

ANALISIS PROSES PEMBUATAN TEMPE MELALUI CARA PRODUKSI HIGIENIS DAN PENDEKATAN MOLEKULER

Anisa Ratna Nugraini , Siti Harnina Bintari¹, Dewi Mustikaningtyas¹

¹Prodi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang, Indonesia

Gedung D6 Lt.1 Jl. Raya Sekaran Gunungpati, Semarang, Indonesia 50229

Info Artikel

Sejarah Artikel:

Diterima Januari 2016
Disetujui Maret 2016
Dipublikasikan April 2016

Keywords:

Escherichia coli, tempe, PCR

Abstrak

Hampir semua tahapan pembuatan tempe merupakan tahap kritis, sehingga dalam pembuatannya perlu menerapkan prinsip higienis. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi ada tidaknya kontaminasi bakteri *Escherichia coli* pada tempe segar dan untuk memprediksi kemungkinan faktor penyebab kontaminasi tersebut di sentra industri tempe Semarang Barat. Observasi dilakukan pada 17 industri tempe di Semarang Barat. Pengujian molekuler secara berturut-turut dilakukan dengan isolasi DNA, analisis DNA menggunakan primer 16E1/E2, dan uji mikrobiologi menggunakan medium Endo Agar. Berdasarkan hasil observasi, 16 industri tempe teridentifikasi ada bakteri *E.coli*. Satu industri tempe tidak teridentifikasi ada bakteri *E.coli*. Hal ini ada hubungannya terhadap diterapkannya cara produksi higienis. Hasil yang diperoleh dari isolasi DNA, 17 sampel menghasilkan konsentrasi DNA sebesar 26,250-903,350 ng/ μ l pada kemurnian DNA sebesar 1,521-1,946. Hasil analisis DNA menggunakan primer 16E1/16E2 pada elektroforesis gel agaros, 16 sampel menunjukkan pita DNA sebesar 584 bp. Hasil uji mikrobiologi pada medium Endo Agar, 16 sampel positif *E.coli* dengan menunjukkan koloni merah metalik. Kontaminasi bakteri *E.coli* pada tempe segar diduga berasal dari proses produksi tidak dengan dua kali perebusan, lingkungan sekitar dan pekerja.

Abstract

*Almost all phases in tempe production is critical stage, so it is need to apply the hygienic principle. This study attempts to identify the presence of *Escherichia coli* contamination in fresh tempe and to predict the possibility of factor that responsible in *E.coli* contamination in fresh tempe produced by tempe industry in Western Semarang. This research started with isolating DNA sample, and then analyzing the DNA with PCR method using 16E1/E2 primer, and later, microbiologically confirmation test using Endo Agar medium. The observation is conducted in 17 industries in Western Semarang. The results from isolating the DNA of 17 tempe samples produce DNA concentration of 26,250-903,350 ng/ μ l, while the DNA purity is 1,521-1,946. The results of DNA analysis using 16 E1/E2 primer showed that 16 tempe samples displayed DNA tape of 584 bp. The results of microbiologic test showed that 16 tempe samples positively *E.coli*-contaminated which identified by having a metallic pink colony in Endo Agar medium. Based on the results from observation, 16 industries is identified by having *E.coli* in the produced tempe because yet to apply hygienic production. As described above, *E.coli* contamination came from the environment, the worker, and the production process is not with boiling twice.*

© 2016 Universitas Negeri Semarang

 Alamat korespondensi:

Gedung D6 Lt.1, Jl. Raya Sekaran,
Gunungpati, Semarang, Indonesia 50229
E-mail: lifesciencejournal@yahoo.com

p-ISSN 2252-6277
e-ISSN 2528-5009

PENDAHULUAN

Industri tempe di Indonesia merupakan industri yang didominasi oleh produsen kecil dan menengah. Menurut data Standar Nasional Indonesia (SNI) tahun 2009 hanya sekitar 5% industri tempe yang telah menerapkan prinsip higienis (SNI 2009). Prinsip higienis meliputi proses produksi dengan dua kali pemanasan, kebersihan dan kesehatan pekerja, serta kebersihan lingkungan dan alat yang digunakan (Bintari 2013; Bintari & Maskar 2012).

Hampir semua tahapan dalam pembuatan tempe merupakan tahap kritis yang mempengaruhi produk tempe. Prinsip higienitas perlu diterapkan dalam produksi tempe, agar dihasilkan tempe terbebas dari kontaminasi. Bakteri yang paling banyak mengkontaminasi adalah *E.coli*, karena bakteri tersebut banyak terdapat pada air dan tanah yang telah tercemar feses manusia (Siagian 2002).

Bakteri *E.coli* akan mengkontaminasi tempe segar melalui proses produksi yang tidak higienis, seperti perendaman dan perebusan hanya dilakukan sekali. Kontaminasi juga dapat melalui bahan baku tempe, seperti air dan kedelai, alat-alat produksi, serta melalui perilaku pekerja yang tidak bersih, seperti kebiasaan menginjak-injak kedelai, merokok, tiduran di area produksi dan kebiasaan lain yang kurang produktif. Kontaminasi terjadi karena lingkungan dan sanitasi yang buruk, seperti sumber mata air dekat dengan mandi cuci kakus (MCK) atau tempat pembuangan, sehingga dapat terjadi pencemaran feses pada sumber air (Chandra 2007; Bintari & Maskar 2012).

