan air. Sisanya, yaitu sekitar 5% terdiri dari mineral. Mineral dikenal sebagai bahan anorganik atau sisa pengabuan. Mineral dalam bahan pangan dapat ditentukan dengan pengabuan. Pengabuan ini merusak senyawa organik dan meninggalkan mineral (*Dita, 2006*). Pengabuan dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu cara kering dan cara basah. Cara kering dilakukan untuk menentukan abu total dari suatu bahan pangan, sedangkan cara basah dilakukan untuk menentukan logam-logam beracun dalam suatu limbah. Kandungan mineral dalam suatu bahan pangan dapat ditentukan menggunakan metode Spektroskopi Serapan Atom (SSA) (*Miranti, 2008*). Prinsip kerja metode SSA tersebut adalah didasarkan pada penyerapan sumber radiasi (di luar nyala) oleh atom-atom netral dalam keadaan gas/ dasar yang berbeda dalam nyala. Radiasi yang diserap atom-atom netral adalah radiasi sinar tampak atau ultraviolet (*Hendayana, 1994*).

2.6.6 Air

Air merupakan bahan yang sangat penting bagi kehidupan manusia dan fungsinya tidak pernah dapat digantikan oleh senyawa lain. Selain itu, air juga merupakan komponen yang penting dalam bahan makanan karena air dapat mempengaruhi penampilan, tekstur, dan cita rasa makanan; bahkan dalam bahan makanan yang kering sekalipun seperti buah kering, tepung, dan biji-bijian. Kandungan air dalam bahan makanan ikut menentukan *acceptability*, kesegaran, dan daya tahan bahan tersebut.

Saat ini istilah yang umum digunakan untuk air yang terdapat dalam bahan makanan adalah "air terikat", yang dianggap sebagai suatu sistem yang mencakup air yang mempunyai derajat keterikatan berbeda-beda dalam bahan. Berdasarkan derajat keterikatan air, "air terikat" terbagi menjadi empat (4) tipe.

- a. Tipe 1, yaitu molekul air yang terikat pada molekul-molekul lain melalui suatu ikatan hidrogen berenergi besar. Molekul air membentuk hidrat dengan molekul-molekul lain yang mengandung atom O dan N seperti karbohidrat, protein, atau garam. Air tipe ini tidak membeku pada proses pembekuan, dan sebagian air ini dapat dihilangkan dengan cara pengeringan biasa.
- b. Tipe 2, yaitu molekul-molekul air berikatan hidrogen dengan molekul air lain, terdapat dalam mikrokapiler dan sifatnya agak berbeda dengan air murni. Air tipe ini lebih sukar dihilangkan, dan penghilangan air tipe ini akan menurunkan a_w (water activity).
- c. Tipe 3, yaitu air yang terikat dalam jaringan matriks bahan seperti membran, kapiler, serat, dan lain-lain. Air tipe ini mudah diuapkan dan dapat digunakan untuk pertumbuhan mikroba dan media untuk reaksi-reaksi kimiawi.

- d. Tipe 4, yaitu air yang terikat dalam jaringan suatu bahan dan sering disebut dengan istilah "air murni" yang memiliki sifat-sifat seperti air biasa dan keaktifan penuh.

Selain tipe-tipe air di atas, terdapat juga air imbibisi dan air kristal. Air imbibisi merupakan air yang masuk ke dalam bahan pangan dan akan menyebabkan pengembangan volume bahan, tetapi air ini bukan merupakan komponen penyusun bahan tersebut. Misalnya air dengan beras bila dipanaskan akan membentuk nasi, atau pembentukkan gel dari bahan pati. Sedangkan yang dimaksud dengan air kristal adalah air yang terikat dalam semua bahan, baik bahan pangan maupun non-pangan yang berbentuk kristal seperti gula, garam, tembaga sulfat, dan lain-lain. Kandungan air dalam bahan makanan mempengaruhi daya tahan makanan terhadap serangan mikroba yang dinyatakan dengan a_w , yaitu jumlah air bebas yang dapat digunakan oleh mikroorganisme untuk pertumbuhannya. Berbagai mikroorganisme mempunyai a_w minimum agar dapat tumbuh dengan baik, misalnya bakteri $a_w = 0,90$; khamir $a_w = 0,80-0,90$; dan kapang $a_w = 0,60-0,70$ (Winarno, 1992).

