



HINDRATI HARSONO

**PENGARUH COKELAT DALAM AIR SUSU SEGAR  
TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI COLIFORM**



**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

1986

PENGARUH COKELAT DALAM AIR SUSU SEGAR  
TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI COLIFORM

S K R I P S I

DISERAHKAN KEPADA FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA UNTUK MEMENUHI  
SEBAGIAN SYARAT DALAM MEMPEROLEH  
GELAR DOKTER HEWAN

OLEH :

HINDRATI HARSONO

SURABAYA - JAWA TIMUR



Drh. GARRY CORRES de VRIES, MS.

PEMBIMBING UTAMA



Drh. HARIO PUNTODEWO, M.App.Sc.

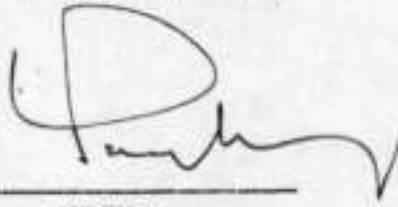
PEMBIMBING KEDUA

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

1986

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh,  
Kami berpendapat bahwa tulisan ini baik scope maupun kua-  
litasnya memenuhi syarat untuk diajukan sebagai skripsi  
guna memperoleh gelar Dokter Hewan.

PANITIA PENGUJI



KETUA



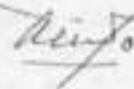
SEKRETARIS



ANGGOTA



ANGGOTA



ANGGOTA



ANGGOTA

## KATA PENGANTAR

Segala puji syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat-Nya hingga penulisan skripsi dapat selesai. Penulisan skripsi merupakan kewajiban dan pertanggungjawaban penulis kepada almamater tercinta atas ilmu yang telah diberikan.

Skripsi ini merupakan hasil penelitian yang telah penulis laksanakan sejak tanggal 17 Febzueri 1986 sampai tanggal 16 April 1986 di Laboratorium Kesehatan Susu dan Daging, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Dengan selesainya penelitian dan penulisan skripsi maka penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Bapak Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Bapak Drh. Garry Cores de Vries, MS selaku pembimbing I, Bapak Drh. Hario Puntodewo, M.App. Sc selaku pembimbing II dan tak lupa pula penulis sampaikan terimakasih kepada ibu Drh. Rini Soehartojo selaku kepala Laboratorium Kesehatan Susu dan Daging, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, juga seluruh staf karyawan laboratorium dan rekan-rekan mahasiswa yang telah banyak memberi dorongan moril hingga penelitian dan penulisan skripsi dapat selesai.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih banyak kekurangan dan ketidaksempurnaan. Namun

dengan kerendahan hati penulis berharap semoga skripsi ini berguna bagi Fakultas Kedokteran Hewan pada umumnya dan Bagian Kesehatan Masyarakat pada khususnya.

Surabaya, 1 Desember 1986

Penulis.

## DAFTAR ISI

	halaman
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
BAB I P E N D A H U L U A N.....	1
1.1 Latar Belakang Permasalahan.....	1
1.2 Identifikasi Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
1.5 Kerangka Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Bahan Tambahan Makanan.....	6
2.2 Cokelat sebagai Bahan Tambahan Mekan an.....	7
2.3 Komposisi Cokelat.....	9
2.4 Air Susu sebagai Bahan Makanan.....	10
2.5 Kontaminasi Bakteri Di dalam Air Susu	10
2.6 Bakteri Coliform.....	12
2.7 Pertumbuhan Bakteri Coliform.....	15
2.8 Metode Penentuan dan Penghitungan Bak teri Coliform dan Bakteri <u>Escherichia</u> <u>coli</u> .....	16
2.9 Penilaian Organoleptik.....	18



BAB III MATERI DAN METODOLOGI PENELITIAN.....	19
3.1 Materi Penelitian.....	19
3.1.1 Sampel Penelitian.....	19
3.1.2 Cokelat (Cocoa powder).....	19
3.1.3 Media dan Zat Kimia.....	20
3.1.4 Alat-alat.....	21
3.2 Metodologi Penelitian dan Rancangan Per cobaan.....	21
3.3 Cara Kerja.....	21
3.3.1 Pembuatan sampel air susu cokelat dalam berbagai konsentrasi.....	22
3.3.2 Pemupukan pada media Brilliant Green Bile Broth 2%.....	23
3.3.2 Pemupukan pada media Eosin Methy- lene Blue agar.....	24
3.3.4 Pemupukan dalam larutan Pepton 1% untuk media dalam uji Indol.....	25
3.4 Pewarnaan Gram untuk pemeriksaan Mikros kopis.....	26
3.5 Dilakukan Uji Rasa.....	27
3.6 Pembuatan media.....	27
3.6.1 Brilliant Green Bile Broth 2% (Difco, B7).....	27

3.6.2 Eosin Methylene Blue agar (Difco, B 76).....	28
3.6.3 Larutan Pepton 1% (Oxoid, code CM 9).....	29
3.6.4 Reagen Kovsch.....	29
3.7 Kriteria penentuan bakteri Coliform dan bakteri <u>Escherichia coli</u> , serta penghitungan jumlah kemungkinan tertinggi bakteri di dalam tiap mililiter sampel....	30
3.8 Analisa Statistik.....	31
BAB IV HASIL PENELITIAN.....	36
4.1 Jumlah kemungkinan tertinggi bakteri <u>Coliform</u> pada cokelat.....	36
4.2 Jumlah kemungkinan tertinggi bakteri <u>Coliform</u> di dalam air susu segar dan air susu cokelat.....	37
4.3 Jumlah kemungkinan tertinggi bakteri <u>Escherichia coli</u> di dalam air susu segar dan air susu cokelat.....	37
4.4 Jumlah kemungkinan tertinggi bakteri <u>Coliform non Escherichia coli</u> di dalam air susu segar dan air susu cokelat....	38
4.5 Prosentase penurunan jumlah rata-rata bakteri Coliform di dalam air susu segar setelah diberi cokelat.....	42



4.6	Prosentase penurunan jumlah rata-rata bakteri <u>Escherichia coli</u> di dalam air susu segar setelah diberi cokelat....	42
4.7	Prosentase penurunan jumlah rata-rata bakteri Coliform non <u>Escherichia Coli</u> di dalam air susu segar setelah diberi cokelat.....	42
4.8	Hasil Analisa Statistik.....	43
4.9	Dari uji Rasa menurut kesukaan terhadap air susu cokelat dalam berbagai konsentrasi, diperoleh hasil.....	45
BAB V	P E M B A H A S A N.....	46
BAB VI	K E S I M P U L A N.....	52
BAB VII	S A R A N.....	53
BAB VIII	R I N G K A S A N.....	54
	DAFTAR KEPUSTAKAAN.....	56

## DAFTAR TABEL

halaman

Tabel :

I	Jumlah bakteri Coliform di dalam setiap mililiter larutan cokelat 2%.....	36
II	Jumlah bakteri Coliform di dalam setiap mililiter air susu segar dan air susu yang diberi cokelat 2%, 4%, 5% dan 6%..	39
III	Jumlah bakteri <u>Escherichia coli</u> di dalam setiap mililiter air susu segar dan air susu yang diberi cokelat 2%, 4%, 5% dan 6%.....	40
IV	Jumlah bakteri Coliform non <u>Escherichia coli</u> di dalam setiap mililiter air susu segar dan air susu yang diberi cokelat 2%, 4%, 5% dan 6%.....	41

## DAFTAR LAMPIRAN

halaman

Lampiran :

I	Skema metode Most Probable Number.....	62
II	Perhitungan jumlah kemungkinan tertinggi bakteri Coliform di dalam air susu segar dan air susu cokelat.....	64
III	Pernitungan prosentase tingkat kesukaan dari uji Rasa.....	69
IV	Tabel Mc Cready's.....	71

## BAB I

### P E N D A H U L U A N

#### 1.1 Latar Belakang Permasalahan

Bahan pangan merupakan bahan pokok bagi kehidupan manusia, sebab tanpa itu manusia tidak akan dapat hidup. Dahulu manusia memperoleh segala macam kebutuhan pangan dari persediaan alam dalam bentuk murni, tanpa campuran apapun. Bush-bushan tidak perlu dikalengkan dan demikian pula air susu diperah langsung dari binatang piaraannya.

Menurut Hadiwijoto (1982), sejalan dengan makin padatnya penduduk dunia, maka kebutuhan akan pangan menjadi makin meningkat. Orang mulai mencari jalan untuk mengatasi segala macam kesulitan dengan berbagai cara. Meningkatkan produksi, mengawetkan makanan dan mencari sumber baru. Tidak jarang cara yang digunakan dapat merugikan orang lain, karena kode etik keamanan dan kesehatan banyak dilanggar. Banyak bahan makanan dipalsukan, tidak diperhatikan ke-murnian, mutu dan keasliannya, banyak digunakan bahan-bahan pembungkus, bahan-bahan tambahan yang tidak memenuhi syarat bahkan kadang-kadang sangat berbahaya.

Adnan (1984), menyatakan bahwa air susu merupa

kan salah satu bahan makanan yang tidak lepas dari pemalsuan, sehingga banyak masalah yang dihadapi dalam penggunaan, penyimpanan dan pengolahan air susu. Masalah tersebut dapat diatasi terutama bila mengetahui faktor-faktor yang menyebabkan perubahan-perubahan susunan kimia air susu. Menurut Eckles et al., (1980), perubahan-perubahan air susu terutama disebabkan oleh bakteri yang ada di dalam air susu. Bakteri tersebut dapat berasal dari ambing sapi yang diperah atau pencemaran dari lingkungan sebelum dan sesudah pemerahan air susu.

Air susu merupakan makanan yang bernilai gizi tinggi, karena mengandung zat-zat makanan seperti lemak, protein, karbohidrat, vitamin, enzim dan garam-garam mineral. Zat-zat makanan tersebut di dalam air susu tersusun dalam perbandingan yang serasi dan sempurna, sehingga air susu mudah dicerna dan diserap oleh tubuh (Sedisoetama, 1976).

Dikatakan oleh Buckle et al., (1978), bahwa air susu segar itu tidak steril, dan merupakan media yang baik bagi pertumbuhan bakteri. Oleh karena itu minum air susu segar dapat menimbulkan resiko bagi kesehatan konsumen. Akan tetapi menurut Lampert (1965) dan Jay (1978), sebagian konsumen lebih suka minum air susu segar daripada air susu yang telah di

masak. Karena mereka menganggap air susu segar itu mempunyai nilai gizi yang lebih tinggi. Hal ini sesuai dengan yang dikatakan oleh Ressay dan Nasution (1982), bahwa nilai gizi air susu dapat berkurang akibat pemanasan pada waktu air susu dimasak.

Bertitik tolak pada masalah diatas maka menggerakkan peneliti untuk mencoba menambah coklat kedalam air susu segar, yang menurut literatur coklat bersifat bakterisid. Sehingga air susu dapat diminum dalam keadaan segar tanpa menimbulkan resiko bagi kesehatan konsumen dan tidak mengurangi nilai gizi air susu.

## 1.2 Identifikasi Masalah.

- 1.2.1 Sampai seberapa jauh pengaruh coklat di dalam air susu segar hingga dapat melindungi konsumen.
- 1.2.2 Berapa konsentrasi coklat yang diperlukan untuk maksud tersebut.
- 1.2.3 Efek yang terjadi pada penambahan coklat kedalam air susu segar ditinjau dari segi rasa.

## 1.3 Tujuan Penelitian.

- 1.3.1 Mengetahui sampai dimana pengaruh penambahan coklat kedalam air susu segar terhadap bakteri Coliform dan bakteri Escherichia coli.
- 1.3.2 Mengetahui besarnya konsentrasi coklat yang diper



lukan untuk maksud tersebut.

1.3.3 Mengetahui efek penambahan cokelat kedalam air susu bila ditinjau dari segi rasa.

1.4 Manfaat Penelitian.

1.4.1 Hasil penelitian ini dapat memberi informasi kepada masyarakat tentang efek penambahan cokelat kedalam air susu segar.

1.4.2 Hasil penelitian ini dapat memberi informasi kepada masyarakat tentang konsentrasi cokelat yang diperlukan dalam air susu segar sehingga dapat melindungi konsumen dan dapat diterima dari segi rasa.

