



## **REDUKSI BAKTERI DAN BIRU METILEN, SERTA PERUBAHAN INTENSITAS PENCOKLATAN DAN pH SUSU AKIBAT PEMANASAN PADA SUHU 80 °C DALAM PERIODE YANG BERVARIASI**

**(Reduction in Bacterial Counts and Methylene Blue, Change in Browning Intensity and pH of Milk Heated at 80°C for Various Periods)**

T. Susilawati, S. B. M. Abduh, dan S. Mulyani  
Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro Semarang

### **ABSTRAK**

Serangkain percobaan pemanasan dengan suhu 80 °C dan periode yang bervariasi telah dilakukan pada sampel susu sapi untuk menganalisa reduksi bakteri, reduksi biru metilen, perubahan intensitas pencoklatan, dan perubahan pHnya. Pemanasan sampel dilakukan dalam botol 100 ml yang dibenamkan dalam penangas air. Pada setiap kombinasi suhu dan periode pemanasan, dilakukan 3 ulangan percobaan. Total bakteri dihitung secara cawan cuang, reduksi biru metilen diamati pada beberapa volume 10, 20, 30, 40, 50 dan 250 µL dalam 10,25 mL campuran dengan susu, intensitas pencoklatan diamati secara spektrofotometri dengan panjang gelombang 420 nm dan pH ditera dengan elektroda. Pengolahan data menggunakan analisa regresi dan deskriptif. Percobaan menghasilkan nilai D sebesar 5.789,26 detik, periode reduksi biru metilen 10 µL ( $R^2=0,910$ ) memenuhi persamaan  $y = -0,031x + 476,9$ , konstanta laju perubahan intensitas pencoklatan (k) sebesar 015, dan pH susu dalam rentang normal: 6,77 hingga 6,76.

Kata kunci: pemanasan susu; total bakteri; biru metilen; pencoklatan

### **ABSTRACT**

A set of heating experiments was carried out at 80 °C for various periods on milk samples to analyze their reduction in bacterial counts and methylene blue, as well as change in the browning intensity and pH. The samples were heated in 100 mL glass bottles immersed in water bath. Three replications were carried out on each period treatment. Bacterial counts were enumerated by pour plate method, reduction of methylene blue were evaluated on 10, 20, 30, 40, 50 dan 250 µL in 10.25 mL mix with milk samples, browning intensities were analyzed by mean of spectrophotometry at 420 nm and pH values were monitored by an electrode. Data processing used regression analysis and descriptive. Experiments resulted in a D value of 5,789.26 s, reduction period of 10 µL methylen blue ( $R^2=0.910$ ) confirmed a formula  $y = -0.031x + 476.9$ , browning rate constant (k) of 015, and normal range of pH values: 6.77-6.76.

Keywords: milk; heating; bacterial counts; methylene blue; browning

## PENDAHULUAN

Susu merupakan bahan makanan yang bergizi tinggi karena mengandung zat-zat makanan yang lengkap dan seimbang seperti protein, lemak, karbohidrat, mineral dan vitamin yang sangat dibutuhkan oleh manusia. Kandungan nilai gizi yang tinggi menyebabkan susu menjadi media yang sangat disukai oleh mikroorganisme untuk tumbuh dan berkembang sehingga bila tidak ditangani secara benar dalam waktu yang sangat singkat susu menjadi tidak layak untuk dikonsumsi.

Susu mempunyai sifat mudah rusak sehingga penanganan susu harus tepat dan cepat. Penanganan susu dapat dilakukan dengan cara pemanasan untuk memperpanjang masa simpan dan tidak mengurangi komponen-komponen susu. Proses pemanasan susu pada suhu dan periode waktu tertentu dengan tujuan membunuh kuman atau bakteri patogen.

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji kematian bakteri susu dan resiko kerusakan fisik-kimiawi akibat pemanasan pada suhu 80°C dengan periode yang bervariasi. Serta mengkaji lebih dalam hubungan antara total bakteri dan reduksi biru metilen sebagai dasar untuk meningkatkan efisiensi penggunaan *Methylene Blue Reductase Test* (MBRT). Adapun aspek fisik-kimiawi yang diamati adalah perubahan intensitas pencoklatan yang mencerminkan kerusakan susu akibat pemanasan. Manfaat dari penelitian ini adalah memperoleh informasi obyektif tentang kualitas bakteriologi susu segar yang diperoleh dari peternakan rakyat sebagai dasar penerapan metode pemanasan yang optimal.

## MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 11 April sampai 28 Juni 2013 di Laboratorium Rekayasa Pangan dan Hasil Pertanian Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro Semarang. Bahan yang digunakan adalah susu sapi segar dari Kelompok Tani Ternak (KTT) Rejeki Lumintu Gunung Pati, aquades steril, fosfat buffer, biru metilen, alkohol 70 %, dan *Nutrient Agar* (NA). Alat yang digunakan adalah timbangan elektrik, kertas timbang, pemanas dan magnetic stirrer, autoklaf, pH meter, spectrometer, botol kaca, thermometer, gelas

ukur, stopwatch, cawan petri, label, tisu, oven, kertas, water bath, microtube, pipet, inkubator, stopwatch, tabung reaksi, dan laptop.

Metode yang dilakukan dalam penelitian ini adalah menyiapkan alat dan bahan. Mensterilkan botol 100 ml untuk wadah pemanasan sampel dengan merebus botol 100 ml dalam uap air (mengukus) sampai suhu  $100^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit. Mensterilkan cawan untuk wadah menumbuhkan bakteri dengan merebus cawan pada suhu  $100^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit, kemudian mengeringkan dan membungkus cawan dengan kertas, selanjutnya melakukan pengovenan cawan pada suhu  $170^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam. Kemudian memanaskan susu dalam botol 100 ml pada suhu  $80^{\circ}\text{C}$  dalam periode yang bervariasi dengan waterbath penangas air, pemanasan dilakukan 3 kali ulangan dalam 3 botol, kemudian menyisipkan thermometer dan memantau suhu susu dalam sebuah botol, kemudian mendinginkan susu pada 3 botol tersebut menggunakan air es sampai suhu  $10^{\circ}\text{C}$ , dan sebuah botol lain tidak di panaskan untuk dijadikan kontrol, selanjutnya melakukan uji kualitas susu yang meliputi reduksi total bakteri, reduksi biru metilen, perubahan intensitas pencoklatan, dan perubahan pH.

### Uji Reduksi Total Bakteri Susu

Pengujian reduksi total bakteri susu dengan cara mengkulturkan sampel susu sebelum dan sesudah pemanasan pada media NA (*Nutrient Agar*), menimbang 11.5 gram media NA dan melarutkan dalam 500 ml aquades, memanaskan media NA dengan penangas stirer hingga mendidih, kemudian mensterilkan media NA, cawan petri dan microtube dalam autoklaf selama 60 menit pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$ . Selanjutnya mengambil sampel sebanyak 1 ml, melarutkan dan menghomogenkan sampel dalam 9 ml aquades, sehingga memperoleh pengenceran  $10^{-0}$ . Mengambil sampel sebanyak 1 ml dari pengenceran  $10^{-0}$  ke dalam 9 ml aquades untuk mendapatkan pengenceran  $10^{-1}$ . Mengambil dengan pipet sampel sebanyak 1 ml dari pengenceran  $10^{-1}$  ke dalam 9 ml aquades untuk mendapatkan pengenceran  $10^{-2}$  dan seterusnya hingga pengenceran  $10^{-5}$ . Selanjutnya menuangkan 10 ml media NA ke dalam cawan sampai media NA memadat, kemudian mengambil ke tiga sampel dengan pipet sebanyak 0,1 ml di atas media (*spread plate*). Kemudian

menginkubasi cawan dalam inkubator selama 48 jam dan menghitung jumlah bakteri yang tumbuh pada cawan.

### **Uji Reduksi Biru Metilen**

Pengujian reduktase menggunakan larutan pewarna biru metilen. Pengujian ini menggunakan konsentrasi biru metilen 10 $\mu$ l, 20 $\mu$ l, 30 $\mu$ l, 40 $\mu$ l, 50 $\mu$ l, dan 250 $\mu$ l dalam 10,250 $\mu$ l campuran air susu. Memasukkan campuran susu sebelum maupun sesudah pemanasan dengan larutan pewarna biru metilen sesuai konsentrasi dalam tabung reaksi secara perlahan dan menghindari pembentukan gelembung udara. menutup tabung reaksi dan mencampurkan larutan sampai memperoleh warna yang merata dengan cara membolak-balik tabung, kemudian menginkubasi tabung reaksi dalam penangas air suhu 37°C. Selanjutnya mengamati perubahan warna yang terjadi setiap setengah jam dan mencatat berapa lama waktu yang dibutuhkan untuk terjadinya perubahan warna.