Menurut SNI 3144 (2009), batas minimal kontaminasi *E.coli* adalah 10 cfu/mL. Menurut Peraturan Menteri Kesehatan RI Nomor 1096/MENKES/PER/VI/2011 tentang Higiene sanitasi Jasaboga, yaitu dalam persyaratan teknis higiene dan sanitasi serta cara pengolahan makanan yang baik, jumlah *E.coli* pada makanan atau bahan pangan harus nol (PMK No. 1096 2011). Sejumlah perusahaan makanan seperti PT. Indofood CBP Sukses Makmur Tbk telah menerapkan Peraturan Menteri Kesehatan No. 1096, yaitu syarat bahan pangan yang akan

dilah pada perusahaan tersebut termasuk tempe harus nol *E.coli* (PMK No. 1096 2011).

Industri kecil menengah (IKM) tempe di Krobokan dan Tandang Semarang belum menerapkan prinsip higienis. Sebanyak 27 IKM tempe di daerah tersebut memproduksi tempe positif terkontaminasi bakteri *E.coli* (Bintari *et al.* 2014). Tempe segar yang diproduksi oleh IKM tempe yang belum menerapkan prinsip higienis sangat dimungkinkan beresiko terkontaminasi bakteri *E.coli*. Observasi penelitian ini dilakukan pada IKM tempe di Semarang Barat terhadap diterapkannya cara produksi higienis. Konfirmasi antara hasil observasi dengan uji molekuler digunakan untuk memprediksi kemungkinan faktor penyebab kontaminasi *E.coli* pada tempe segar yang diproduksi oleh IKM tempe di Semarang Barat.

METODE PENELITIAN

Pengambilan sampel tempe dilakukan di Kelurahan Krobokan, Semarang Barat. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Negeri Semarang. Penelitian dilakukan pada bulan Februari 2015 - Agustus 2015. Bahan utama yang digunakan adalah 17 tempe segar dari 17 IKM, NaCl 0,9%, TE pH 8, 10 mM TRISBase pH 7,5, 1 Mm EDTA pH 8,0, 0,5% SDS, lisozim (10 mg/ml), proteinase K, RNase A, *buffer* TE, chelex 100, 10% CH₃COONa 3 M, etanol 95%, etanol 70%, akuabides, *Green Tag Master Mix*, primer 16E1: GGG AGT AAA GTTAAT ACC TTT GCT C (Biotech) ; primer 16E2: TTC CCG AAG GCA CAT TCT (Biotech), *middle range ladder*, kontrol positif berupa DNA murni *E.coli*, kontrol negatif berupa DNA murni *Salmonella typhimurium*, 20 g/L agaros, 5 x TAE, EtBr, *loading dye*, *parafilm*, medium Endo Agar, akuades. Alat yang digunakan pisau, blender, tabung reaksi, erlenmeyer, gelas beker, gelas ukur, mikropipet, tip, pipet tetes, rak tabung, *tube eppendorf*, rak *eppendorf*, *freezer* -20°C, neraca analitik, vortex, mikrosentrifus, spektrofotometer, PCR *Thermal Cycle*, *microwave*, elektroforesis gel mini, UV transiluminator,

mikrotube, petridisk, autoklaf, inkubator, almari es.

Observasi pada 17 IKM tempe terhadap diterapkannya cara produksi higienis. Pengujian molekuler secara berturut-turut dilakukan dengan isolasi DNA sampel menggunakan metode Chelex 100-Microwave, amplifikasi DNA menggunakan primer *16E1/16E2* dan uji mikrobiologi menggunakan medium Endo Agar. Penelitian ini dilakukan dengan cara deskriptif kualitatif, yaitu dengan melakukan analisis deskripsi terhadap parameter higienitas pada IKM tempe di Semarang Barat kaitannya dengan hasil pengujian molekuler.

Observasi IKM Tempe di Semarang Barat.

Observasi dilakukan untuk mendata apakah IKM tempe sudah menerapkan cara produksi higienis. Apabila salah satu dari sembilan parameter higienitas tidak terpenuhi, maka IKM tersebut termasuk IKM yang belum menerapkan prinsip higienis dalam proses produksinya.

Isolasi DNA Genom dari Sampel Tempe Segar.

Isolasi DNA genom menggunakan metode Chelex-100 Microwave yang telah di modifikasi. 25 gr tempe disentrifus dengan 225 ml NaCl 0,9% pada 1000 rpm selama 1 menit. Supernatan disentrifus pada 10.000 rpm selama 5 menit. Pelet dicuci dengan 500 μ l TE pH 8,0. Sel disuspensi dalam 50 μ l TES *buffer* lisis dan lisozim 10 mg/ml pada microwave selama 4 menit, 625 W. Segera ditambahkan 150 μ g proteinase K dan 20 μ g RNase A pada suspensi tersebut, kemudian microwave dengan kondisi yang sama. Setelah lisis, suspensi diinkubasi 2 menit pada suhu ruang. Suspensi ditambahkan 150 μ l *buffer* TE dan 25 mg chelex 100, kemudian dipanaskan dalam microwave dengan kondisi yang sama. Campuran disentrifus pada 10.000 rpm selama 10 menit. 500 μ l supernatan dipresipitasi dengan 50 μ l 10% sodium asetat 3 M dan 2.5 volume etanol 95%, kemudian sentrifus 10.000 rpm selama 2 menit. Pelet DNA dicuci dengan 1 ml 70% etanol dingin, kemudian dikeringkan pada suhu ruang dan diresuspensi dengan 20 μ l akuabides (Bintari *et al* 2014).