1.5 Kerangka Pemikiran.

Air susu merupakan makanan yang bernilai gizi tinggi karena mengandung zat-zat makanan, seperti lemak, protein, karbohidrat, enzim, vitamin dan garam-garam mineral. Tetapi ada pendapat yang mengatakan bahwa nilai gizi air susu dapat berkurang akibat pemanasan pada waktu air susu dimasak, sehingga ada sebagian konsumen yang suka minum air susu dalam keadaan segar. Padahal minum air susu segar dapat menimbulkan resiko bagi kesehatan konsumen, karena air susu segar tidak steril dan merupakan media yang baik bagi pertumbuhan bakteri. Berdasarkan pemikiran tersebut maka peneliti mencoba menambah cokelat kedalam

air susu segar, yang menurut literatur cokelat dapat bersifat bakterisid karena adanya anthocyanin sehingga air susu dapat diminum dalam keadaan segar tanpa menimbulkan resiko bagi kesehatan konsumen dan tidak mengurangi nilai gizi dari air susu. Dari pemikiran tersebut dapat dibuat asumsi sebagai berikut :

- Terdapat perbedaan pengaruh penambahan cokelat kedalam air susu segar terhadap pertumbuhan bakteri Coliform.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Bahan Tambahan Makanan

Makanan mempunyai peranan penting dalam kesehatan masyarakat, oleh karena itu dalam pengolahan makanan perlu dihindari penggunaan bahan tambahan makanan yang dapat merugikan atau membahayakan kesehatan masyarakat (Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia, nomor 235 tahun 1979).

Menurut Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia, nomor 329 tahun 1976, yang dimaksud dengan bahan tambahan makanan adalah bahan yang ditambahkan pada pengolahan makanan untuk meningkatkan mutu, termasuk pewarna, penyedap rasa dan aroma, pematang, antioksidan, anti-gumpal, pengawet, pengemulsi, pematang, pemucat dan pengental.

Winarno dkk (1984), menyatakan bahwa definisi tentang bahan tambahan makanan telah ditetapkan sejak tahun 1956 di Roma dalam kongres Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) dan "Food and Agriculture Organization" (FAO) sebagai berikut : bahan tambahan makanan adalah bahan-bahan yang ditambahkan dengan sengaja kedalam makanan dalam jumlah sedikit, yaitu untuk memperbaiki warna, bentuk, cita-rasa, tekstur a-

tau memperpanjang masa simpan. Adapun bahan tambahan makanan yang digunakan harus mempunyai sifat-sifat sebagai berikut : dapat mempertahankan nilai gizi makanan, tidak mengurangi zat-zat essensial dalam makanan, dapat mempertahankan atau memperbaiki mutu makanan dan menarik bagi konsumen, tetapi tidak merupakan suatu penipuan.

Menurut Wriser et al., (1976), pemberian bahan tambahan makanan kedalam makanan sering digunakan sebagai bahan pelindung makanan. Yang termasuk bahan tambahan makanan itu antara lain : beberapa bahan kimia, beberapa bahan makanan yang mengandung zat-zat makanan, dan bahan-bahan lain.

## 2.2 Cokelat sebagai Bahan Tambahan Makanan.

Sebagai bahan makanan cokelat ikut memegang peranan penting dalam memenuhi kebutuhan manusia, karena cokelat banyak digunakan sebagai bahan minuman dan bahan tambahan dalam pembuatan gula-gula atau jenis makanan lain (Anonymous, 1986).

Menurut catatan Dewan Cokelat Sedunia dan "Food and Agriculture Organization" (FAO) yang dikutip oleh Siswoputranto (1978), taraf konsumsi cokedi negara-negara Asia termasuk Indonesia masih sangat rendah. Tetapi untuk masyarakat barat, cokedi

lat merupakan bahan minuman atau bahan tambahan makanan yang sangat disukai, dan merupakan salah satu bagian dalam menu makanan sehari-hari. Karena menurut Krause (1969), cokelat mempunyai nilai gizi yang tinggi, disamping rasanya yang enak. Dikatakan oleh Soedijanto (1975), bahwa penambahan cokelat ke dalam makanan dapat meningkatkan nilai gizi makanan, disamping menambah cita-rasa (Anonymous, 1975).

Menurut Krause (1969), jika cokelat ditambahkan ke dalam air susu maka nilai kalori air susu akan bertambah.

Pada tahun 1967 Oey Kam Nio dan Lu Goan Hong dari Lembaga Makanan Rakyat Jakarta memberikan analisa gizi dari 100 gram cokelat sebagai berikut : energi sebesar 298 kalori, karbohidrat 49,9 gram, protein 8 gram, lemak 23,8 gram, vitamin A 30 internasional unit, calcium 125 miligram, fosfor 715 miligram, zat besi 11,6 miligram, thiamin 0,2 miligram dan air sebesar 3,9%. Dinyatakan pula bahwa cokelat tidak mengganggu kesehatan, sehingga boleh diberikan kepada anak-anak dan orang dewasa (Anonymous, 1975).

### 2.3 Komposisi Cokelat.

Cokelat merupakan hasil fermentasi dan pengeringan dari biji bush tanaman cokelat atau Theobroma cacao Linneus (Wieland, 1972, Hill, 1974 dan Teranishi, 1978).

Dikatakan oleh Hart dan Fisher (1971), bahwa komposisi rata-rata cokelat yang telah dipisahkan dari air dan lemaknya adalah sebagai berikut : protein sebesar 25,69%, karbohidrat 17,1%, theobromin 2,21%, kafein 0,8%, abu 7,04%, serat kasar 5,16% dan sisanya sebesar 41,49% sebagian besar adalah tannin. Menurut Hill (1974), di dalam dunia obat-obatan tannin dikenal sebagai astringent dan antiseptik ringan.

Menurut Egan et al., (1981), cokelat mempunyai komposisi sebagai berikut : air, unsur nitrogen yaitu protein dan purin yang mengandung theobromin dan kafein, amylum, tannin yang merupakan anthocyanin yaitu pigmen merah pada cokelat, bahan mentega dan unsur anorganik terutama kalium dan fosfor.

Bustan dan Speck (1967), menyatakan bahwa cokelat bersifat bakterisid karena mengandung anthocyanin (Anonymous, 1968).



#### 2.4 Air Susu sebagai Bahan Makanan.

Air susu merupakan makanan yang sempurna karena mengandung hampir semua zat makanan yang diperlukan oleh tubuh. Adapun zat-zat makanan itu antara lain : karbohidrat yang terdapat sebagai lactose, asam lemak yang terdapat di dalam lemak air susu, vitamin-vitamin yang terdapat di dalam lemak air susu dan sebagian di dalam plasma susu, serta asam-asam amino yang terdapat di dalam protein air susu. Disamping nilai gizinya tinggi, air susu mudah dicerna sehingga sangat baik untuk pertumbuhan. Tetapi nilai gizi air susu itu dapat berkurang karena pemanasan (Ressang dan Nasution, 1982)

Sediaoetama (1976), menyatakan bahwa air susu boleh dianjurkan dalam semua diet, terutama diet bagi anak-anak. Karena protein air susu mempunyai nilai biologik yang tinggi dan mudah dicerna, serta lemak air susu kaya akan vitamin A dan D.

#### 2.5 Kontaminasi Bakteri Di Dalam Air Susu.

Air susu mengandung bermacam-macam unsur yang sebagian besar merupakan zat-zat makanan yang diperlukan untuk pertumbuhan bakteri, sehingga pada suhu yang sesuai air susu merupakan media yang baik bagi pertumbuhan dan perkembangan bakteri (Buckle et al.,

1978, Pelczar et al., 1978 dan Hadiwijoto, 1983).

Dikatakan oleh Sarles (1956) dan Buckle et al., (1978), bahwa air susu segar yang baru diperah tidak pernah steril. oleh karena itu pancaran pertama dari pemerahan air susu harus dibuang. Menurut Gunnison (1957), pada umumnya air susu segar selalu mengandung bakteri Coliform. Pada mulanya pencemaran didalam air susu terjadi pada waktu pemerahan, dan pencemaran selanjutnya terjadi pada waktu penanganan dan pengolahan air susu (Pelczar et al., 1978).

Dikatakan oleh Lapedes (1977), bahwa penentuan bakteri di dalam air susu segar dan hasil-hasil olah an susu perlu dilakukan. Menurut Jay (1978) dan Buckle (1979<sup>a</sup>), standar bakteri di dalam air susu segar untuk tiap negara berbeda, tergantung dari kondisi setempat. Di Australia berlaku peraturan, bahwa jumlah bakteri Coliform di dalam setiap mililiter air susu segar tidak boleh lebih dari 10 bakteri (Buckle et al., 1979<sup>a</sup>). "The United States Public Health Service Milk Ordinance and Code" menetapkan, bahwa di dalam setiap mililiter air susu segar tidak boleh mengandung lebih dari 10 bakteri. Menurut Adnan (1984), standarisasi dari negara Amerika dapat dipakai sebagai pertimbangan dalam membuat persyaratan kualitas air susu segar di Indonesia.

Menurut Hadiwijoto (1982), Winarno dan Jenie (1983), pengujian air susu terhadap bakteri Escherichia coli merupakan pengujian yang sangat penting, karena bakteri Escherichia coli banyak menimbulkan masalah kesehatan pada manusia. Dikatakan oleh Adnan (1984), bahwa terdapatnya bakteri Escherichia coli di dalam air susu selalu dikaitkan dengan terjadinya kontaminasi oleh bakteri-bakteri yang berasal dari kotoran manusia, sehingga dapat memberi kemungkinan terdapatnya bakteri patogen, seperti Salmonella typhosa dan lain-lain.

## 2.6 Bakteri Coliform.

Menurut Fishbein et al., (1976), yang dikutip oleh Speck (1976), bakteri Coliform adalah kelompok bakteri yang hidup secara aerob atau fakultatif anaerob, yang bersifat gram negatif, berbentuk batang, tidak membentuk spora dan pada suhu 35°C dalam waktu 48 jam dapat menfermentasi laktosa.

Bakteri Coliform terdiri dari beberapa genera yang terbagi dalam dua kelompok, yaitu kelompok yang dapat menfermentasi laktosa dan kelompok yang tidak dapat menfermentasi laktosa. Kelompok yang dapat menfermentasi laktosa terdiri dari empat genera, yaitu

*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* dan *Citrobacter*. Kelompok yang tidak dapat menfermentasi laktosa terdiri dari dua genera, yaitu *Serratia* dan *Edwardsiella*. Seluruh genera yang termasuk dalam anggota bakteri Coliform merupakan satu famili, yaitu Famili *Enterobacteriaceae* (Stokes, 1975 dan Freeman, 1985).

Menurut Buchanan dan Buchanan (1959), serta Buchanan dan Gibbons (1975), *Escherichia coli* dikenal juga sebagai *Bacteri coli*, *Bacillus coli* dan *Bacterium coli commune*. *Escherichia coli* berhasil diisolasi pertama kali pada tahun 1886 oleh Escherich dari tinja normal. Bakteri ini mempunyai bentuk batang pendek dengan ukuran panjang antara dua sampai empat milimikron, bersifat gram negatif, motil dengan adanya flagella, tetapi kadang-kadang juga ditemukan yang bersifat non motil. Dikatakan oleh Cruickshank et al., (1974), bahwa *Escherichia coli* selain merupakan flora normal di dalam saluran pencernaan manusia dan hewan, juga dapat ditemukan dalam air, debu dan tanah. Freeman (1985), menyatakan bahwa *Escherichia coli* mati pada pemanasan 60°C selama 30 menit, tetapi ada beberapa strain yang bersifat tahan panas sehingga masih dapat hidup.

Bakteri *Klebsiella* merupakan anggota dari kelompok bakteri Coliform yang mempunyai sifat khusus, yaitu mempunyai kapsul besar yang terbentuk dari ikatan polipeptida (Smith, 1973). Menurut Buchanan dan Gibbons (1975), bakteri *Klebsiella* merupakan flora normal didalam saluran usus besar manusia dan hewan, yang dapat juga ditemukan dalam tanah, rumput, air dan debu. Joklik et al., (1980) menyatakan, bahwa bakteri *Klebsiella pneumonia* merupakan bakteri patogen penyebab infeksi paru, yang kadang-kadang juga menyerang sistem perkemihan.