Penetapan kandungan air dapat dilakukan dengan beberapa cara, hal ini tergantung pada sifat bahan pangan. Pada umumnya penentuan kadar air dilakukan dengan cara mengeringkan bahan dalam oven pada suhu $105-110^{\circ}\text{C}$ selama 3 jam atau sampai diperoleh berat yang konstan. Selisih berat sebelum dan sesudah pengeringan adalah banyaknya air yang diuapkan. Untuk bahan-bahan yang tidak tahan panas, seperti bahan berkadar gula tinggi, minyak, daging, kecap, dan lain-lain pemanasan dilakukan dalam oven vakum dengan suhu yang lebih rendah. Kadang-kadang pengeringan dilakukan tanpa pemanasan, yaitu dengan

cara memasukkan bahan ke eksikator dengan asam sulfat sebagai pengering sampai dicapai berat yang konstan. Sedangkan untuk bahan-bahan yang kadar airnya tinggi dan mengandung senyawa yang mudah menguap, penentuan kadar air dilakukan dengan cara destilasi azeotrop. Berbeda halnya dengan bahan yang berkadar gula tinggi, kadar airnya diukur dengan menggunakan refraktometer. Dalam hal ini, air dan gula dianggap sebagai komponen-komponen yang mempengaruhi indeks refraksi (*Winarno, 1992*).

2.7 Total Plate Count

Di dalam suatu populasi bakteri tidak semua sel mampu hidup terus menerus. Sel hidup ialah sel yang mampu membentuk koloni di dalam agar biak atau membentuk suspensi dalam larutan biak. Sel hidup inilah yang dihitung dengan berbagai metode untuk menetapkan jumlah sel hidup. Metode yang digunakan tergantung pada bahan dan jenis mikrobia yang ditentukan. Jumlah perhitungan juga dapat diestimasi dari jumlah bakteri yang terdapat dalam medium biakan murni suatu bakteri. Ada 2 cara untuk menghitung jumlah bakteri dalam suatu bahan yaitu secara langsung dan tidak langsung (*Wulandari, 2008*).

a. Perhitungan secara langsung

Perhitungan secara langsung dipakai untuk menentukan jumlah mikrobia keseluruhan baik bakteri yang mati maupun yang hidup. Mikrobia dapat diamati langsung dengan menggunakan mikroskop. Keuntungannya adalah kita dapat menentukan dan menghitung langsung jumlah bakteri yang terdapat pada kaca preparat. Pengamatan secara langsung dengan mikroskop membutuhkan pengecatan. Preparat dicat dengan cat yang sesuai lalu dihitung jumlah rata-rata

sel mikrobial tiap bidang pandang pada mikroskop dan menggunakan *hand-counter* untuk membantu perhitungan mikrobial (*Wulandari, 2008*).

b. Perhitungan secara tidak langsung

Perhitungan ini dipakai untuk menentukan jumlah bakteri keseluruhan baik yang hidup maupun yang mati atau hanya untuk menentukan jumlah bakteri yang hidup saja tergantung pada cara yang digunakan. Untuk menentukan jumlah mikrobial yang hidup dapat dilakukan setelah suspensi bahan atau biakan diencerkan beberapa kali dan ditumbuhkan pada medium dengan cara tertentu tergantung macam bahan dan sifat mikrobial. Perhitungan jumlah mikrobial secara tidak langsung dapat dilakukan dengan sentrifugasi, berdasarkan kekeruhan, dengan *electronic counter*, berdasarkan analisis kimia, berdasarkan berat kering, berdasarkan jumlah koloni dan Most Probable Number (MPN) (*Wulandari, 2008*).

Banyaknya jumlah koloni menunjukkan banyak sedikitnya bakteri yang tumbuh pada media. Plate count merupakan salah satu cara penghitungan jumlah bakteri secara tidak langsung. Syarat-syarat yang harus dipenuhi antara lain:

- 1) Jumlah koloni tiap cawan petri 30 - 300 koloni,
- 2) Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas cawan petri,
- 3) Perbandingan jumlah bakteri dari hasil pengenceran yang berturut-turut antara pengenceran sebelumnya, jika sama atau lebih kecil dari 2 hasilnya dirata-rata, tetapi jika lebih besar dari 2 yang dipakai jumlah mikrobial dari pengenceran sebelumnya (*Retno Wulandari, 2008*).