Uji Kualitatif dan Kuantitatif DNA Genom.

Uji kualitatif dengan analisis melalui elektroforesis gel agaros 0,8%. Uji kuantitatif menggunakan spektrofotometer Uv-Vis. Konsentrasi DNA diperoleh berdasarkan absorbansi panjang gelombang 260 nm, sedangkan kemurnian DNA diperoleh berdasarkan rasio absorbansi panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

Analisis DNA Menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR).

Amplifikasi DNA dilakukan dengan mencampurkan 12,5 μ l PCR master mix, 2 μ L primer *16E1*, 2 μ L primer *16E2*, 6,5 μ L *ddH2O*, dan 2 μ L *template* DNA pada *termocycle*. Tahap-tahap PCR diatur, yaitu predenaturasi 5 menit pada suhu 94°C, dan 35 siklus selama 20 detik pada suhu 94°C, 30 detik pada suhu 56,9°C, 30 detik pada suhu 72°C, kemudian ekstensi akhir 10 menit pada 72°C.

Analisis Amplikon Hasil PCR Menggunakan Elektroforesis Gel Agaros.

Hasil amplifikasi DNA sebanyak 2 μ l dianalisis menggunakan elektroforesis gel agaros 1,2 % dalam 0,5 x *buffer* TBE. DNA *Ladder middle range* dimasukkan pada sumur pertama, kontrol positif pada sumur kedua, kontrol negatif pada sumur ketiga, dan sampel pada sumur ke empat sampai sumur ke 20. Gel elektroforesis dialiri arus listrik 50 V selama 20 menit. Pita DNA divisualisasi menggunakan UV transiluminator. Pita DNA yang terlihat dibandingkan dengan pita kontrol positif dan DNA *ladder*. Sampel positif *E.coli* apabila pada gel agaros terdapat pita berukuran 584 bp.

Uji Mikrobiologi Menggunakan Medium Endo Agar.

Sampel tempe 1 gr dihaluskan dan dihomogenkan dengan 9 ml aquades. 50 μ l sampel diinokulasi pada medium Endo Agar. Inkubasi dilakukan selama \pm 18 jam. Koloni *E.coli* pada medium Endo Agar berwarna merah metalik. Negatif *E.coli* apabila tidak terdapat koloni merah metalik.

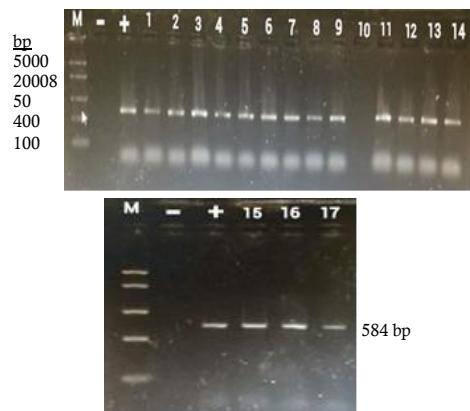
Konfirmasi Hasil Observasi Tempe Segar pada IKM di Semarang Barat dengan Hasil Identifikasi Bakteri *E.coli* Menggunakan Uji PCR dan Mikrobiologi.

Hasil observasi pada 17 IKM tempe terhadap terpenuhinya sembilan parameter higienitas dalam produksi tempe dikonfirmasi dengan hasil uji PCR dan mikrobiologi. Hasil konfirmasi tersebut untuk memprediksi kemungkinan faktor penyebab kontaminasi *E.coli* pada tempe segar yang diproduksi oleh IKM tempe di Semarang Barat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Observasi pada 17 (tujuh belas) IKM tempe di Semarang Barat berdasarkan sembilan parameter higienitas dalam proses produksi tempe. Hasil observasi, sebanyak 16 (enam belas) IKM belum menerapkan cara produksi higienis. Satu IKM tempe telah menerapkan cara produksi higienis. IKM tempe higienis apabila telah memenuhi sembilan parameter higienitas (SNI 2009). Identifikasi bakteri *E.coli* pada tempe segar secara molekuler dilakukan dengan isolasi DNA dan amplifikasi DNA.

Hasil isolasi DNA menghasilkan konsentrasi DNA sebesar 26,250-903,350 ng/μl pada kemurnian DNA sebesar 1,521-1,946. Pada visualisasi gel agaros menghasilkan fragmen DNA yang tebal dan sedikit *smear*. Hal tersebut karena konsentrasi DNA yang dihasilkan cukup tinggi, namun masih terdapat sedikit kontaminan. Konsentrasi DNA yang tinggi tidak dapat dijadikan sebagai *template* DNA pada reaksi PCR. Konsentrasi DNA yang tinggi menyebabkan kualitas DNA kurang baik, sehingga kontaminan akan bertambah (Sunandar & Imron 2010). Pengenceran isolat DNA dilakukan sampai dihasilkan fragmen DNA yang tipis pada gel agaros. DNA dengan konsentrasi lebih rendah akan meminimalisir kontaminan dan lebih mudah bagi primer spesifik untuk menempel pada situs penempelan DNA target (Sunandar & Imron 2010). Hasil uji PCR menggunakan primer 16E1/16E2 pada elektroforesis gel agaros, 16 (enam belas) sampel teramplifikasi dengan dihasilkannya fragmen DNA sebesar 584 bp. Satu sampel tidak menunjukkan fragmen DNA sebesar 584 bp. Hasil Uji molekuler dapat dilihat pada Gambar 1.