Bakteri *Enterobacter* merupakan anggota dari kelompok bakteri Coliform, yang juga dikenal sebagai bakteri *Aerobacter aerogenes* (Smith, 1973). Menurut Buchanan dan Gibbons (1975), bakteri *Enterobacter* sering ditemukan sebagai saprophyt didalam saluran usus besar manusia dan hewan. Bakteri ini dapat dibedakan dengan *Escherichia coli* melalui uji biokimiawi (Sonnenwirt dan Jarett, 1980).

Bakteri *Citrobacter* merupakan anggota dari kelompok bakteri Coliform yang mempunyai sifat biokimiawi hampir sama dengan bakteri *Salmonella*. Kemampuan bakteri ini dalam menfermentasi laktosa sangat rendah, bahkan kadang-kadang tidak menfermentasi (Smith, 1973).



Bakteri *Serratia* merupakan anggota dari kelompok bakteri Coliform yang banyak ditemukan dalam tanah, air dan tumbuh-tumbuhan. Bakteri ini dibedakan dengan anggota bakteri Coliform yang lain melalui uji biokimiawi (Smith, 1973 dan Joklik et al., 1980).

Bakteri *Edwardsiella* merupakan anggota dari kelompok bakteri Coliform yang mempunyai kemampuan membentuk Indol seperti *Escherichia coli*, tetapi tidak dapat menfermentasi laktosa (Sonnenwirt dan Jarrett, 1980, serta Joklik et al., 1980)

## 2.7 Pertumbuhan Bakteri Coliform

Kemampuan bakteri Coliform dalam menfermentasi laktosa merupakan ciri yang dipakai untuk memperkirakan adanya bakteri Coliform, meskipun ada anggota bakteri Coliform yang tidak dapat menfermentasi laktosa (Stokes, 1975). Menurut Buckle et al., (1979<sup>a</sup>), bakteri Coliform mampu tumbuh pada media yang mengandung garam empedu, yang menghambat pertumbuhan bakteri gram positif yang mungkin ada. Oleh karena itu media yang mengandung garam empedu dan laktosa dalam jumlah tertentu dapat digunakan sebagai media selektif untuk mendeteksi adanya bakteri Coliform.

Bakteri Coliform dapat tumbuh baik pada berbagai jenis media dan dapat hidup pada pH 4,4 - 9, serta masih dapat tumbuh pada suhu  $-2^{\circ}\text{C}$  dan  $50^{\circ}\text{C}$  teruta



ma Escherichia coli (Jay, 1978).

Menurut Fishbein et al., (1976), yang dikutip oleh Speck (1976), media buatan yang sering digunakan dalam mendeteksi bakteri Coliform dan bakteri Escherichia coli antara lain : Brilliant Bile Broth 2%, Mac Conkey Broth, Laktosa Broth dan masih banyak lagi media selektif yang lain. Pada media cair yang mengandung laktosa bakteri Coliform dapat tumbuh subur. Media padat yang sering digunakan untuk mendeteksi bakteri Coliform dan bakteri Escherichia coli adalah Eosin Methylene Blue Agar. Pada media Eosin Methylene Blue Agar bakteri Coliform akan tumbuh dengan membentuk koloni dalam waktu 24 sampai 48 jam pada suhu 37°C. Koloni yang tumbuh bersifat mucoid, berwarna abu-abu dan berdiameter 4 sampai 6 milimikron. Bakteri Escherichia coli pada media Eosin Methylene Blue Agar membentuk koloni yang berdiameter 2 sampai 4 milimikron dengan pusat koloni kehitam-hitaman dan berlatar belakang hijau metalik (Ewing, 1973).

## 2.8 Metode Penentuan dan Penghitungan Bakteri Coliform dan Bakteri Escherichia coli Di Dalam Air Susu.

Metode yang dipakai dalam penentuan dan penghitungan bakteri Coliform dan bakteri Escherichia coli adalah "Most Probable Number" (Anonymous, 1960).

Menurut Mayou (1976), yang dikutip oleh Speck (1976), metode "Most Probable Number" sering dipakai dalam penentuan dan penghitungan bakteri Coliform dan bakteri Escherichia coli di dalam air susu, air minum dan bahan makanan lain.

Penentuan dan penghitungan "Most Probable Number" dari bakteri Coliform dan Escherichia coli di dalam air susu atau bahan makanan lain berdasarkan pada tiga seri pengenceran sampel, dan tiap seri pengenceran merupakan kelipatan sepuluh. Masing-masing seri pengenceran terdiri dari lima ulangan, sehingga sering disebut sistem 5,5,5. Penentuan jumlah bakteri Coliform dan Escherichia coli dari tiap sampel dilakukan dengan pemupukan dari tiap seri pengenceran sampel pada media selektif, kemudian dilanjutkan dengan uji Indol. Jumlah bakteri Coliform Escherichia coli dihitung dengan menggunakan tabel Mc Crady's. Bakteri Coliform dihitung berdasarkan pertumbuhan koloni bakteri pada media Eosin Methylene Blue Agar dari tiap seri pengenceran sampel. Dan bakteri Escherichia coli dihitung berdasarkan jumlah uji Indol positif pada tiap seri pengenceran sampel. Penentuan dan penghitungan jumlah bakteri Escherichia coli dengan metode "Most Probable Number" diperlukan waktu selama 4 sampai 6 hari (Ewing, 1973).

## 2.9 Penilaian Organoleptik.

Penilaian Organoleptik atau penilaian sensorik, yaitu suatu cara penilaian dengan menggunakan indera. Penilaian ini sering digunakan untuk menilai mutu komoditi hasil pertanian atau jenis bahan makanan lain. Penilaian cara ini sangat disenangi karena dapat dilakukan secara langsung dan cepat.

Menurut Soekerto (1985), dalam melakukan penilaian organoleptik diperlukan panel yang terdiri dari orang atau kelompok orang yang bertugas menilai mutu atau sifat komoditi berdasarkan kesan subjektif.

Penilaian Organoleptik mempunyai bermacam-macam cara pengujian yang digolongkan dalam beberapa kelompok Uji Penerimaan, kelompok Uji Pembedaan dan kelompok Uji Skalar. Untuk menentukan penerimaan hasil olahan oleh konsumen maka kelompok uji yang dipakai adalah kelompok Uji Penerimaan dengan uji Kesukaan atau juga dikenal sebagai Uji Hedonik.

### BAB III

#### MATERI DAN METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan pada tanggal 17 Februari 1986 sampai tanggal 16 April 1986 di Laboratorium Kesehatan Susu dan Daging, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

#### 3.1 Materi Penelitian.

##### 3.1.1 Sampel Penelitian.

Air susu segar yang digunakan sebagai sampel penelitian diperoleh dari suatu perusahaan susu di Surabaya. Jumlah sampel yang digunakan sebanyak tujuh sampel, masing-masing sampel diberi empat macam perlakuan, yaitu dengan menambah cokelat sebanyak 2%, 4%, 5% dan 6% pada tiap-tiap sampel. Sebagai kontrol digunakan air susu segar dan larutan cokelat 2%. Kontrol air susu segar dipakai sebagai pembanding dengan air susu yang diberi tambahan cokelat, sedang kontrol larutan cokelat 2% untuk uji sterilitas dari cokelat.

##### 3.1.2 Cokelat (Cocoa powder).

Cokelat yang digunakan adalah "Cocoa Van Houten". Dalam membuat larutan air susu cokelat atau larutan cokelat 2% berdasarkan ukuran yang ditetapkan

kan oleh pabrik, yaitu 1 sendok teh penuh atau 4 gram cokelat didalam 1 cangkir atau 200 mililiter minuman, berarti konsentrasi larutan cokelat didalam minuman berdasarkan stender pabrik sebesar 2%.

### 3.1.3 Media dan zat kimia

Media dan zat-zat kimia yang digunakan dalam penelitian antara lain :

- 3.1.3.1 Brilliant Green Bile Broth 2%, sebagai media selektif untuk pertumbuhan bakteri yang termasuk dalam anggota grup Coli-serogenes dan bakteri Escherichia coli.
- 3.1.3.2 Eosin Methylene Blue agar, sebagai media untuk mengisolasi dan mendiferensiasi bakteri gram negatif yang berasal dari saluran pencernaan.
- 3.1.3.3 Larutan Pepton 1%, sebagai media dalam uji Indol.
- 3.1.3.4 Reagen Kovach, sebagai indikator dalam uji Indol.
- 3.1.3.5 Carbol Gentian Violet, Alkohol 70%, Lugol dan Safrenin untuk pewarnaan Gram dalam pemeriksaan mikroskopis.
- 3.1.3.6 Air suling steril, untuk pengencer sampel,



melarutkan cokelat dan untuk pembuatan medis.

#### 3.1.4 Alat-alat

Dalam penelitian ini diperlukan alat-alat sebagai berikut : tabung reaksi beserta raknya, tabung Durham, cawan petri, pipet ukuran 10 mililiter dan 1 mililiter, gelas beker ukuran 50 mililiter dan 800 mililiter, erlenmeyer, autoclave, incubator, sengkelit dan jarum sengkelit, neraca, bunsen, mikroskop, gelas obyek, kertas aluminium dan kertas penghisap.

#### 3.2 Metodologi Penelitian dan Rancangan Percobaan.

Metodologi penelitian yang diterapkan dalam melakukan identifikasi dan penghitungan bakteri Coliform dan bakteri Escherichia coli adalah metode "Most Probable Number" dengan tabel Mc Crady's dan Rancangan Percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap.

#### 3.3 Cara Kerja.

Cara kerja yang diterapkan pada penelitian berdasarkan metode "Most Probable Number" dari Mc Crady's yang dimodifikasi oleh Buckle et al., (1979<sup>b</sup>). Air susu segar yang digunakan sebagai sampel diambil dari suatu perusahaan susu yang ada di Surabaya de-



ngan menggunakan botol steril.

### 3.3.1 Pembuatan Sampel Air Susu Cokelat Dalam Berbagai Konsentrasi.

Sampel air susu segar diberi penambahan cokelat dibuat sebagai larutan air susu cokelat konsentrasi 2% (perlakuan I), larutan air susu cokelat konsentrasi 4%, larutan air susu cokelat konsentrasi 5% dan larutan air susu cokelat konsentrasi 6%. Kontrol I adalah air susu segar yang digunakan sebagai pembanding dengan air susu segar yang diberi cokelat (perlakuan). Kontrol II adalah larutan cokelat 2% untuk uji sterilitas dari cokelat yang digunakan dalam penelitian. Pembuatan bahan-bahan tersebut dilakukan di dalam gelas beker steril dan dibiarkan selama 1 jam dalam keadaan tertutup pada suhu kamar atau suhu 25°C sampai 30°C. Setelah 1 jam masing-masing bahan dibuat dalam 3 seri pengenceran, yaitu 1:10, 1:100 dan 1:1000. Sampel pengenceran 1:10, dibuat dengan menambahkan 1 mililiter bahan ke dalam 9 mililiter air suling steril. Sampel pengenceran 1:100, dibuat dengan menambahkan 1 mililiter sampel pengenceran 1:10 ke dalam 9 mililiter air suling steril. Sampel pengenceran 1:1000, dibuat dengan menambahkan 1 mililiter sampel pengenceran 1:100 ke dalam 9 mililiter air suling steril.