Penggunaan metode ini dapat memberikan estimasi terbaik dari jumlah bakteri pada substansi tertentu. Namun penggunaan metode ini juga menemui kendala seperti bila koloni tumbuh mengumpul, sulit menganggap koloni mana

yang dihitung sebagai single sel. Sehingga sangat mungkin terjadi salah pandang saat perhitungan, koloni kecil tidak terhitung. Jadi ada banyak faktor yang mempengaruhi keakuratan penghitungan dengan metode ini. Tetapi metode ini merupakan metode yang luas digunakan untuk menentukan jumlah bakteri hidup dalam suatu substansi.

2.8 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram digunakan untuk mengidentifikasi bakteri, terutama yang berkaitan dengan kesehatan. Hasil pewarnaan ini ada dua macam, yaitu Gram positif yang ditandai dengan terbentuknya warna ungu, dan Gram negatif yang ditandai dengan warna merah. Prinsip dasar dari pewarnaan ini adalah adanya ikatan ion antara komponen selular dari bakteri dengan senyawa aktif dari pewarna yang disebut kromogen. Terjadi ikatan ion karena adanya muatan listrik baik pada komponen seluler maupun pada pewarna. Berdasarkan adanya muatan ini maka dapat dibedakan pewarna asam dan pewarna basa. Pewarna asam dapat terjadi karena bila senyawa pewarna bermuatan negatif. Dalam kondisi pH mendekati netral dinding sel bakteri cenderung bermuatan negatif sehingga pewarna asam yang bermuatan negatif akan ditolak oleh dinding sel, maka sel tidak berwarna. Pewarna asam ini disebut pewarna negatif. Contoh pewarna asam misalnya tinta cina, larutan Nigrosin, asam pikrat, eosin dan lain-lain. Pewarnaan basa bisa terjadi bila senyawa pewarna bersifat positif, sehingga akan diikat oleh dinding sel bakteri dan sel bakteri jadi berwarna dan terlihat. Contoh dari pewarna basa misalnya metilin biru, kristal violet, safranin dan lain-lain.

Teknik pewarnaan asam basa ini hanya menggunakan satu jenis senyawa pewarna, teknik ini disebut pewarna sederhana. Pewarnaan sederhana ini diperlukan untuk mengamati morfologi, baik bentuk maupun susunan sel. Teknik

pewarnaan yang lain adalah pewarnaan diferensial, yang menggunakan senyawa pewarna yang lebih dari satu jenis. Pewarnaan Gram diperlukan untuk mengelompokkan bakteri menjadi bakteri gram positif dan bakteri gram negatif atau bakteri tahan asam dan tidak tahan asam. Selain itu, teknik ini diperlukan untuk mengamati struktur bakteri seperti flagela, kapsula, spora dan nukleus. Perbedaan dasar antara bakteri gram positif dan negatif adalah pada komponen dinding selnya. Kompleks zat iodine akan terperangkap antara dinding sel dan membran sitoplasma organisme gram positif. Bakteri Gram positif memiliki membran tunggal yang dilapisi peptidoglikan yang tebal (25-50nm), sedangkan bakteri Gram negatif memiliki lapisan peptidoglikogen yang tipis (1-3 nm). Berikut ini adalah tabel perbandingan antara bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif.

Tabel 2.10. Perbandingan bakteri Gram positif dan Gram negatif.

Sifat	Gram positif	Gram negatif
Komposisi dinding sel	Kandungan lipid rendah	Lipid tinggi
Ketahanan terhadap penisilin	Lebih sensitif	Lebih tahan
Penghambatan warna basa	Lebih dihambat	Kurang dihambat
Kebutuhan nutrisi	Kompleks	Relatif sederhana
Ketahanan terhadap perlakuan fisik	Lebih tahan	Kurang tahan