Keterangan: M. DNA marker (*middle range*); (1-17). Sampel nomor 1-17; -. Kontrol negatif (*S.typhimurium*); +. Kontrol positif (*E.coli*). 16 dari 17 sampel teridentifikasi terkontaminasi *E.coli* dengan produk PCR sebesar 584 bp. Satu sampel nomor 10 dan kontrol negatif tidak memperlihatkan adanya pita hasil amplifikasi.

Gambar 1. Visualisasi Produk Amplifikasi DNA dengan Primer 16E1/16E2 pada Elektroforesis Gel Agarose 1,2%.

Setelah identifikasi secara molekuler menggunakan PCR, dilakukan uji mikrobiologi menggunakan medium Endo Agar. Hasil uji mikrobiologi, 16 (enam belas) sampel positif mengandung bakteri *E.coli*. Satu sampel tidak mengandung bakteri *E.coli*. Sampel positif mengandung bakteri *E.coli* dengan menunjukkan koloni berwarna merah metalik pada medium Endo Agar. Warna koloni merah disebabkan bakteri *E.coli* dan *coliform* memetabolisme laktosa menjadi aldehid dan asam, sehingga aldehid bereaksi dengan *fuchsin*. Koloni kilap logam disebabkan *E.coli* bereaksi dengan *fuchsin* kristal, sehingga *fuchsin* tersebut diserap (Hazar *et al* 2015). Sampel negatif mengandung bakteri *E.coli* tidak menunjukkan ada koloni merah metalik. Uji mikrobiologi memberikan hasil yang sesuai dengan hasil uji molekuler. Sebanyak 16 (enam belas) sampel positif mengandung bakteri *E.coli*. Satu sampel negatif mengandung bakteri *E.coli*. Konfirmasi hasil observasi IKM tempe dengan hasil identifikasi bakteri *E.coli* menggunakan uji PCR dan mikrobiologi dapat dilihat pada Tabel 1. Satu sampel negatif *E.coli* berasal dari IKM tempe higienis. Sampel tempe positif *E.coli*

menandakan pada sampel tersebut telah terkontaminasi bakteri *E.coli*. Prediksi penyebab kontaminasi bakteri *E.coli* pada tempe segar, karena IKM tempe belum menerapkan cara produksi higienis. Kontaminasi bakteri *E.coli* dapat terjadi akibat kontaminasi silang maupun kontaminasi langsung (Zulaikhah 2005). Kontaminasi silang melalui manusia atau peralatan yang tercemar. Kontaminasi langsung melalui bahan yang digunakan untuk pembuatan tempe, yakni kedelai dan air yang digunakan untuk merebus, merendam maupun mencuci kedelai.

Kebersihan lantai IKM tidak terpenuhi oleh IKM ke-7, dan 6 (enam) IKM tempe lainnya. Kondisi lantai IKM yang tidak rata, retak dan licin dapat dengan mudah menggenangkan air, terlihat kotor dan sulit dibersihkan. Lantai yang tergenang air menjadi habitat yang baik untuk pertumbuhan bakteri *E.coli*. Keberadaan air membantu bakteri *E.coli* untuk mengambil makanan dari luar dalam bentuk larutan. Berbagai macam bahan organik dan anorganik terlarut dalam air kotor yang menggenang merupakan sumber bakteri patogen (Mubarak & Chayatin 2009). Selain air yang

Tabel 2. Konfirmasi Hasil Observasi Tempe Segar pada IKM di Semarang Barat dengan Hasil Identifikasi Bakteri *E.coli* Menggunakan Uji PCR dan Mikrobiologi.

No	IKM Ke-	Parameter yang tidak terpenuhi	Hasil uji PCR			Hasil uji mikrobiologi pada medium Endo Agar, inkubasi 18 jam, suhu 37°C (Σ sel bakteri 10^4 sel/gr)
			K+	K-	S	
1	1, 6, 8, 9, 17	e, f, g, i	+	-	+	2,89; 3,26; 3,00; 2,38; 1,16
2	2,15,16	a, e, f, g, i	+	-	+	3,13; 2,64; 1,55
3	5,12	f, g, i	+	-	+	3,32, 1,47
4	3	a, d, e, f, g, i	+	-	+	2,10
5	4	c, e, f, g, i	+	-	+	2,44
6	7	a, b, c, e, f, g, i	+	-	+	2,53
7	11	a, c, e, f, g, i	+	-	+	2,40
8	13	b, e, f, g, i	+	-	+	3,00
9	14	a, b, e, f, g, i	+	-	+	2,64
10	10	-	+	-	-	-

Keterangan: K+. Kontrol positif; K-. Kontrol negatif; S. Sampel tempe; +. Positif *E.coli*; -. Negatif *E.coli*; a. Lantai IKM kedap air, rata, tidak retak dan tidak licin; b. Luas ventilasi 20% dari luas.