### 3.3.2 Pemupukan pada media Brilliant Green Bile Broth 2%.

Disediakan 90 buah tabung reaksi yang diisi dengan 9 mililiter Brilliant Green Bile Broth 2% dan tabung Durham. Kemudian tabung-tabung reaksi tersebut dibagi menjadi 6 kelompok dan tiap kelompok terdiri dari 15 tabung reaksi. Pembagian kelompok adalah sebagai berikut : kelompok I untuk pemupukan sampel perlakuan I, kelompok II untuk pemupukan sampel perlakuan II, kelompok III untuk pemupukan sampel perlakuan III, kelompok IV untuk pemupukan sampel perlakuan IV, kelompok V untuk pemupukan kontrol I dan kelompok VI untuk pemupukan kontrol II. Dari masing-masing kelompok dibagi menjadi 3 subkelompok, tiap subkelompok terdiri dari 5 tabung reaksi. Pembagian subkelompok adalah sebagai berikut : subkelompok A untuk pemupukan sampel pengenceran 1:10, subkelompok B untuk pemupukan sampel pengenceran 1:100 dan subkelompok C untuk pemupukan sampel pengenceran 1:1000. Cara pemupukan dilakukan dengan menambah 1 mililiter sampel kedalam tiap tabung reaksi. Untuk tiap sampel dalam satu seri pengenceran dipupuk ke

dalam 5 tabung reaksi yang termasuk dalam satu subkelompok, dengan menggunakan satu pipet steril. Selesai pemupukan semua tabung reaksi diberi tanda, kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam. Setelah masa inkubasi tiap tabung dari satu seri pengenceran diperiksa dan dilakukan pencatatan terhadap tabung-tabung reaksi yang terjadi pertumbuhan bakteri Coliform dan Escherichia coli.

### 3.3.3 Pemupukan pada media Eosin Methylene Blue Agar

Disediakan 18 cawan petri yang telah diisi dengan media Eosin Methylene Blue agar. Semua cawan petri tersebut dibagi menjadi 6 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 3 cawan petri. Pembagian kelompok adalah sebagai berikut : kelompok I untuk pemupukan bakteri dari perbenihan tabung reaksi kelompok I, kelompok II untuk pemupukan bakteri dari perbenihan tabung reaksi kelompok II, kelompok III untuk pemupukan bakteri dari perbenihan tabung reaksi kelompok III, kelompok IV untuk pemupukan bakteri dari perbenihan tabung reaksi kelompok IV, kelompok V untuk pemupukan

bakteri dari perbenihan tabung reaksi kelompok V dan kelompok VI untuk pemupukan bakteri dari perbenihan tabung reaksi kelompok VI. Tiap cawan petri dari masing-masing kelompok di bagi menjadi 5 petak, untuk memupuk bakteri dari perbenihan 5 tabung reaksi yang termasuk dalam satu seri pengenceran atau dalam satu atau dalam satu subkelompok. Pemupukan dilaku-kan secara streak dengan menggunakan sengke-lit. Selesai pemupukan semua cawan petri diberi tanda, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah masa inkubasi dilaku-kan pembacaan hasil dan penghitungan jumlah bakteri berdasarkan tabel Mc Crady's pada se-mus cawan petri dalam satu seri pengenceran, yang menunjukkan pertumbuhan bakteri Coliform.

#### 3.3.4 Pemupukan dalam larutan Pepton 1% untuk media dalam uji Indol

Disediakan beberapa tabung reaksi yang diisi dengan 9 mililiter larutan Pepton ste-ril. Pada setiap cawan petri yang menunjukkan pertumbuhan koloni bakteri, dilakukan pemupuk-an kedalam tabung- tabung reaksi yang telah disediakan tersebut, dengan menggunakan jarum

sengkelit. Selesai pemupukan semua tabung reaksi diberi tanda, kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Setelah masa inkubasi semua tabung reaksi ditetesi dengan reagen Kovach sebanyak 0,3 mililiter sambil digoyang-goyang, agar reaksi terjadi secara sempurna. Uji Indol positif ditandai dengan terbentuknya warna merah pada permukaan atas larutan Pepton. Semua tabung yang menunjukkan reaksi positif dicatat dan dihitung berdasarkan tabel Mc Crady's. Hasil yang didapat merupakan jumlah Escherichia coli dalam tiap mililiter sampel.

Cara kerja yang terperinci dapat dilihat dalam skema yang tercantum pada lampiran I dan II.

#### 3.4 Pewarnaan Gram untuk Pemeriksaan Mikroskopis.

Dibuat preparat ulas dari biskan koloni bakteri dengan difixasi di atas api. Setelah fixasi preparat ulas ditetesi dengan Carbol Gentian Violet dan ditunggu selama 3 sampai 5 menit, kemudian ditetesi dengan Lugol dan ditunggu selama 1 sampai 2 menit. Selanjutnya dicuci dengan alkohol dan air kran. Setelah dicuci ditetesi dengan Safranin dan ditunggu selama 2 sampai 3 menit, kemudian dicuci dengan air kran dan dikeringkan dengan kertas hisap, lalu dipe-



riksa di bawah mikroskop.

### 3.5 Dilakukan Uji Rasa.

Pada uji Rasa diperlukan 15 orang panelis atau penilai, kemudian para panelis diminta tanggapan pribadi tentang sampel-sampel yang diuji berdasarkan perbedaan rasa terhadap kesukaan atau ketidaksukaan. Hasil dari uji Rasa dapat dilihat pada lampiran III.

### 3.6 Pembuatan Media

#### 3.6.1 Brilliant Green Bile Broth 2% (Difco, B7).

Media ini setiap literisnya mengandung Bacto pepton sebanyak 10 gram, Bacto oxgall 20 gram, Bacto laktosa 10 gram dan Brilliant Green 0,0133 gram. Media ini diambil secara aseptis, kemudian ditimbang seberat 40 gram dilarutkan di dalam air suling steril sampai satu liter. Selanjutnya dipanaskan di atas penangas air sampai media tersebut larut. Kemudian media dimasukkan ke dalam tabung-tabung reaksi, tiap tabung reaksi diisi sebanyak 9 mililiter. Pada tabung reaksi yang telah terisi media diisi dengan tabung Durham sambil digoyang-goyang, agar tabung Durham penuh terisi media. Setelah semua tabung reaksi terisi media dan tabung Durham maka tabung-tabung tersebut ditutup dengan kertas aluminium, kemudian disterilkan di-



dalam autoclave dengan suhu 121°C dan tekanan 15 atmosfer selama 30 menit. Untuk uji sterilitas, semua tabung reaksi yang telah terisi media tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah masa inkubasi bila larutan Brilliant Green Bile Broth tetap jernih dan tidak mengalami perubahan warna maka media dianggap steril dan siap digunakan dalam penelitian.

### 3.6.2 Eosin Methylene Blue Agar (Difco, B76).

Media ini setiap liternya mengandung Bacto pepton sebanyak 10 gram, Bacto lactosa 5 gram, Bacto sacharosa 5 gram, Dikalium phosphate 2 gram, Bacto agar 13,5 gram, Bacto Eosin Y 0,4 gram dan Bacto Methylene Blue 0,4 gram. Media ini diambil secara aseptis dan ditimbang seberat 36 gram, kemudian dilarutkan kedalam air suling steril sampai satu liter. Selanjutnya dipanaskan di atas penangas air sambil diaduk sampai larut. Setelah itu di sterilkan dalam autoclave dengan suhu 121°C dan tekanan 15 atmosfer selama 30 menit. Kemudian didinginkan sampai suhunya menjadi 60°C sambil digoyang-goyang, agar zat warna yang terkandung teroksidasi secara sempurna. Selanjutnya media dituang kedalam cawan petri steril secara aseptis sebanyak

20 mililiter dan dibiarkan dalam keadaan tertutup sampai beku. Setelah beku baru dibalik. Untuk Uji sterilitas, semua cawan petri yang terisi media tersebut diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Setelah masa inkubasi bila tidak ada pertumbuhan koloni bakteri dan tidak ada perubahan warna dari media maka media dianggap steril dan siap untuk digunakan.

### 3.6.3 Larutan Pepton 1% (Oxoid, code CM 9)

Media ini setiap literanya mengandung Peptone (Oxoid L37) sebanyak 10 gram dan Natrium Chlorida 5 gram. Media ini diambil secara aseptis dan ditimbang seberat 10 gram, kemudian dilarutkan di dalam air suling steril sampai satu liter. Setelah itu dipanaskan di atas penanggas air sampai larut. Selanjutnya media dimasukkan kedalam tabung-tabung reaksi dan tiap tabung reaksi diisi sebanyak 9 mililiter. Setelah semua tabung reaksi terisi media maka ditutup dengan kertas aluminium, kemudian disterilkan di dalam autoclave dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dan pada tekanan 15 atmosfer selama 15 menit.

### 3.6.4 Reagen Kovach

Reagen Kovach yang digunakan dibuat dengan komposisi sebagai berikut : Isoamilalkohol sebe-

nyak 15 mililiter dan 10 gram Paradimethyl amino-benzaldehyd dilarutkan kedalam 50 mililiter Hidroclorida pekat.

3.7 Kriteria penentuan bakteri Coliform dan bakteri Escherichia coli, serta penghitungan jumlah kemungkinan tertinggi bakteri di dalam tiap mililiter sampel

Penentuan bakteri Coliform dan bakteri Escherichia coli berdasarkan atas :

3.7.1 Tumbuh pada media Brilliant Green Bile Broth 2%, yang ditandai dengan adanya perubahan warna pada media dari hijau jernih menjadi hijau keruh. Untuk anggota bakteri Coliform yang menfermentasi laktosa dengan membentuk asam dan gas, ditandai dengan adanya gas di dalam tabung Durham atau mengapungnya tabung Durham sampai kepermukaan media.

3.7.2 Tumbuh pada media Eosin Methylene Blue agar dengan membentuk koloni. Koloni bakteri Coliform berdiameter 4 sampai 6 mililiter menonjol kepermukaan, bersifat mucoid dan berwarna abu-abu. Koloni bakteri Escherichia coli berdiameter 2 sampai 3 mililiter dengan pusat koloni berwarna kehitaman dan berletar-belakang hijau metalik.

3.7.3 Pada pewarnaan gram, bakteri Coliform merupakan bakteri yang bersifat gram negatif dan berbentuk batang pendek.

3.7.4 Pada uji Indol, bakteri Escherichia coli menunjukkan reaksi positif dengan ditandai terbentuknya warna merah pada permukaan atas larutan Pepton.

Penentuan jumlah kemungkinan tertinggi dari bakteri Coliform dan Escherichia coli di dalam tiap mililiter sampel berdasarkan atas :

3.7.5 Untuk bakteri Coliform dihitung dari jumlah cawan petri yang mengalami pertumbuhan koloni bakteri Coliform dalam tiap seri pengenceran sampel.

3.7.6 Untuk bakteri Escherichia coli dihitung dari jumlah uji Indol yang positif dari tiap seri pengenceran sampel.

### 3.8 Analisa Statistik

Data yang diperoleh dianalisa secara statistik Inferensial menggunakan Analisa Ragam dengan uji "F" (Sudjana, 1985). Dengan Hipotesis sebagai berikut :

- Ho<sub>I</sub> : Tidak terdapat perbedaan pengaruh penambahan cokelat kedalam air susu segar terhadap pertumbuhan bakteri Coliform.
- Ho<sub>I</sub> : Terdapat perbedaan pengaruh penambahan cokelat kedalam air susu segar terhadap pertumbuhan bakteri Coliform.
- Ho<sub>II</sub> : Tidak terdapat perbedaan pengaruh penambahan cokelat kedalam air susu segar terhadap pertumbuhan bakteri Escherichia coli.
- Ho<sub>II</sub> : Terdapat perbedaan pengaruh penambahan cokelat kedalam air susu segar terhadap pertumbuhan bakteri Escherichia coli.
- Ho<sub>III</sub> : Tidak terdapat perbedaan pengaruh penambahan cokelat kedalam air susu segar terhadap pertumbuhan bakteri Coliform non Escherichia coli.
- Ho<sub>III</sub> : Terdapat perbedaan pengaruh penambahan cokelat kedalam air susu segar terhadap pertumbuhan bakteri Coliform non Escherichia coli.

$$\text{Jumlah Kwadrat Total (JKT)} = \sum X^2 - \frac{\{\sum(\sum X)\}^2}{t.n}$$

$$\text{Jumlah Kwadrat Perlakuan (JKP)} = \frac{\sum(\sum X)^2}{t} - \frac{\{\sum(\sum X)\}^2}{t.n}$$

$$\text{Jumlah Kwadrat Sisa (JKS)} = \text{JKT} - \text{JKP}$$

SK	db	JK	KT	F hitung	F tabel 0,05 0,01
Perlakuan	t - 1	JKP	$\frac{\text{JKP}}{t - 1}$	$\frac{\text{KT perlakuan}}{\text{KT sisa}}$	
Sisa	t (n-1)	JKS	$\frac{\text{JKS}}{t (n-1)}$		
Jumlah	t.n - 1	JKT			

**Keterangan :**

SK : sumber keragaman.

db : derajat bebas.