Sumber : Ruli, 2008

Genus bakteri yang termasuk Gram negatif adalah *Enterobacteriaceae*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *E. Coli*, *Yersinia enterocolitica*. Sedangkan bakteri Gram positif adalah *Staphylococci*, *Streptococci*, *Enterococci*, *Clostridium*, *Bacillus*. Proses pewarnaan diferensial ini memerlukan 4 jenis reagen. Bakteri terbagi atas dua kelompok berdasarkan pewarnaan ini, yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Perbedaan ini berdasarkan warna yang dapat dipertahankan bakteri. Reagen pertama disebut warna dasar, berupa pewarna basa,

jadi pewarna ini akan mewarnai dengan jelas. Reagen kedua disebut bahan pencuci warna (decolorizing agent). Tercuci-tidaknya warna dasar tergantung pada komposisi dinding sel, bila komponen dinding sel kuat mengikat warna maka warna tidak akan tercuci. Sedangkan bila komponen dinding sel tidak kuat menahan warna dasar, maka warna akan tercuci. Reagen terakhir adalah warna pembanding, bila warna tidak tercuci maka warna pembanding akan terlihat dan jika warna dasar tidak tercuci maka yang terlihat pada hasil akhir tetap warna dasar.

Pewarnaan Gram menggunakan 4 pereaksi yang berbeda dan dilakukan melalui empat tahap kerja berikut ini:

1. Warna dasar kristal violet, dimana semua sel memberikan warna ungu.
2. Pengikat warna dasar dengan pereaksi iodine atau lugol (penguat warna atau mordant) akan terbentuk kompleks kristal violet-iodine (CV-I) yang sukar larut, dan sel akan memberikan warna ungu kehitaman. Pada bakteri Gram positif, CV-I berikatan dengan Mg-asam ribonukleat dari komponen dinding sel yang tidak larut dalam alkohol.
3. Alkohol 96% sebagai dekoloran dan pelarut lemak. Pada bakteri Gram positif kandungan lemaknya sedikit sehingga mudah terbuka membentuk pori yang kemudian dapat tertutup oleh protein yang terhidrasi alkohol. Hal ini mengakibatkan kompleks CV-I dengan Mg-asam ribonukleat tetap berada di dalam sel. Sedangkan pada bakteri Gram negatif, lemaknya banyak sehingga meninggalkan pori yang besar. Akibatnya kompleks CV-I tercuci dan sel kehilangan warna.
4. Safranin sebagai zat warna lawan digunakan untuk menggantikan warna dasar yang telah hilang tercuci alkohol. Bakteri Gram negatif akan berwarna sedangkan Gram positif tidak berwarna.

Teori Salton menjelaskan bahwa ada konsentrasi lipid yang tinggi pada dinding sel bakteri Gram negatif, sehingga jika lipid dilarutkan dalam pemberian alkohol maka pori-pori akan membesar dan tidak mengikat pewarna. Hal ini menyebabkan bakteri menjadi tidak berwarna. Sedangkan bakteri Gram positif akan mengalami denaturasi selama pemberian alkohol. Hal ini akan mengecilkan pori-pori sehingga menghasilkan kompleks kristal iodum. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang kuat dan lapisan peptidoglikan sebanyak 30 lapisan sehingga permeabilitas dinding selnya menjadi berkurang. Sedangkan bakteri Gram negatif hanya memiliki 1-2 lapisan peptidoglikan sehingga memiliki permeabilitas dinding sel yang lebih besar (*Ruly, 2008*).

2.9 Media Nutrien Agar

Di dalam ilmu bakteriologi, terdapat berbagai jenis medium. Salah satunya adalah medium Nutrien Agar (NA). Medium NA merupakan medium yang kompleks karena mengandung bahan-bahan yang tidak diketahui jumlah atau jenis nutrisi yang terkandung di dalamnya. Medium NA mengandung ekstrak daging sapi (0,3%), pepton (0,5%), dan agar-agar (1,5%) dalam air. Ekstrak daging sapi dan pepton mengandung campuran dari asam-asam amino dan peptida. Ekstrak daging sapi juga mengandung air, asam nukleat, lemak, polisakarida, vitamin, dan mineral. Meskipun jenis zat gizi yang terkandung dalam ekstrak daging sapi dapat diketahui, tetapi jumlah dari tiap zat gizi tersebut tidak dapat ditentukan secara kimia. Selain itu, campuran dari pepton dan ekstrak daging sapi ini juga mengandung ekstrak ragi, tripton, dan lain-lain. Kompleksan zat nutrisi dari medium ini menyebabkan medium NA dapat digunakan untuk menumbuhkan berbagai jenis mikroba. Fungsi agar-agar pada medium ini adalah sebagai zat pematat. Agar-agar merupakan zat pematat yang

baik sekali karena dapat larut pada suhu $<100^{\circ}\text{C}$ dan membeku kembali pada suhu 45°C .