IKM tempe ke-7 merupakan IKM yang tidak memenuhi parameter higienitas paling banyak. IKM tersebut tidak memenuhi 7 (tujuh) dari 9 (sembilan) parameter. Semakin banyak parameter higienitas yang tidak terpenuhi oleh IKM tempe, menyebabkan resiko kontaminasi bakteri *E.coli* selama produksi tempe juga semakin besar. Hasil uji mikrobiologi menggunakan medium Endo Agar terhadap sampel tempe IKM ke-7, menghasilkan jumlah sel bakteri *E.coli* bervariasi jika dibandingkan dengan 16 (enam belas) IKM lainnya. Keberadaan bakteri *E.coli* secara kuantitatif ternyata dipengaruhi oleh faktor higienitas, diantaranya penerapan dua kali perebusan, pakaian yang digunakan oleh pekerja, dan fasilitas kebersihan yang terawat dengan baik (Tabel 1).

menggenang, tanah yang terdapat pada lantai juga mengandung mikroorganisme patogen dalam jumlah yang besar. Tanah dapat mencemari bahan pangan melalui pakaian, udara dan debu (Kusmayadi & Sukandar 2008). Kondisi demikian menyebabkan bakteri *E.coli* pada lantai dapat mengkontaminasi bahan baku tempe, peralatan produksi dan produk tempe melalui kontaminasi secara langsung maupun tidak langsung.

IKM ke-7 dan IKM ke-14 tidak mempunyai ventilasi dengan luas yang mencukupi. IKM tempe yang tidak mempunyai ventilasi dengan luas minimal 20% dari luas lantai akan menyebabkan keadaan ruang IKM menjadi lembab. Keadaan lembab disebabkan karena kurangnya cahaya dan sirkulasi udara segar yang masuk ke dalam ruang IKM. Kondisi

tempat yang lembab dan kurang cahaya merupakan habitat yang baik untuk pertumbuhan bakteri *E.coli*. Keadaan kurang cahaya sangat menguntungkan untuk kelangsungan hidup bakteri *E.coli*. Sebagian besar bakteri adalah *chemotrophe*, sehingga pertumbuhannya tidak bergantung pada adanya cahaya matahari. Cahaya matahari dapat membunuh bakteri karena pengaruh sinar ultraviolet (Pelczar & Chan 2006). Menurut Rahayu (2013), ruang yang lembab akan menyebabkan bahan pangan yang disimpan dalam ruang tersebut mudah menyerap air, sehingga nilai aktivitas air meningkat. Kenaikan aktivitas air akan mengakibatkan mikroba mudah tumbuh. Selain itu, kondisi ruang yang lembab dan kurang cahaya juga dapat menjadi sarang serangga hama dan binatang pengkerat. Keberadaan binatang tersebut, seperti tikus dan lalat dapat menjadi pembawa bakteri patogen yang akan berpindah pada bahan pangan (BPOM RI 2003).

Sumber air pada IKM tempe ke-7 serta IKM ke-4 dan ke-11 berjarak ≤ 10 m dari MCK. Apabila MCK berada diruang yang sama dengan ruang produksi dan jaraknya ≤ 10 m dari sumber air, maka akan menyebabkan pencemaran sumber air oleh bakteri *E.coli* yang berasal dari MCK. Sumber air yang digunakan oleh semua IKM tempe di Semarang Barat berasal dari sumur gali. Bakteri *E.coli* yang berasal dari MCK akan meresap melalui tanah dan mencemari sumber air sumur. Sumur yang jaraknya dekat dengan MCK akan mudah terkontaminasi air kotor yang berasal dari kegiatan MCK (Chandra, 2007). Menurut Pujiati & Pebriyanti (2010) Jarak antara sumur gali dengan *septic tank* mempunyai pengaruh yang signifikan terhadap kualitas mikrobiologi sampel air sumur gali. Kontaminasi bakteri *E.coli* pada tempe segar dapat disebabkan karena air yang digunakan selama proses produksi telah tercemar bakteri *E.coli* yang berasal dari kegiatan MCK.

Fasilitas kebersihan pada IKM ke-7 dan 14 (empat belas) IKM lainnya tidak terawat dengan baik. Fasilitas kebersihan yang tidak terawat dengan baik akan menyebabkan ruang IKM terlihat kotor, sehingga dapat menjadi sumber bakteri *E.coli*. Menurut Sugiyono (2010), kondisi

ruang pengolahan makanan yang kotor, seperti terdapatnya genangan air dan sampah yang berserakan dapat menjadi media pertumbuhan bakteri dan memberi dampak penularan bibit penyakit. Fasilitas kebersihan yang tidak terawat dengan baik dapat menyebabkan terjadinya kontaminasi silang bakteri *E.coli* dari fasilitas kebersihan ke bahan baku tempe melalui perantara manusia. Kontaminasi tersebut terjadi karena fasilitas kebersihan telah tercemar feses. Bakteri *E.coli* banyak digunakan sebagai indikator sanitasi serta paling banyak mengkontaminasi, karena bakteri tersebut banyak terdapat pada air dan tanah yang telah tercemar feses manusia (Riyanto & Abdillah 2012).

Tangan manusia dapat membawa bakteri *E.coli* setelah bersinggungan langsung dengan alat kebersihan. Penanganan produksi tempe tanpa mencuci tangan terlebih dahulu akan menyebabkan bakteri *E.coli* berpindah mencemari bahan baku tempe, air yang digunakan, peralatan produksi maupun produk tempe itu sendiri. Praktek higiene yang berkaitan dengan tidak mencuci tangan dengan bersih, menyebabkan bakteri *E.coli* dapat mencemari bahan pangan melalui kontak secara langsung (Ermayani 2004; Yunita & Dwipayanti 2010).