JK : jumlah kwadrat.

KT : kwadrat tengah.

t : perlakuan.

n : ulangan.

$H_0$  diterima bila F hitung lebih kecil daripada F(0,05).

$H_1$  diterima bila F hitung lebih besar daripada F(0,05)

atau dengan F(0,01).



Bila  $H_1$  diterima maka perhitungan dilanjutkan ke uji B.N.T. atau Beda Nyata Terkecil.

$$BNT = t_{\text{tabel}} \sqrt{\frac{2 \text{ KT sisa}}{n}}$$

$$BNT 5\% = t_{5\%} (\text{db sisa}) \sqrt{\frac{2 \text{ KT sisa}}{n}}$$

$$BNT 1\% = t_{1\%} (\text{db sisa}) \sqrt{\frac{2 \text{ KT sisa}}{n}}$$

Matrik Selisih Nilai Rata-rata Perlakuan

Nilai rata-rata	$\bar{X}_1$	$\bar{X}_2$	$\bar{X}_3$ .....	$\bar{X}_t$
$\bar{X}$	0	$\bar{d}_{(1-2)}$	$\bar{d}_{(1-3)}$	$\bar{d}_{(1-t)}$
$\bar{X}$		0	$\bar{d}_{(2-3)}$	$\bar{d}_{(2-t)}$
$\bar{X}$			0	$\bar{d}_{(3-t)}$
.				
.				
$\bar{X}_t$				0

Keterangan :

$$\bar{d} = \bar{X}_i - \bar{X}_y$$

$\bar{d}$  lebih kecil daripada BNT (0,05) maka nilai  $\bar{d}$  diberi tanda ns, berarti tidak berbeda nyata.

$\bar{d}$  lebih besar daripada BNT (0,05) maka nilai  $\bar{d}$  diberi tanda (\*), berarti berbeda nyata.

$\bar{d}$  lebih besar daripada BNT (0,01) maka nilai  $\bar{d}$  diberi tanda (\*\*), berarti berbeda sangat nyata.

$$\text{Standart Deviasi} = SD = \sqrt{\frac{JK}{n-1}}$$

$$\bar{sd} = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

## BAB IV

## HASIL PENELITIAN

Hasil pemeriksaan dari tujuh sampel cokelat, air susu segar dan air susu segar yang diberi perlakuan dengan ditambah cokelat dalam empat macam konsentrasi terhadap pertumbuhan bakteri Coliform dan bakteri Escherichia coli, dengan metode "Most Probable Number" didapatkan hasil sebagai berikut :

#### 4.1 Jumlah Kemungkinan Tertinggi Bakteri Coliform Pada Cokelat.

Dari tujuh sampel cokelat yang digunakan untuk penelitian, ternyata seluruhnya tidak mengandung bakteri Coliform. Hasil secara terperinci dapat dilihat pada tabel I.

Tabel I : Jumlah bakteri Coliform di dalam setiap mililiter larutan cokelat 2%.

Ulangan	Jumlah bakteri Coliform di dalam tiap mililiter larutan cokelat 2%.
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	0
7	0

#### 4.2 Jumlah Kemungkinan Tertinggi Bakteri Coliform Di Dalam Air Susu Segar dan Air Susu Cokelat.

Dari tujuh sampel air susu segar yang diperiksa, ternyata semua mengandung bakteri Coliform dengan jumlah rata-rata sebesar  $69,29 \pm 3,75$  di dalam setiap mililiter air susu segar. Setelah diberi perlakuan dengan ditambah cokelat maka jumlah rata-rata bakteri di dalam setiap mililiter air susu mengalami penurunan menjadi  $46,57 \pm 4,49$  untuk perlakuan 2%, menjadi  $41,71 \pm 4,8$  untuk perlakuan 4%, menjadi  $34,57 \pm 5,77$  untuk perlakuan 5% dan menjadi  $28,14 \pm 4,53$  untuk perlakuan 6%. Hasil secara terperinci dapat dilihat pada tabel II.

#### 4.3 Jumlah Kemungkinan Tertinggi Bakteri Escherichia coli Di Dalam Air Susu dan Air Susu Cokelat.

Dari tujuh sampel air susu segar yang diperiksa, ternyata semua mengandung bakteri Escherichia coli dengan jumlah rata-rata sebesar  $25,43 \pm 3,82$  di dalam setiap mililiter air susu segar. Setelah diberi perlakuan dengan ditambah cokelat, ternyata jumlah rata-rata bakteri di dalam setiap mililiter air susu cokelat pada semua konsentrasi sama dengan jumlah rata-rata bakteri di dalam air susu segar. Hasil secara terperinci dapat dilihat pada tabel III.

#### 4.4 Jumlah Kemungkinan Tertinggi Bakteri Coliform non Escherichia coli Di Dalam Air Susu Segar dan Air Susu Cokelat.

Dari tujuh sampel air susu segar yang diperiksa, ternyata semua mengandung bakteri Coliform non Escherichia coli dengan jumlah rata-rata sebesar  $43,86 \pm 2,9$  di dalam setiap mililiter air susu segar. Setelah diberi perlakuan dengan ditambah cokelat maka jumlah rata-rata bakteri di dalam setiap mililiter air susu mengalami penurunan menjadi  $21,14 \pm 1,9$  untuk perlakuan 2%, menjadi  $16,29 \pm 2,15$  untuk perlakuan 4%, menjadi  $9,14 \pm 2,47$  untuk perlakuan 5% dan menjadi  $2,7 \pm 1$  untuk perlakuan 6%. Hasil secara terperinci dapat dilihat pada tabel IV.

Tabel II : Jumlah bakteri Coliform di dalam setiap mili-liter air susu segar dan air susu yang diberi coklat 2%, 4%, 5% dan 6%.

n	Jumlah bakteri Coliform dalam tiap ml sampel					Jumlah
	kontrol	2%	4%	5%	6%	
1	64	28	23	15	11	
2	56	36	28	20	14	
3	81	64	59	62	45	
4	62	47	45	36	36	
5	69	54	52	36	31	
6	81	45	40	32	28	
7	72	52	45	41	32	
Jumlah ( $\Sigma X$ )	485	326	292	242	197	1542
( $\Sigma X$ ) <sup>2</sup>	235225	106276	85264	58564	38809	524138
( $\bar{X}$ )	69,29	46,57	41,71	34,57	28,14	
$\bar{s}_d$	3,75	4,49	4,8	5,77	4,53	

Keterangan :

n : ulangan.

( $\bar{X}$ ) : rata-rata.



Tabel III : Jumlah bakteri Escherichia coli di dalam setiap mililiter air susu segar dan air susu yang diberi cokelat 2%, 4%, 5% dan 6%.

n	Jumlah bakteri Escherichia coli dalam tiap sampel					jumlah
	kontrol	2%	4%	5%	6%	
1	11	11	11	11	11	
2	14	14	14	14	14	
3	40	40	40	40	40	
4	31	31	31	31	31	
5	24	24	24	24	24	
6	28	28	28	28	28	
7	30	30	30	30	30	
Jumlah ( $\sum x$ )	178	178	178	178	178	890
( $\sum x$ ) <sup>2</sup>	31684	31684	31684	31684	31684	158420
( $\bar{x}$ )	25,43	25,43	25,43	25,43	25,43	
$\bar{s}_d$	3,82	3,82	3,82	3,82	3,82	

Keterangan :

n : ulangan.

( $\bar{x}$ ) : rata-rata.

Tabel IV : Jumlah bakteri Coliform non Escherichia-coli di dalam setiap mililiter air susu segar dan air susu yang diberi cokelat 2%, 4%, 5% dan 6%.

n	Jumlah bakteri Coliform non Escherichia coli dalam tiap ml sampel					jumlah
	kontrol	2%	4%	5%	6%	
1	53	17	12	4	0	
2	42	22	14	6	0	
3	41	24	19	22	5	
4	31	16	14	5	5	
5	45	30	28	12	7	
6	53	17	12	4	0	
7	42	22	15	11	2	
Jumlah ( $\Sigma X$ )	307	148	114	64	19	652
( $\Sigma X$ ) <sup>2</sup>	94249	21904	12996	4096	361	133606
( $\bar{X}$ )	43,86	21,14	16,29	9,14	2,7	
$\bar{sd}$	2,9	1,9	2,15	2,47	1	

Keterangan :

n : ulangan.

( $\bar{X}$ ) : rata-rata.

4.5 Prosentase Penurunan Jumlah Rata-rata Bakteri Coliform Di Dalam Air Susu Segar Setelah Diberi Cokelat.

Setelah diberi cokelat, jumlah rata-rata bakteri Coliform di dalam setiap mililiter air susu mengalami penurunan dari 69,29 menjadi 46,57 (32,79%) untuk perlakuan 2%, dari 69,29 menjadi 41,71 (39,8%) untuk perlakuan 4%, dari 69,29 menjadi 34,57 (50%) untuk perlakuan 5% dan dari 69,29 menjadi 28,14 (59,39%) untuk perlakuan 6% (lihat pada grafik).

4.6 Prosentase Penurunan Jumlah Rata-rata Bakteri Escherichia coli Di Dalam Air Susu Segar Setelah Diberi Cokelat.

Setelah diberi cokelat, jumlah rata-rata bakteri Escherichia coli di dalam setiap mililiter air susu segar mengalami penurunan sebesar nol atau tetap, yaitu dari 25,43 menjadi 25,43 (lihat pada grafik).

4.7 Prosentase Penurunan Jumlah Rata-rata Bakteri Coliform non Escherichia coli Di Dalam Air Susu Segar Setelah Diberi Cokelat.

Setelah diberi cokelat, jumlah rata-rata bakteri Coliform non Escherichia coli di dalam setiap mililiter air susu segar mengalami penurunan dari 43,86 menjadi 21,14 (51,8%) untuk perlakuan 2%, dari 43,86 menjadi 16,29 (62,86%) untuk perlakuan 4%, da-

ri 43,86 menjadi 9,14 (79,16%) untuk perlakuan 5% dan dari 43,86 menjadi 2,7 (93,84%) untuk perlakuan 6% (lihat pada grafik).

#### 4.8 Hasil Analisa Statistik.

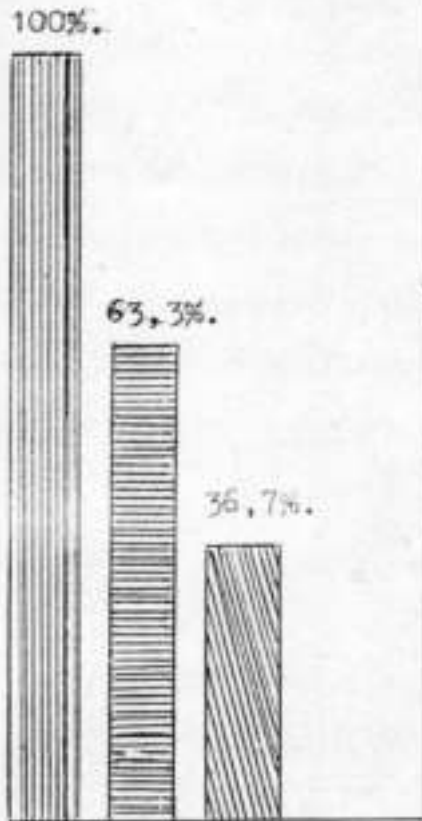
Setelah dilakukan Analisa Data secara Statistik Inferensial menggunakan Analisa Ragam dengan uji "F", maka pada tingkat kepercayaan 95% diperoleh hasil sebagai berikut :

4.8.1 Terdapat perbedaan yang nyata ( $F \text{ hitung} > F_{0,05}$  atau  $11,7 > 2,69$ ) pengaruh penambahan cokelat kedalam air susu segar terhadap pertumbuhan bakteri Coliform.