Medium NA biasa digunakan untuk uji mikrobiologi pada air dan produk susu. NA juga sering digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme yang tidak selektif (mikroorganisme heterotrof). Media ini merupakan media sederhana yang dibuat dari ekstrak daging sapi, pepton, dan agar. NA merupakan salah satu media yang umum digunakan dalam uji mikroba dari air, *sewage*, produk pangan, pembuatan stok kultur, dan untuk mengisolasi organisme dari kultur murninya. Adapun komposisi Nutrien Agar yang biasa dibuat adalah ekstrak daging sapi 10 g, pepton 10 g, NaCl 5 g, akuades 1.000 ml dan 15 g agar/L. Semua bahan dicampurkan kemudian dididihkan dan dimasukkan ke wadah yang sesuai dengan kebutuhan, lalu disterilisasi dengan autoklaf pada 121°C selama 15 menit (Sumarsih, 2007).

2.10 Penilaian Organoleptik

Pengujian organoleptik adalah pengujian yang didasarkan pada proses pengindraan. Pengindraan diartikan sebagai suatu proses fisio-psikologis, yaitu kesadaran atau pengenalan alat indra akan sifat-sifat benda karena adanya rangsangan yang diterima alat indra yang berasal dari benda tersebut. Pengindraan dapat juga berarti reaksi mental (sensation) jika alat indra mendapat rangsangan (stimulus). Reaksi atau kesan yang ditimbulkan karena adanya rangsangan dapat berupa sikap untuk mendekati atau menjauhi, menyukai atau tidak menyukai akan benda penyebab rangsangan.

2.10.1 Panelis

Pelaksanaan uji organoleptik memerlukan paling tidak dua pihak yang bekerja sama, yaitu panel dan pelaksana kegiatan pengujian. Keduanya berperan

penting dan harus bekerja sama, sehingga proses pengujian dapat berjalan dan memenuhi kaidah obyektivitas dan ketepatan. Panel adalah seseorang atau sekelompok orang yang bertugas melakukan proses pengindraan dalam uji organoleptik, sedangkan orangnya disebut panelis. Terdapat lima macam panel, yaitu panel pencicip perorangan, panel pencicip terbatas, panel terlatih, panel tidak terlatih dan panel konsumen (*Wagiyono, 2003*).

Panel pencicip perorangan disebut juga pencicip tradisional, memiliki kepekaan indrawi yang sangat tinggi. Keistimewaan pencicip ini adalah dalam waktu yang sangat singkat dapat menilai mutu dengan tepat, bahkan dapat menilai pengaruh dari proses yang dilakukan dan penggunaan bahan baku. Kelemahan pencicip perorangan adalah hasil uji berupa keputusan yang mutlak, ada kemungkinan terjadi bias atau kecenderungan dapat menyebabkan pengujian tidak tepat karena tidak ada kontrol atau pembandingnya. Target pengujian sangat tergantung pada seseorang, jika ada gangguan kesehatan atau faktor yang mempengaruhi kepekaan panelis, jalannya pengujian akan terhambat. Panel perorangan kemampuannya biasanya spesialis untuk satu jenis komoditas tetapi lengkap.

Panel pencicip terbatas beranggotakan 3 sampai 5 orang panelis yang memiliki tingkat kepekaan tinggi, berpengalaman, terlatih dan kompeten untuk menilai beberapa atribut mutu organoleptik atau kompeten untuk beberapa komoditas. Panel ini dapat mengurangi faktor bias dalam menilai mutu dan tingkat ketergantungannya hanya pada seseorang lebih kecil. Hasil penilaian adalah kesepakatan dari anggota panel. Kemampuan dalam melakukan pengujian

sampai dengan uji yang bersifat diskriptis (menyeluruh) terhadap semua atribut mutu dan juga untuk beberapa komoditas atau produk. Kelemahannya jika terdapat dominasi diantara anggota panel.