Pekerja pada IKM ke-7, dan 15 (lima belas) IKM tempe lainnya tidak menggunakan pakaian khusus bekerja. Sebagian besar pekerja laki-laki bertelanjang dada selama proses produksi tempe. Resiko kontaminasi bakteri *E.coli* pada tempe dapat terjadi karena pekerja tidak memakai pakaian khusus untuk bekerja atau hanya bertelanjang dada. Pakaian yang juga digunakan untuk beraktifitas diluar proses produksi menyebabkan debu dapat menempel pada pakaian tersebut. Debu yang menempel pada tubuh atau pakaian akan berpindah kedalam bahan baku tempe. Udara yang mengandung debu dapat menjadi sumber kontaminasi mikroorganisme. Kontaminasi dari lingkungan sekitar mengakibatkan udara mengandung berbagai mikroorganisme, seperti *E.coli* dan *Staphylococcus aureus* (Sugiyono 2010).

Bakteri *E.coli* dapat bertahan hidup dalam keadaan kering, seperti debu yang menempel

pada pakaian atau tubuh. Bakteri *E.coli* dapat tumbuh pada habitat diluar sel inang dalam jangka waktu yang lama, namun tidak dapat memperbanyak diri secara signifikan seperti saat berada pada sel inangnya (Bhunia 2008). Menurut Fathonah (2005) pakaian yang digunakan untuk menjamin sanitasi dan higiene pengolahan makanan adalah pakaian yang bersih, berlengan, menutupi bahu dan ketiak pekerja. Pakaian juga harus mudah dicuci dan berwarna terang, sehingga akan lebih mudah terdeteksi adanya kotoran pada pakaian yang berpotensi untuk menyebar pada produk pangan yang sedang diolah.

IKM ke-7 dan 15 (lima belas) IKM lainnya tidak menggunakan peralatan terbuat dari *stainless steel*. Sebagian besar IKM tempe menggunakan peralatan yang terbuat dari alumunium yang sudah berkarat. Kontaminasi bakteri *E.coli* pada tempe dapat terjadi apabila didalam drum yang digunakan selama proses perendaman kedelai sangat lembab. Kondisi alat yang lembab menjadi habitat yang baik untuk pertumbuhan *E.coli*. Pertumbuhan dan metabolisme mikroba memerlukan air dalam bentuk yang tersedia. Sebagian besar mikroba tumbuh baik pada bahan pangan yang mempunyai *water activity* (aw) 0,9-0,97. Nilai aw minimum untuk pertumbuhan *E.coli* adalah 0,96 (Zulaikhah 2005). Tingginya pertumbuhan bakteri kontaminan pada kedelai menyebabkan terhambatnya proses fermentasi, sehingga mempengaruhi status higienitas dan kualitas dari produk tempe tersebut (Winarni *et al.* 2014). Selain dapat menyebabkan kontaminasi *E.coli*, drum alumunium yang berkarat mengandung logam berat yang dapat berpindah kedalam kedelai dan tempe itu sendiri (Bintari *et al.* 2014).

Proses produksi dengan dua kali perebusan tidak dilakukan oleh IKM ke-7 dan 15 (lima belas) IKM lainnya. Proses perebusan yang hanya dilakukan satu kali akan mempengaruhi keberadaan bakteri *E.coli*. Proses perebusan dua kali merupakan proses produksi higienis yang sangat penting. Pemanasan pertama berfungsi untuk imbibisi, gelatinisasi dan menghilangkan senyawa zat antigihi agar proses pertumbuhan jamur tempe (*Rhizopus sp*) berjalan baik.

Pemanasan kedua berupa perebusan atau pengukusan, dilakukan untuk membunuh semua bakteri kontaminan yang mungkin berasal selama proses perendaman kedelai berlangsung (Bintari 2013). Tidak dilakukan pemanasan kedua menyebabkan bakteri kontaminan tetap tumbuh. Menurut Chotiah (2010), pasteurisasi susu pada suhu 60-80°C selama beberapa menit dapat mengeliminasi bakteri patogen, seperti bakteri *E.coli*. Pemanasan dengan cukup waktu dan pemanasan kembali dapat menurunkan jumlah bakteri patogen, sehingga aman untuk dikonsumsi (Hiswani 2003).

Pemanasan kedua dengan pasteurisasi suhu 60°C akan membunuh bakteri *E.coli*. Bakteri *E.coli* akan mati pada suhu diatas 60°C karena bakteri *E.coli* tidak mempunyai spora untuk perlindungan diri. Suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri *E.coli* adalah 37°C, namun juga mampu tumbuh pada kisaran suhu yang lebar, yaitu antara 15°C-45°C. Bakteri *E.coli* juga dapat bertahan pada suhu 55°C selama 60 menit dan pada suhu 60°C selama 15 menit (Pelczar & Chan 2006).