4.8.2 Tidak terdapat perbedaan yang nyata ( $F \text{ hitung} < F_{0,05}$  atau  $0 < 2,69$ ) pengaruh penambahan cokelat kedalam air susu segar terhadap pertumbuhan bakteri Escherichia coli.

4.8.3 Terdapat perbedaan yang nyata ( $F \text{ hitung} > F_{0,05}$  atau  $52,086 > 2,69$ ) pengaruh penambahan cokelat kedalam air susu segar terhadap pertumbuhan bakteri Coliform non Escherichia coli.

Grafik : Perbandingan  
Coliform di  
ri cokelat 2



Air Susu Segar, Ai

Keterangan Grafik :



Jumlah rata  
mililiter s



Jumlah rata  
coli di dal



Jumlah rata  
lam setiap



4.9 Dari Uji Rasa menurut kesukaan terhadap air susu cokelat dalam berbagai konsentrasi, diperoleh hasil sebagai berikut :

Air susu cokelat 2% mempunyai tingkat kesukaan sebesar 100%, air susu cokelat 4% mempunyai tingkat kesukaan sebesar 80%, air susu cokelat 5% dan air susu cokelat 6% mempunyai tingkat kesukaan nol. Jadi berdasarkan segi rasa yang tidak dapat diterima oleh konsumen adalah air susu cokelat 5% dan air susu cokelat 6%.

## BAB V

## P E M B A H A S A N

Metode yang digunakan dalam penentuan jumlah kemungkinan tertinggi bakteri Coliform di dalam air susu segar adalah "Most Probable Number". Menurut Oblinger dan Koburger (1975), yang dikutip oleh Buckle et al., (1979<sup>a</sup>), penentuan dan penghitungan bakteri Coliform di dalam bahan makanan termasuk air susu dengan metode "Most Probable Number", memberi kepekaan yang baik. Pada beberapa negara "Most Probable Number" sering digunakan sebagai batasan dalam penentuan standarisasi bakteri Coliform di dalam air susu segar dan air minum (Anonymous, 1960).

Bakteri Coliform merupakan flora normal di dalam saluran usus besar manusia atau hewan berdarah panas sehingga terdapatnya bakteri Coliform di luar saluran usus dianggap sebagai akibat pencemaran oleh kotoran manusia atau hewan. Oleh karena itu terdapatnya bakteri Coliform di dalam air susu dapat dikaitkan dengan terjadinya pencemaran yang berasal dari kotoran manusia atau hewan (Adnan, 1984). Bakteri Coliform terdiri dari beberapa genera yang terbagi dalam dua kelompok, yaitu kelompok yang dapat fermentasi laktosa dan kelompok yang tidak dapat fermentasi laktosa. Akan tetapi dalam mendeteksi adanya bakteri Coliform kemampuan fermentasi laktosa dipakai se-

bagai petunjuk untuk memperkirakan adanya bakteri Coliform meskipun ada anggota dari bakteri Coliform yang tidak dapat menfermentasi laktosa (Stokes, 1975). Menurut Smith (1973), kelompok bakteri Coliform terdiri dari bakteri Coliform non Escherichia coli dan bakteri Escherichia coli. Dalam menfermentasi laktosa bakteri Coliform dapat membentuk asam dan gas, asam tanpa gas atau gas tanpa asam.

Media selektif yang digunakan untuk mendeteksi bakteri Coliform adalah Brilliant Green Bile Broth 2%. Bakteri Coliform dapat menfermentasi laktosa dalam waktu 24 sampai 48 jam dan mampu tumbuh pada media yang mengandung garam empedu yang menghambat pertumbuhan bakteri gram positif yang mungkin ada. Sehingga suatu media yang mengandung laktosa dan garam empedu dalam jumlah tertentu dapat digunakan sebagai media selektif untuk mendeteksi bakteri Coliform (Jay, 1978). Menurut Buckle et al., (1979<sup>a</sup>), sebagai media Brilliant Green Bile Broth 2% lebih selektif daripada Mac Conkey Broth karena Brilliant Green Bile Broth dapat mengurangi adanya reaksi positif yang disebabkan oleh bakteri lain yang dapat menfermentasi karbohidrat.

Media yang digunakan untuk mendiferensiasi adalah Eosin Methylene Blue agar. Bakteri Escherichia coli dapat tumbuh pada media yang hanya mengandung sumber nitro

gen, seperti  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dengan mineral lain. Sehingga dapat dipastikan bahwa bakteri Escherichia coli dapat mudah tumbuh pada media nutrient agar dengan membentuk koloni dalam waktu 24 jam pada suhu  $37^\circ\text{C}$  (Jay, 1978). Pada media Eosin Methylene Blue agar bakteri Coliform dapat membentuk koloni lebih awal daripada dalam media Endo Agar, dengan hasil yang lebih teliti dan peka (Difco, 1972).

Uji biokimia yang dilakukan adalah uji Indol dengan menggunakan Pepton Water 1%. Bakteri Coliform non Escherichia coli dan bakteri Escherichia coli dapat dibedakan dengan uji biokimia, salah satu diantaranya adalah uji Indol. Pada uji Indol bakteri Escherichia coli menunjukkan reaksi positif dan bakteri Coliform non Escherichia coli menunjukkan reaksi negatif, kecuali bakteri Edwardsiella. Tetapi bakteri Edwardsiella tidak dapat menfermentasi laktosa (Smith, 1973). Menurut Eckles et al., (1980), bakteri Escherichia coli mempunyai kemampuan membentuk Indol sebagai hasil akhir dari metabolisme protein, yaitu asam amino tryptophan.

Air susu merupakan makanan yang bernilai gizi tinggi karena mengandung protein, lemak, karbohidrat, vitamin, garam mineral dan sir. Tetapi sir susu juga dapat bertindak sebagai sumber penyakit yang berbahaya bagi konsumen karena air susu merupakan media yang baik untuk

pertumbuhan bakteri (Pelczar, 1978). Menurut Wilson dan Miles (1961), air susu segar selalu mengandung bakteri, meskipun air susu itu berasal dari sapi perah yang sehat. Bakteri yang ada di dalam air susu dapat digolongkan menjadi : bakteri pembentuk asam, bakteri pembentuk basa, bakteri pembentuk gas dan bakteri proteolitik. Dikatakan oleh Longree (1972), bahwa pada beberapa negara persyaratan mikrobiologik air susu segar selalu dikaitkan dengan kandungan bakteri Coliform yang ada di dalam air susu. Menurut Lampert (1965), terdapatnya bakteri Coliform di dalam air susu sangat tidak diinginkan meskipun pada kenyataannya air susu segar tidak pernah bebas dari bakteri Coliform. Oleh karenanya usaha yang dilakukan adalah menekan serendah mungkin jumlah bakteri Coliform yang ada di dalam air susu. Dari hasil penelitian didapat jumlah rata-rata bakteri Coliform di dalam setiap mililiter air susu segar sebesar  $69,29 \pm 3,75$ . Setelah diberi coklat maka jumlah rata-rata bakteri Coliform di dalam setiap mililiter air susu mengalami penurunan menjadi  $46,57 \pm 4,49$  untuk pemberian coklat 2%, menjadi  $41,71 \pm 4,8$  untuk pemberian coklat 4%, menjadi  $34,57 \pm 5,77$  untuk pemberian coklat 5% dan menjadi  $28,14 \pm 4,53$  untuk pemberian coklat 6%. Jumlah rata-rata bakteri Coliform di dalam setiap mililiter air susu yang mengalami penurunan adalah bakteri Coliform non Escherichia



coli, untuk bakteri Escherichia coli jumlah rata-rata di dalam setiap mililiter air susu segar sama dengan jumlah rata-rata di dalam setiap mililiter air susu cokelat dalam berbagai konsentrasi, yaitu sebesar  $25,42 \pm 3,82$ . Jadi pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$  sampai  $30^{\circ}\text{C}$  dengan konsentrasi 2% sampai 6% cokelat di dalam air susu segar dapat mematikan bakteri Coliform non Escherichia coli dan dapat menghambat pertumbuhan bakteri Escherichia coli. Di Amerika dan Australia berlaku peraturan, bahwa jumlah bakteri Coliform di dalam setiap mililiter air susu segar tidak boleh lebih dari 10 bakteri, tetapi untuk bakteri Escherichia coli belum ada ketentuan (Buckle *et al.*, 1978 dan Jay, 1978). Menurut Kodex Makanan Indonesia berlaku peraturan, bahwa jumlah bakteri Escherichia coli di dalam setiap mililiter air susu segar tidak boleh lebih dari 10 bakteri dan untuk bakteri Coliform tidak ada ketentuan. Menurut Adnan (1984), standarisasi bakteri di dalam air susu segar yang berlaku di Amerika dapat dipakai sebagai pertimbangan untuk membuat persyaratan mikrobiologik pada air susu segar di Indonesia. Dari hasil penelitian di dapat jumlah rata-rata bakteri Coliform di dalam setiap mililiter air susu segar sebesar  $69,29 \pm 3,75$  yang terdiri dari bakteri Escherichia coli sebesar  $25,43 \pm 3,82$  dan bakteri Coliform non Escherichia coli sebesar  $43,86 \pm 2,9$ , berarti air susu segar yang digunakan dalam penelitian



sangat tidak memenuhi syarat untuk dikonsumsi.

Cokelat merupakan bahan tambahan makanan yang sangat disukai, karena disamping rasanya enak cokelat juga mempunyai nilai gizi yang tinggi (Krause, 1969 dan Siswo putranto, 1978). Dari hasil penelitian pada suhu 25°C sampai 30°C dengan konsentrasi 2% sampai 6% cokelat di dalam air susu segar dapat mematikan bakteri Coliform non Escherichia coli dan menghambat pertumbuhan bakteri Escherichia coli. Bustan dan Speck, 1967 menyatakan bahwa cokelat dapat mematikan bakteri karena mengandung anthocyanin (Anonymous, 1968). Dikatakan oleh Egan et al., 1981, bahwa anthocyanin dari cokelat adalah tannin dan menurut Tyler et al., 1981, tannin bersifat antiseptik karena merupakan polyphenol, yaitu derivat dari phenol.

Penilaian Organoleptik adalah suatu cara penilaian dengan menggunakan indera. Penilaian cara ini masih banyak digunakan oleh beberapa perusahaan minuman, karena dapat memberikan hasil yang sangat teliti bahkan kadang-kadang melebihi ketelitian alat yang sangat sensitif (Soekarto, 1985).

BAB VI  
K E S I M P U L A N

Dari hasil penelitian yang dilakukan terhadap tujuh sampel air susu segar yang diberi cokelat dalam empat macam konsentrasi, dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

6.1 Pada konsentrasi 2% sampai 6% dengan suhu 25°C sampai 30°C, cokelat di dalam air susu segar dapat mematikan bakteri Coliform non Escherichia coli dan menghambat pertumbuhan bakteri Escherichia coli.

6.2 Kemampuan cokelat dalam mematikan bakteri Coliform non Escherichia coli dalam air susu segar dipengaruhi oleh besarnya konsentrasi cokelat, makin besar konsentrasi cokelat maka makin besar pula kemampuannya dalam mematikan bakteri Coliform non Escherichia coli.

BAB VII  
S A R A N

Dari kenyataan yang ada maka dapat diberikan saran sebagai berikut :

- 7.1 Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai manfaat coklat pada berbagai konsentrasi, suhu dan pH, agar coklat dapat bekerja lebih optimum terhadap pertumbuhan bakteri-bakteri lain.
  
- 7.2 Perlu dilakukan peningkatan taraf konsumsi coklat bersamaan dengan peningkatan taraf produksi, sehingga manfaat coklat dapat dirasakan oleh semua lapisan masyarakat.