Panel terlatih adalah panel yang anggotanya 15-25 orang berasal dari personal laboratorium atau pegawai yang telah terlatih secara khusus untuk kegiatan pengujian. Kemampuannya terbatas pada uji yang masih parsial (tidak menyeluruh pada semua atribut mutu). Hasil pengujian diperoleh dari pengolahan data secara statistika, sehingga untuk beberapa jenis uji sangat tepat dan dapat bersifat representatif (mewakili). Pengujian yang dapat diterapkan pada panel ini diantaranya adalah uji pembedaan, uji perbandingan dan uji penjenjangan (ranking).

Panel tak terlatih adalah panel yang anggotanya tidak tetap, dapat dari karyawan atau bahkan tamu yang datang keperusahaan. Seleksi hanya terbatas pada latar belakang sosial bukan pada tingkat kepekaan indrawi individu. Panel ini biasanya hanya digunakan untuk uji kesukaan (*preference test*).

Anggota panel adalah orang yang secara khusus memiliki kemampuan yang lebih diantara orang kebanyakan. Kelebihan mereka adalah dalam hal penilaian terhadap suatu produk untuk menentukan mutunya secara indrawi. Kemampuan ini tidak bisa muncul begitu saja tetapi perlu ada upaya untuk memunculkannya, dalam arti bahwa seseorang mungkin telah memiliki bakat terpendam maka perlu dilatih. Untuk menjadi anggota panel harus memenuhi persyaratan diantaranya adalah memiliki kepekaan indrawi yang baik,

berpengetahuan luas tentang komoditas atau produk yang diuji, memiliki ketertarikan pada bidang pengujian serta memiliki kemampuan ilmu-ilmu dasar.

Anggota panel tidak semua harus diseleksi, bahkan untuk tujuan tertentu justru panel ini harus berasal dari semua kalangan dan bersifat acak. Misalnya untuk panel konsumen, tidak perlu ada seleksi. Beberapa jenis panel, anggota timnya harus diseleksi secara ketat dengan berbagai persyaratan kemampuan dan ada seleksi yang hanya terbatas pada aspek sosial panelis, misalnya untuk panel wakil konsumen. Seleksi dilakukan pada orang yang memenuhi kriteria, yaitu :

- a) Orang tersebut memiliki perhatian yang cukup baik pada uji organoleptik
- b) Ketersediaan dan memiliki waktu yang cukup untuk berlatih tentang pengujian organoleptik
- c) Memiliki pengetahuan, keterampilan dasar yang cukup dalam hal prinsip analisis, sistem dan prosedur, kriteria spesifik bahan/produk, persiapan, faktor fisio-psikologis kepekaan indrawi, komponen bahan dan pengaruhnya pada atribut organoleptik bahan, hasil analisis faktornya, serta dokumen dan pelaporan atas pelaksanaan tugas.

2.10.2 Uji Penerimaan (*Acceptance Test*)

Uji penerimaan menyangkut penilaian seseorang akan suatu sifat atau kualitas suatu bahan yang menyebabkan orang menyenangi. Uji penerimaan lebih subyektif daripada uji pembedaan. Karena sifatnya yang sangat subyektif itu beberapa panelis yang mempunyai kecenderungan ekstrim senang atau benci terhadap suatu komoditi atau bahan tidak dapat digunakan untuk melakukan uji penerimaan. Tetapi panelis orang ekstrim ini mungkin masih dapat digunakan

untuk menilai dengan uji perbedaan. Pada uji penerimaan dapat dilakukan menggunakan panelis yang belum berpengalaman sekalipun dan tidak ada contoh pembandingan atau contoh baku. Selain itu, panelis dilarang mengingat–ingat atau membandingkan dengan contoh yang diuji sebelumnya. Tanggapan harus diberikan segera dan secara spontan. Bahkan tanggapan yang sudah diberikan tidak boleh ditarik kembali meskipun kemudian timbul keraguan.

Tanggapan senang atau suka adalah sangat pribadi karena itu kesan seseorang tak dapat digunakan sebagai petunjuk tentang penerimaan dari sesuatu komoditi. Tujuan uji penerimaan adalah mengetahui apakah suatu komoditi atau suatu sifat sensorik tertentu dapat diterima oleh masyarakat. Karena itu tanggapan senang atau suka harus pula diperoleh dari sekelompok orang yang dapat mewakili pendapat umum atau mewakili suatu populasi masyarakat tertentu. Dalam kelompok uji penerimaan ini termasuk uji kesukaan, dan uji mutu hedonik.