IKM ke-3, ke-11 dan ke-14 merupakan IKM tempe yang tidak memenuhi parameter higienitas terbanyak kedua. Pada IKM tersebut tidak memenuhi enam parameter higienitas. Tempat penyimpanan tempe pada IKM ke-3 berada di tempat terbuka dan tidak mudah dibersihkan. Tempat penyimpanan tempe yang terbuka dan tidak mudah dibersihkan, akan menyebabkan debu yang berasal dari polusi lingkungan luar, serta asap kendaraan bermotor menempel pada rak penyimpanan. Debu tersebut dapat membawa bakteri *E.coli*, sehingga akan mencemari produk tempe. Keberadaan bahan pangan dalam tempat terbuka dapat meningkatkan resiko tercemar mikroorganisme, baik melalui udara, debu, bahkan serangga (Febria *et al.* 2009). Tempat penyimpanan tempe yang berada dipinggir jalan dan bersebelahan dengan tempat sampah akan menyebabkan terjadinya resiko kontaminasi bakteri *E.coli*. Menurut Hiswani (2003) sampah yang mudah membusuk merupakan sumber makanan lalat. Lalat merupakan salah satu vektor penyakit

saluran pencernaan, seperti tipus, kolera, diare dan disentri.

IKM ke-3, ke-11 dan ke-14 positif teridentifikasi *E.coli* berdasarkan hasil uji PCR dan mikrobiologi. Tiga IKM tempe tersebut tidak memenuhi enam parameter higienitas yang berbeda-beda menghasilkan jumlah sel *E.coli* yang tidak berbeda secara signifikan. Jumlah sel *E.coli* tersebut sama dengan hasil uji mikrobiologi pada IKM ke-2, ke-4, ke-13, ke-15, dan ke-16. Faktor higienitas yang tidak terpenuhi oleh IKM tempe memberikan kontribusi terhadap terjadinya kontaminasi bakteri *E.coli* pada tempe.

IKM tempe ke-1, ke-6, ke-8, ke-9, dan ke-17 tidak memenuhi empat parameter higienitas yang sama. IKM tempe ke-5 dan ke-12 tidak memenuhi tiga parameter higienitas yang sama. IKM yang tidak memenuhi parameter higienitas yang sama, menghasilkan jumlah *E.coli* yang beragam. Kondisi praktek higiene pada setiap IKM tersebut berbeda-beda. Kontaminasi bakteri *E.coli* pada tempe segar secara kuantitatif dipengaruhi oleh penerapan praktek higiene yang kurang baik. Praktek higienie yang kurang baik akan mempengaruhi keberadaan bakteri *E.coli* (Setyorini 2013)

Konfirmasi antara hasil observasi pada IKM tempe di Semarang Barat dengan hasil identifikasi bakteri *E.coli* menggunakan uji PCR dan mikrobiologi, keberadaan bakteri *E.coli* secara kuantitatif karena IKM tempe tidak menerapkan praktek higienitas dengan baik dan benar. Semakin banyak parameter higienitas yang tidak terpenuhi oleh IKM tempe, maka resiko kemungkinan terjadinya kontaminasi pada tempe juga semakin besar. Delapan kemungkinan penyebab kontaminasi bakteri *E.coli* pada tempe segar yaitu karena proses produksi tempe hanya dengan satu kali perebusan; pekerja tidak menggunakan pakaian khusus bekerja; peralatan yang digunakan *non steinless steel*; fasilitas kebersihan tidak tersedia dan terawat dengan baik; lantai IKM tidak kedap air, tidak rata, retak dan licin; luas ventilasi $\leq 20\%$ dari luas lantai; sumber air berjarak ≤ 10 m dari MCK; dan tempat penyimpanan tempe tidak kering dan tidak mudah dibersihkan.

Status higienitas tempe sangat penting untuk mewujudkan makanan potensial. Beberapa produsen tempe belum menyadari pentingnya memperhatikan sanitasi dan higienitas dalam proses produksi tempe, akibatnya hal tersebut dapat menyebabkan kontaminasi bakteri patogen kedelai dan tempe itu sendiri. Penerapan prinsip higienis dalam proses produksi tempe serta mengubah pola pikir mengenai cara produksi higienis menjadi sangat penting untuk menghasilkan produk tempe dengan kualitas baik. Hal tersebut sebagai upaya untuk meningkatkan *food safety* dan terwujudnya tempe sebagai pangan yang potensial dan fungsional.

SIMPULAN

1. Satu IKM tempe di Semarang Barat memproduksi tempe bebas kontaminasi bakteri *E.coli*.
2. Prediksi kemungkinan penyebab kontaminasi bakteri *E.coli* dapat berasal dari proses produksi dengan tidak dua kali perebusan, lingkungan sekitar IKM tempe dan pekerja.

DAFTAR PUSTAKA

- [BPOM] Balai Pengawasan Obat dan Makanan. (2003). *Higiene dan Sanitasi Pengolahan Pangan*. Jakarta : BPOM
- [PMK RI] Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia. (2011). *Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 1096/Menkes/Per/Vi/2011 Tentang Higiene Sanitasi Jasaboga*. <Https://Maharani2015.Files.Wordpress.com>. (Diakses Tanggal 3 April 2014).
- [SNI] Standardisasi Nasional Indonesia (2012). *Tempe: Persembahan Indonesia Untuk Dunia*. <http://www.bsn.go.id/uploads/download/Booklet tempe-printed21.pdf>. (Diakses tanggal 3 april 2014).
- Bhunia, A. K. (2008). *Foodborne Microbial Pathogens*. New York: Springer.
- Bintari, S. H & Maskar, D. H. (2012). Application of Food Hygienic Practices (GHP) At The Tempe Production in Kuripan Kidul Pekalongan. *Prosiding Seminar Nasional Integrasi Kebijakan dan Penguatan Industri Nasional Menuju*