## BAB VIII

## R I N G K A S A N

Telah dilakukan penelitian tentang pengaruh cokelat dalam berbagai konsentrasi di dalam air susu segar, terhadap pertumbuhan bakteri Coliform, dengan menggunakan metode "Most Probable Number". Sampel air susu segar yang digunakan sebanyak tujuh, dengan masing-masing sampel diberi empat macam perlakuan, yaitu diberi cokelat dalam konsentrasi 2%, 4%, 5% dan 6%. Pada penelitian ini juga dilakukan uji Rasa terhadap air susu cokelat dari keempat macam konsentrasi tersebut, dengan menggunakan 15 orang penilai atau panelis.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah rata-rata bakteri Coliform di dalam setiap mililiter air susu segar sebesar  $69,29 \pm 3,75$ , yang terdiri dari bakteri Coliform non Escherichia coli sebesar  $43,86 \pm 2,9$  dan bakteri Escherichia coli sebesar  $25,43 \pm 3,82$ . Pada penambahan cokelat konsentrasi 2% maka jumlah rata-rata bakteri Coliform di dalam setiap mililiter air susu menjadi  $46,57 \pm 4,49$ , yang terdiri dari bakteri Coliform non Escherichia coli sebesar  $21,14 \pm 1,9$  dan bakteri Escherichia coli sebesar  $25,43 \pm 3,82$ . Pada penambahan cokelat 4% maka jumlah rata-rata bakteri Coliform menjadi  $41,71 \pm 4,8$ , yang terdiri dari bakteri Coliform non Escherichia coli dengan jumlah rata-rata sebesar  $16,29 \pm 2,15$  dan

bakteri Escherichia coli dengan jumlah rata-rata sebesar  $25,43 \pm 3,82$ . Pada penambahan cokelat konsentrasi 5% maka jumlah rata-rata bakteri Coliform menjadi  $34,57 \pm 5,77$ , yang terdiri dari bakteri Coliform non Escherichia coli dengan jumlah rata-rata sebesar  $9,14 \pm 2,47$  dan bakteri Escherichia coli dengan jumlah rata-rata sebesar  $25,43 \pm 3,82$ . Pada penambahan cokelat konsentrasi 6% maka jumlah rata-rata bakteri Coliform menjadi  $28,14 \pm 4,53$ , yang terdiri dari bakteri Coliform non Escherichia coli dengan jumlah rata-rata sebesar  $2,7 \pm 1$  dan bakteri Escherichia coli dengan jumlah rata-rata sebesar  $25,43 \pm 3,82$ .

Pada uji Rasa, air susu cokelat 2% mempunyai tingkat kesukaan 100% karena semua panelis mau menerima. Air susu cokelat 4% mempunyai tingkat kesukaan 80% karena dari 15 orang panelis yang mau menerima hanya 12 orang. Air susu cokelat 5% dan air susu cokelat 6% mempunyai tingkat kesukaan nol karena tidak ada panelis yang mau menerima.



## DAFTAR KEPUSTAKAAN

- Adnan, M., 1984. Kimia dan Teknologi Pengolahan Air Susu. Bagian I edisi 1. Andi Offset, Yogyakarta. hln. 6 - 9.
- Anonimous, 1960. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 11<sup>th</sup> Ed. American Public Health Association, Inc. pp. 132 - 138.
- Anonimous, 1968. Applied Microbiology. Volume 16, No. 2. American Society for Microbiology. pp. 424 - 425.
- Anonimous, 1975. Tanaman Cokelat dan Pengolahan Hasilnya. Majalah Pertenian. No. 3. Th. XXIII. Departemen Pertenian, Jakarta. hln. 36.
- Anonimous, 1976. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Tentang Produksi dan Peredaran Makanan. No. 329. 1976. Direktorat Pengawasan Makanan dan Minuman. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. hln. 92.
- Anonimous, 1979. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Tentang Bahan Tambahan Makanan. No. 235. 1979. Direktorat Pengawasan Makanan dan Minuman. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. hln. 1.



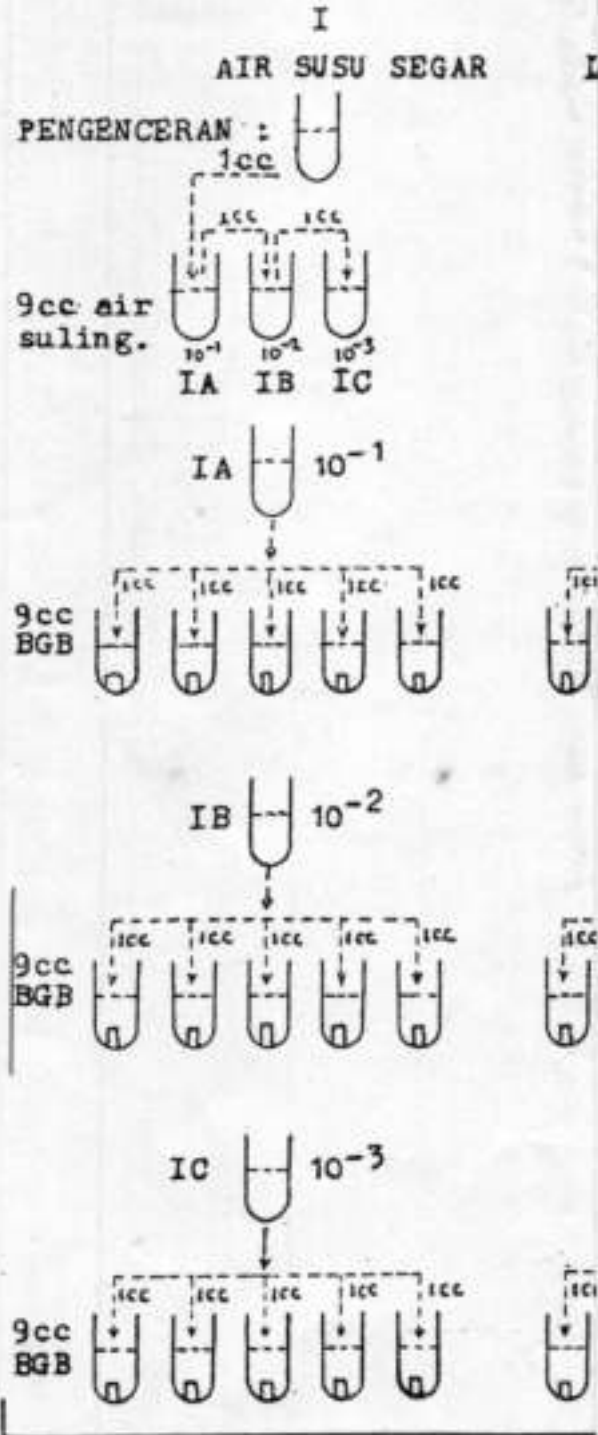
- Anonimous, 1986. Cokelat Rakyat Yang Menguntungkan. Majalah Trubus. No. 200. Th. XVIII. hln. 6 - 9.
- Buchanan, R.E. and N.E. Buchanan., 1959. Bacteriology. 5<sup>th</sup> Ed. The Macmillan Company, New York. pp. 518.
- Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons., 1975. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8<sup>th</sup> Ed. Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 295, 323 dan 324.
- Buckle, K.A., R.A. Edwards., G.H. Fleet and M. Wooton., 1978. A Course Manual in Food Science. Australian Vice - Chancellor. pp. 175 dan 176.
- Buckle, K.A., 1979<sup>a</sup>. Food Borne Microorganisms of Public Health Significance. School of Technology, University of New South Wales, Kensington, NSW 2033, Australia. pp. 6.13 - 6.20.
- Buckle, K.A., 1979<sup>b</sup>. Food Borne Microorganisms of Public Health Significance. School of Technology, University of New South Wales, Kensington, NSW 2033, Australia. pp. 1.15 - 2.4.
- Cruickshank, R., J.P. Duguid., B.P. Marmion and R.H.A. Swain., 1974. Medical Microbiology. Volume 1. 12<sup>th</sup> Ed. The English Language Book Society and Churchill Livingstone. pp. 327.
- Difco Laboratories, 1972. Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures. 9<sup>th</sup> Ed. Detroit, Michigan.

- Eckles, C.H., W.B. Combs and H. Macy., 1980. Milk and Milk Products. 4<sup>th</sup> Ed. Mc Graw Hill Book Company, Ltd. pp. 118 - 122.
- Egen, H., R.S. Kirk and R. Sawyer., 1981. Pearson's Chemical Analysis of Food. 8<sup>th</sup> Ed. Churchill Livingstone. pp. 301 - 303.
- Ewing, W.H., 1973. Differentiation of Enterobacteriaceae by Biochemical Reaction, revised. HEW Publication No. (CDC) 74 - 8270. pp. 3 - 5 dan 12 - 20.
- Freeman, B.A., 1985. Textbook of Microbiology. 22<sup>th</sup> Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp. 443 dan 448.
- Gunnison, J.B., 1957. Laboratory of Medicine Microbiology. Syllabus series. No. 353. University of California. pp. 59.
- Hadiwijoto, S., 1982. Teknik Uji Mutu Susu dan Hasil Olahannya. Liberty, Yogyakarta. hln. 71 - 75.
- Hadiwijoto, S., 1983. Hasil-hasil Olahan Susu, Ikan, Daging dan Telur. Liberty, Yogyakarta. hln. 8.
- Hart, F.L. and H.J. Fisher., 1971. Modern Food Analysis. Springer - Verlag, New York. hln. 92.
- Hill, A.F., 1974. Economic Botany. 2<sup>th</sup> Ed. Tata Mc Graw Publishing Company, Ltd. New Delhi. pp. 13, 14, 224 dan 478.
- Jay, J.M., 1978. Modern Food Microbiology. 2<sup>th</sup> Ed. Van

- Nostrand Reinhold Company. pp. 294 - 295.
- Joklik, W.K., H.P. Willett and D.B. Amos., 1980. Microbiology. 17<sup>th</sup> Ed. Appleton Century Croft, New York. pp. 727 - 732.
- Krause, M.V., 1969. Food, Nutrition and Diet Therapy. 4<sup>th</sup> Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp. 503, 505 dan 506.
- Lampert, L.M., 1965. Modern Dairy Product. Chemical Publishing Company, Inc. pp. 99 - 101.
- Lapedes, D.N., 1977. Encyclopedia of Food, Agriculture and Nutrition. 4<sup>th</sup> Ed. Mc Graw Hill Book Company. pp. 401.
- Longree, K., 1972. Quantity Food Sanitation. 2<sup>th</sup> Ed. Wiley Interscience. pp. 206 - 207.
- Pelcozar, M.J., R.D. Reid and E.C.S. Chan., 1978. Microbiology. Tata Mc Graw Hill Publishing Company, Ltd. pp. 824 - 828.
- Ressang, A.A. dan A.M. Nasution., 1982. Pedoman mata pelajaran ilmu kesehatan susu. Fakultas Kedokteran Hewan, Institute Pertanian Bogor. hln. 4, 5, 55 dan 56.
- Sarles, W.B., W.C. Frazier., J.B. Wilson and S.T. Knight., 1956. General and Applied Microbiology. 2<sup>th</sup> Ed. Harper and Brother, New York. pp. 320 - 322.

- Sediaoetama, A.D., 1976. Ilmu gizi dan ilmu diet didaerah tropik. Balai Pustaka, Jakarta. hln. 419 - 420.
- Siswoputranto, P.S., 1978. Perkembangan teh, kopi, coklat Internasional. Gramedia, Jakarta. hln. 311 dan 336.
- Smith, A.L., 1973. Principles of Microbiology. 7<sup>th</sup> Ed. The C.V. Mosby Company. pp. 351 - 353.
- Soekarto, S.T., 1985. Penilaian organoleptik untuk industri pangan dan hasil pertanian. Bhratara Karya Aksara, Jakarta. hln. 45, 67, 77 dan 78.
- Sonnenwirt, A.C. and L. Jarett., 1980. Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. Volume 2. 8<sup>th</sup> Ed. The C.V. Mosby Company, London. pp. 1600, 1601 dan 1747.
- Speck, M.L., 1976. Compendium of Methods for the Microbiology Examination of Food. American Public Health Association.
- Stokes, E.J., 1975. Clinical Bacteriology. 4<sup>th</sup> Ed. Edward Arnold Publisher, Ltd. pp. 138 - 139.
- Steel, R.G.D. and J.M. Torrie., 1960. Principles and procedure of Statistic. Mc Graw Hill Book Company, Inc. New York, Amerika.
- Sudjana., 1985. Dissain dan Analisis Eksperimen. Edisi 2. Tarsito, Bandung.
- Teranishi, R., 1978. Agriculture and Food Chemistry.