1) Uji kesukaan

Uji kesukaan ini disebut juga uji hedonik. Pada pengujian ini panelis bertugas untuk mengemukakan tanggapan pribadinya (suka/tidak suka), sehingga diperoleh tingkat kesukaan. Tingkat-tingkat kesukaan ini disebut sebagai skala hedonik yang dapat direntangkan dan diciutkan menurut rentangan skala yang dikehendaki. Skala-skala ini kemudian ditransformasikan menjadi skala numerik dengan angka menaik menurut tingkat kesukaan sehingga diperoleh data numerik. Data-data tersebut diinterpretasikan dengan menggunakan analisis statistik.

Secara tidak langsung uji hedonik dapat digunakan untuk mengetahui perbedaan dari dari suatu produk. Uji ini paling sering digunakan untuk menilai secara organoleptik terhadap komoditi/produk hasil pengembangan.

Berikut ini adalah contoh skala hedonik dengan skala numeriknya (*Susiwi, 2009*).

Tabel 2.11. Skala hedonik dengan skala numeriknya

Skala Hedonik	Skala Numerik
Amat sangat suka	7
Sangat suka	6
Suka	5
Agak suka	4
Agak tidak suka	3
Tidak suka	2
Sangat tidak suka	1
7 Skala Hedonik	

Sumber : *Susiwi, 2009*

2) Uji mutu hedonik

Beberapa ahli memasukkan uji mutu hedonik ke dalam uji hedonik. Pada pengujian ini para panelis bertugas untuk menyatakan kesan pribadi tentang baik/buruk-nya suatu produk, sehingga diperoleh kesan mutu hedonik. Kesan ini lebih spesifik dari sekedar kesan suka/tidak suka dan dapat bersifat umum (misal empuk-keras untuk daging; pulen-pera untuk nasi). Dari kesan-kesan ini dapat diperoleh suatu rentang skala hedonik yang berkisar dari ekstrim baik ke ekstrim jelek.

Skala uji mutu hedonik memiliki 3 ciri, yaitu sesuai dengan tingkat mutu hedonik, tingkat skala bervariasi (tergantung rentang mutu yang diinginkan dan sensitivitas antar skala), dan dapat berarah satu atau berarah dua. Skala-skala ini kemudian ditransformasikan menjadi skala numerik sehingga diperoleh data numerik. Data-data tersebut diinterpretasikan dengan

menggunakan analisis statistik. Berikut ini adalah contoh skala uji mutu hedonik dengan skala numeriknya (*Susiwi, 2009*).

Tabel 2.12. Skala uji mutu hedonik dengan skala numeriknya

Skala Hedonik	Skala Numerik
Enak luar biasa	4
Sangat enak	3
Enak	2
Agak enak	1
Tidak enak	0
5 Skala, Berarah Satu	

Sumber : *Susiwi, 2009*

2.10.3 Pengujian Diskripsi

Pengujian diskripsi merupakan penilaian sensorik yang didasarkan pada sifat-sifat sensorik yang lebih kompleks dan meliputi banyak sifat-sifat sensorik (*Esvandiar, 2009*). Penggunaan analisa diskripsi dalam industri pangan adalah:

- 1) Menilai pengembangan produk.
 - Menilai mutu produk baru terhadap produk lama
 - Mutu produk terhadap produk saingannya
 - Pengaruh penanganan terhadap suatu produk
 - Pengaruh beberapa perubahan dalam pengolahan
- 2) Mempertahankan/ menyeragamkan mutu produk.

Dapat mengetahui penyebab perubahan/ketidakteragaman, sehingga dapat segera dilakukan tindakan pembetulan.

- 3) Sebagai analisa diagnosa.

Jika pasaran suatu produk mundur, dengan analisa ini dapat didiagnosa penyebab kemunduran, misalnya karena mutu produk menurun atau sebagainya.

4) Pengukuran pengawasan mutu.