- Percepatan dan Perluasan Ekonomi Indonesia*. Jurusan Ekonomi Pembangunan Fakultas Ekonomi Universitas Negeri Semarang. Pp: 368-379.
- Bintari, S. H., Fibriana, F., Mustikaningtyas, D., Iswari, R. S. (2014). PCR Approach For Rapid Detection of *Escherichia coli* In Tempe Using A Specific Primer. *Journal of Biological Researches* : 19 (54-59).
- Bintari, S. H. (2013). Pasteurization for Hygienic Tempe: Study Case Of Krobokan Tempe Yesterday and Today. *GSTF Internasional Journal Of Biosciences (Jbio)* Vol. 2 No. 2.
- Chandra, B. (2007). *Pengantar Kesehatan Lingkungan*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Chotiah, S. (2010). Beberapa Bakteri Patogen yang Mungkin dapat ditemukan pada Susu Sapi dan Pencegahannya. *Semiloka Nasional Prospek Industri Sapi Perah Menuju Perdagangan Bebas*. Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor.
- Ermayani, D. (2004). Hubungan Antara Kondisi Sanitasi dan Praktik Penjamah Makanan dengan Kandungan *Escherichia coli* pada Nasi Pecel di Kelurahan Sumurboto dan Tembalang Semarang. *Jurnal FKM Undip*.
- Fathonah, S. (2005). *Higiene dan Sanitasi Makanan*. Semarang: UNNES Press.
- Febria, A., Pambayun, R., Febry, F. (2009). Hygiene dan Sanitasi pada Pedagang Makanan Jajanan Tradisional di Lingkungan Sekolah Dasar di Kelurahan Demang Lebar Daun Palembang. *Jurnal Penelitian Hygiene Sanitasi*.
- Hazar, M., Salim, M., Mardiah, E. (2012). Keberadaan *Escherichia coli* Resistan Antibiotik pada Ikan Baling (*Pristolepis Fasciata*) di Sungai Batang Arau. *Jurnal Penelitian Fmipa Unand*.
- Hiswani. (2003). Diare Merupakan Salah Satu Masalah Kesehatan Masyarakat Yang Kejadiannya Sangat Erat Dengan Keadaan Sanitasi Lingkungan. [Online At <http://library.usu.ac.id> On 3 Januari 2016].
- Kusmayadi, A., Sukandar, D. (2008). *Cara Memilih dan Mengolah Makanan Untuk Perbaikan Gizi Masyarakat*. [Online at <http://database.deptan.go.id> on 2 Januari 2016]
- Mubarak., & Chayatin. (2009). *Ilmu Kesehatan Masyarakat Teori dan Aplikasi*. Jakarta: Salemba Medika
- Pelczar, M. J., & Chan. (2006). *Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid II*.1. Terjemahan Ratna Siri H, Teja Imas, S. Sutarmi dan Sri Lestari A. UI-Press. Jakarta.
- Pujiati, R. S., Pebriyanti, D. O. (2010). Pengaruh Jarak Sumur Gali dengan Septic Tank Terhadap Kandungan Bakteri Coliform pada Air Sumur Gali (Studi Di Kelurahan Citrodiwangsan, Kecamatan Lumajang, Kabupaten Lumajang). *Jurnal IKESMA*, Vol. 6 No. 1.
- Rahayu, N. A. (2013). Studi Deskriptif Karakteristik Higiene dan Sanitasi pada Alat Pengolah Makanan Gado-Gado di Lingkungan Pasar Johar Kota Semarang. *Skripsi*. Jurusan Ilmu Kesehatan Masyarakat, Universitas Negeri Semarang.
- Riyanto, A., & Abdillah, A. D. (2012). Faktor yang Memengaruhi Kandungan *E.coli* Makanan Jajanan SD di Wilayah Cimahi Selatan. *J.MKB*. Vol 44 No.2.
- Setyorini, E. (2013). Hubungan Praktek Higiene Pedagang dengan Keberadaan *Escherichia coli* pada Rujak yang dijual disekitar Kampus Universitas Negeri Semarang. *Unnes Journal of Public Health* 2 (3).
- Siagian, A. (2002). *Mikroba Patogen pada Makanan dan Sumber Pencemarannya*. USU Digital Library.
- Sugiyono, L. S. (2010). Gambaran Pengetahuan, Sikap, Praktik serta Identifikasi Bakteri *Escherichia coli* dan *Stapilococcus aureus* pada Penjamah dan Makanan di PT PSA (Pelita Sejahtera Abadi). *Artikel Penelitian FKM Undip*.
- Sunandar, D., Imron. (2010). Optimalisasi Template DNA Genom Udang Galah, *Macrobrachium Rosenbergii* dalam Proses PCR-RAPD. *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*.
- Winarni, R., Bintari, S. H., Mustikaningtyas, D. (2014). Studi Observasi Higienitas Produk Tempe Berdasarkan Perbedaan Metode Inokulasi. *Unnes J Life Sci* 3 (1).
- Yunita, N. L. P., & Dwipayanti, N. M. U. (2006). Kualitas Mikrobiologi Nasi Jingo Berdasarkan Angka Lempeng Total, *Coliform* Total, dan Kandungan *Escherichia coli*. *Jurnal Biologi*, Vol. XIV No 1.
- Zulaikhah, S. T. (2005). Analisis Faktor-Faktor yang Berhubungan dengan Pencemaran Mikroba pada Jamu Gendong di Kota Semarang. *Tesis*. Kesehatan Lingkungan Universitas Diponegoro.