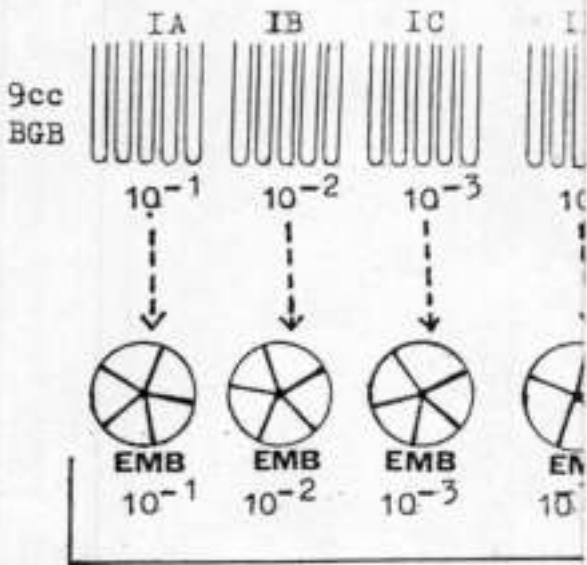
- A.V.I. Publishing Company. pp. 317 - 320.
- Tyler, V.E., L.R. Bredy and J.E. Robbers., 1977. Pharmacognosy. 7<sup>th</sup> Ed. Lea and Febiger, Philadelphia. pp. 104 dan 105.
- Wieland, H., 1972. Cocoa and Chocolate Processing. Printed in the United States. pp. 191 - 209.
- Wilson, G.S. and A.A. Miles., 1961. Principles of Bacteriology and Immunity. Volume 2. 4<sup>th</sup> Ed. Edward Arnold Publisher, London. pp. 2311 - 2313.
- Winarno, F.G. dan B.S.L. Jenie., 1983. Kerusakan bahan pangan dan pencegahannya. edisi 1. Ghalia, Indonesia. hln. 46 dan 47.
- Winarno, F.G., S. Fardiaz dan D. Fardiaz., 1984. Pengantar teknologi pangan. edisi 4. Gramedia, Jakarta.
- Wriser, H.H., G.J. Mountney and W.A. Gould., 1976. Practical Food Microbiology and Technology. 2<sup>th</sup> Ed. 1976. The Avi Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut. pp. 299.



Semua tabung reaksi diinku



Setelah masa inkubasi :



Semua cawan petri diinku

Keterangan :

E M B → Eosin Met

B G B → Brilliant

Perhitungan jumlah kemungkinan tertinggi bakteri Coli form didalam air susu segar dan air susu cokelat :

$$\begin{aligned} \text{JKT} &= 79494 - \frac{(1542)^2}{35} \\ &= 79494 - 67936,11429 \\ &= 11557,8857. \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKP} &= \frac{524138}{7} - 67936,11429 \\ &= 74876,85714 - 67936,11429 \\ &= 6940,742852. \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKS} &= 11557,8857 - 6940,742852 \\ &= 4617,142848 \end{aligned}$$

#### Analisa Ragam

SK	db	JK	KT	F hitung	F tabel	
					0,05	0,01
Perlakuan	4	6940,743	1735,186	11,27	2,69	4,02
Acak	30	4617,143	153,905			
Jumlah	34	11557,8857				

F hitung lebih besar daripada F(0,05) → H<sub>0</sub> ditolak,  
H<sub>1</sub> diterima.

F hitung lebih besar daripada F(0,01) → H<sub>1</sub> diterima.

$$\begin{aligned} \text{BNT } 5\% &= 2,042 \times \sqrt{\frac{2 \times 153,905}{7}} \\ &= 2,042 \times 6,63 \end{aligned}$$

BNT 5% = 13,54.

BNT 1% = 2,75 x 6,63  
= 18,235.

Matrik selisih nilai rata-rata perlakuan :

Perlakuan		kontrol	2%	4%	5%	6%
	$\bar{X}$	69,29	46,57	41,71	34,57	28,14
kontrol	69,29	0	22,72 <sup>**</sup>	27,58 <sup>**</sup>	34,72 <sup>**</sup>	41,15 <sup>**</sup>
2%	46,57		0	4,86 <sup>ns</sup>	12 <sup>ns</sup>	18,43 <sup>**</sup>
4%	41,71			0	7,14 <sup>ns</sup>	13,57 <sup>**</sup>
5%	34,57				0	6,43 <sup>ns</sup>
6%	28,14					0
B.N.T (0,05) = 13,54			B.N.T (0,01) = 18,236			

Kesimpulan :

Jumlah rata-rata bakteri Coliform pada kontrol atau air susu segar adalah paling tinggi dan berbeda sangat nyata dengan jumlah rata-rata bakteri Coliform didalam air susu segar yang diberi coklat dalam 4 macam konsentrasi.

Pengaruh coklat konsentrasi 2% didalam air susu segar tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 4%

dan 5%, tetapi berbeda sangat nyata dengan konsentrasi 6%.

Pengaruh cokelat konsentrasi 4% didalam air susu segar tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 5%, tetapi berbeda nyata dengan konsentrasi 6%. Sedangkan antara konsentrasi 5% dengan konsentrasi 6% juga tidak berbeda nyata.

Perhitungan jumlah kemungkinan tertinggi bakteri Escherichia coli didalam air susu segar dan air susu cokelat

$$\begin{aligned} \text{JKT} &= 25690 - \frac{(890)^2}{35} \\ &= 25690 - 22631,42857 \\ &= 3058,57143 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKP} &= \frac{158420}{7} - 22631,42857 \\ &= 22631,42857 - 22631,42857 \\ &= 0 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKS} &= 3058,57143 - 0 \\ &= 3058,57143. \end{aligned}$$

## Analisa Ragam

SK	db	JK	KT	F hitung	F tabel	
					0,05	0,01
Perlakuan	4	0	0	0	2,69	4,02
Sisa	30	3058,571	101,95			
Jumlah	34	3058,571				

F hitung lebih kecil daripada F(0,05)  $\longrightarrow$  Ho diterima,  
H1 ditolak.

F hitung lebih kecil daripada F(0,01)  $\longrightarrow$  H1 ditolak.

Perhitungan jumlah kemungkinan tertinggi bakteri Coli-form non Escherichia coli didalam air susu segar dan air susu coklat :

$$\begin{aligned} JKT &= 20086 - \frac{(652)^2}{35} \\ &= 20086 - 12145,82857 \\ &= 7940,17143. \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} JKP &= \frac{133606}{7} - 12145,82857 \\ &= 19086,57143 - 12145,82857 \\ &= 6940,742858. \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} JKS &= 7940,17143 - 6940,742858 \\ &= 999,428572. \end{aligned}$$

## Analisa Regam

SK	db	JK	KT	F hitung	F tabel	
					0,05	0,01
Perlakuan	4	6940,743	1735,186	52,085	2,69	4,02
Sisa	30	999,429	33,314			
Jumlah	34	7940,172				

F hitung lebih besar daripada F (0,05)  $\longrightarrow$  Ho ditolak,  
H1 diterima.

F hitung lebih besar daripada F(0,01)  $\longrightarrow$  H1 diterima.

$$\text{BNT } 5\% = 2,042 \times \frac{2 \times 33,314}{7}$$

$$= 2,042 \times 3,085$$

$$= 6,299.$$

$$\text{BNT } 1\% = 2,75 \times 3,085$$

$$= 8,484.$$

Matrik selisih nilai rata-rata perlakuan :

Perlakuan	kontrol    2%    4%    5%    6%					
	$\bar{X}$	43,86	21,14	16,29	9,14	2,7
kontrol	43,86	0	22,72**	27,57**	34,72**	41,16**
2%	21,14		0	4,85 <sup>ns</sup>	12**	18,44**
4%	16,29			0	7,15*	13,59**
5%	9,14				0	6,44*
6%	2,7					0
B.N.T (0,05) = 6,299			B.N.T (0,01) = 8,484			



**Kesimpulan :**

Jumlah rata-rata bakteri Coliform non Escherichia coli dalam air susu segar atau kontrol adalah paling tinggi dan berbeda sangat nyata dengan jumlah rata-rata bakteri Coliform non Escherichia coli dalam air susu segar yang diberi cokelat dengan empat macam konsentrasi.

Pengaruh cokelat konsentrasi 2% di dalam air susu segar tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 4%, tetapi berbeda sangat nyata dengan konsentrasi 5% dan konsentrasi 6%.

Pengaruh cokelat konsentrasi 4% di dalam air susu segar berbeda nyata dengan konsentrasi 5% dan berbeda sangat nyata dengan konsentrasi 6%, tetapi antara konsentrasi 5% dengan konsentrasi 6% berbeda nyata.

**Perhitungan Prosentase Tingkat Kesukaan dari Uji Rasa.**

Pada uji Rasa digunakan 15 orang penilai atau panelis untuk diminta tanggapan pribadinya tentang kesukaan atau ketidaksukaan terhadap air susu cokelat dalam berbagai konsentrasi. Hasil yang diperoleh adalah sebagai berikut :

Air susu cokelat 2% dapat diterima oleh semua panelis. Berarti air susu cokelat 2% mempunyai ting

kat kesukaan sebesar =  $\frac{15}{15} \times 100\% = 100\%$ .

Air susu cokelat 4% dapat diterima oleh 12 orang panelis. Berarti air susu cokelat 4% mempunyai tingkat kesukaan sebesar =  $\frac{12}{15} \times 100\% = 80\%$ .

Air susu cokelat 5% dan air susu cokelat 6% tidak dapat diterima oleh semua panelis. Berarti air susu cokelat 5% dan 6% mempunyai tingkat kesukaan nol.

## Tabel Mc Crady's

Using 5 Tubes  
With 10, 1 and 0.1 ml Volumes

Pos*	MPN	Pos*	MPN	Pos*	MPN	Pos*	MPN	Pos*	MPN	Pos*	MPN
000	0	100	2	200	4.5	300	7.8	400	13	500	23
001	1.8	101	4	201	6.8	301	11	401	17	501	31
002	3.6	102	6	202	9.1	302	13	402	21	502	43
003	5.4	103	8	203	12	303	16	403	25	503	58
004	7.2	104	10	204	14	304	20	404	30	504	76
005	9	105	12	205	16	305	23	405	36	505	95
010	1.8	110	4	210	6.8	310	11	410	17	510	33
011	3.6	111	6.1	211	9.2	311	14	411	21	511	46
012	5.5	112	8.1	212	12	312	17	412	26	512	64
013	7.3	113	10	213	14	313	20	413	31	513	84
014	9.1	114	12	214	17	314	23	414	36	514	110
015	11	115	14	215	19	315	27	415	42	515	130
020	3.7	120	6.1	220	9.3	320	14	420	22	520	49
021	5.5	121	8.2	221	12	321	17	421	26	521	70
022	7.4	122	10	222	14	322	20	422	32	522	95
023	9.2	123	12	223	17	323	24	423	38	523	120
024	11	124	15	224	19	324	27	424	44	524	150
025	13	125	17	225	22	325	31	425	50	525	180
030	5.6	130	8.3	230	12	330	17	430	27	530	79
031	7.4	131	10	231	14	331	21	431	33	531	110
032	9.3	132	13	232	17	332	24	432	39	532	140
033	11	133	15	233	20	333	28	433	45	533	180
034	13	134	17	234	22	334	31	434	52	534	210
035	15	135	19	235	25	335	35	435	59	535	250
040	7.5	140	11	240	15	340	21	440	34	540	130
041	9.4	141	13	241	17	341	24	441	40	541	170
042	11	142	15	242	20	342	28	442	47	542	220
043	13	143	17	243	23	343	32	443	54	543	280
044	15	144	19	244	25	344	36	444	62	544	350
045	17	145	22	245	28	345	40	445	69	545	430
050	9.4	150	13	250	17	350	25	450	41	550	240
051	11	151	15	251	20	351	29	451	48	551	350
052	13	152	17	252	23	352	32	452	56	552	510
053	15	153	19	253	26	353	37	453	64	553	920
054	17	154	22	254	29	354	41	454	72	554	1600
055	19	155	24	255	32	355	45	455	81	555	2400+

Keterangan :

"MPN" dari bakteri Coliform didalam setiap milli-liter sampel.