- Memberikan profil mutu suatu komoditi
- Mengetahui mutu hasil pengolahan
- Sebagai alat pengukur mutu, apakah mutu mengalami penyimpangan dari waktu ke waktu.

2.10.4 Aplikasi Penggunaan Uji Organoleptik

Beberapa masalah yang memerlukan informasi/pemecahan dari segi organoleptik antara lain pengembangan produk baru, perbaikan produk, penyesuaian proses, mempertahankan mutu, daya simpan, pengkelasan mutu, pemilihan produk/bahan terbaik, uji pemasaran, dan kesukaan konsumen.

2.11 Umur Simpan

Umur simpan atau waktu kadaluarsa adalah waktu yang diperlukan oleh produk pangan dalam kondisi penyimpanan untuk sampai pada suatu tingkatan degradasi mutu tertentu (*Susiwi, 2009*). Degradasi mutu ditandai dengan terjadinya reaksi deteriorasi, yaitu reaksi penyimpangan suatu produk bahan pangan dari mutu awalnya. Reaksi ini disebabkan oleh beberapa faktor seperti oksigen, uap air, cahaya, mikroorganisme, penanganan secara kasar, dan bahan kimia toksik/bahan kimia *off-flavor*. Faktor-faktor tersebut menyebabkan perubahan-perubahan pada produk bahan pangan seperti perubahan sifat tekstur, rasa, warna, aroma, dan mikrobiologis.

Umur simpan setiap bahan pangan berbeda-beda dan untuk menentukan lamanya umur tersebut dapat dilakukan analisa organoleptik yaitu menggunakan uji indera/sensorik. Pengukuran umur simpan ini dilakukan dengan dua metode, yaitu *Extended Storage Studies (ESS)* dan *Accelerated Storage Studies (ASS)*.

2.11.1 *Extended Storage Studies (ESS)*

Metode ini merupakan metode konvensional dan lebih tepat diaplikasikan pada produk dengan waktu kadaluarsa <3bulan. Berikut adalah langkah-langkah penentuan umur simpan dengan menggunakan metode ini.

- 1) Satu seri dari suatu produk disimpan dalam gudang, kemudian kondisi lingkungan gudang diatur sedemikian rupa menjadi kondisi normal sehari-hari.
- 2) Penurunan mutu dari produk tersebut diamati tiap minggu menggunakan uji sensorik. Pengujian organoleptik ini menggunakan rancangan *Partially Staggered Design* dan uji yang dilakukan adalah uji hedonik dengan 7 skala rating (*Susiwi, 2007*). Berikut ini adalah tabel skala hedonik dan skala numeriknya.

Tabel 2.13. Skala rating uji hedonik dengan skala numeriknya

Skala Hedonik	Skala Numerik
None	1
Very slight	2
Slight	3
Moderate	4
Moderately strong	5
Strong	6
Very strong	7

Sumber : *Susiwi, 2009*

Pada tabel di atas, ditetapkan batas kadaluarsa dengan skor *cut-off* = 2,5. Data yang dihasilkan dari analisis ini diolah menggunakan statistika regresi sederhana.

- 3) Setelah dicapai suatu tingkatan mutu kadaluarsa, selanjutnya dapat ditentukan tanggal kadaluarsanya.

2.11.2 Accelerated Storage Studies (ASS)

Berbeda halnya dengan ESS, dalam metode ini produk diberikan suatu kondisi lingkungan yang ekstrim tapi terkontrol sehingga mempercepat tingkat kerusakan produk. Metode ini biasanya diterapkan pada produk kering dan dilakukan dengan dua cara, yaitu pendekatan kadar air kritis dan pendekatan semi empiris.

1) Pendekatan kadar air kritis

Pada pendekatan ini, kelembaban relatif di tempat penyimpanan produk diatur seekstrim mungkin. Perubahan-perubahan mutu pada produk selanjutnya diprediksi dengan menggunakan persamaan matematik, persamaan ini digunakan atas dasar deskripsi kuantitatif sistem yang meliputi produk, bahan pengemas, dan lingkungan.

2) Pendekatan semi empiris

Berbeda halnya dengan pendekatan kadar air kritis, pendekatan ini menggunakan teori kinetika yang hanya mengukur perubahan konsentrasi produk intermediet terhadap waktu sedangkan kondisi mutlak awal dan akhir produk tidak dianalisis.