### **Uji Perubahan Intensitas Pencoklatan Susu**

Pengujian intensitas pencoklatan susu menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 420 nm. Sebelumnya, membuat larutan fosfat buffer 7,4 yaitu dengan menimbang sodium dihidrogen fosfat (pH 4) sebanyak 7,8 gram yang dilarutkan ke dalam aquades sebanyak 500 ml. Kemudian menimbang 17,907 gram sodium hidrogen fosfat (pH  $\pm$  9) yang dilarutkan ke dalam aquades sebanyak 500 ml, mengambil larutan sodium dihidrogen fosfat sebanyak 100 ml, menambahkan dan mengaduk larutan sodium hidrogen fosfat sedikit demi sedikit hingga menunjukkan nilai pH 7,4. Selanjutnya mengambil sampel susu sebelum dan sesudah pemanasan masing-masing sebanyak 30  $\mu$ l dan menambahkan larutan fosfat buffer sebanyak 2970  $\mu$ l ke dalam tube. Kemudian memasukkan sampel ke dalam spektrofotometer dan hasilnya akan terlihat.

### **Uji Perubahan pH Susu**

Pengujian pH susu dilakukan dengan menggunakan pH meter. Prosedurnya yaitu menyalakan dan mencuci pH meter dengan aquades, kemudian pH meter

dilap menggunakan kertas hisap, pengukuran pH dilakukan dengan memasukkan elektroda ke dalam susu sebelum dan sesudah pemanasan, kemudian membaca nilai pH yang tertera, setelah selesai menggunakan pH meter kemudian membersihkan elektroda seperti pada awal pengukuran pH.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### **Reduksi Total Bakteri Susu Akibat Pemanasan pada Suhu 80°C dalam Periode yang Bervariasi**

Berdasarkan perhitungan reduksi total bakteri susu, diperoleh hasil bahwa semakin lama periode pemanasan maka semakin besar pula penurunan total bakteri. Total bakteri sebelum pemanasan sebanyak 11022 CFU/ml. Setelah pemanasan pada suhu 80°C terjadi penurunan bakteri tertinggi sebanyak 3566CFU/ml pada periode pemanasan 2100 detik. Pemanasan susu dapat menurunkan total bakteri yang memenuhi dan sudah mencapai standart untuk pemanasan dalam waterbath. BSN (2009) berpendapat bahwa batas maksimum cemaran mikroba dalam susu segar dan susu pasteurisasi, untuk total bakteri pada susu segar  $1 \times 10^6$  koloni/ml dan untuk susu pasteurisasi  $5 \times 10^4$  koloni/ml. Proses pasteurisasi susu ditujukan untuk membunuh bakteri patogen dalam susu, dengan cara merusak dinding sel bakteri, merusak membran sitoplasma bakteri dan menghambat kerja enzim yang dapat mengganggu metabolisme sel bakteri (Forsythe dan Hayes, 1998).

Semakin lama periode pemanasan maka semakin besar pula penurunan total bakteri pada susu. Demikian karena banyak spesies yang beragam dan memiliki ketahanan panas yang berbeda. Fardiaz (1992) berpendapat bahwa pencemaran bakteri setelah pemanasan dapat terjadi karena adanya bakteri yang tahan panas atau terjadi kontaminasi bakteri setelah proses pemanasan, misalnya peralatan yang digunakan. Pemanasan susu adalah upaya memperpanjang masa simpan pangan dengan menggunakan panas untuk membunuh semua mikroorganisme patogen dan mengurangi mikroorganisme perusak yang terdapat dalam susu (Gaman dan Sherrington, 1994). Pemanasan susu pada suhu 80°C dalam periode

bervariasi sudah efektif karena dapat menurunkan total bakteri yang memenuhi dan sesuai dengan standart.

Kurva diatas menunjukkan kematian atau berkurangnya total bakteri yang bertahan akibat pemanasan. Diperoleh hasil bahwa penurunan total bakteri belum mencapai 1 siklus logaritma atau penurunan sebesar 90%, sehingga diperoleh Nilai D sebesar 5789 detik. Menurut Heldman dan Singh (2001), nilai D adalah waktu yang diperlukan untuk mereduksi bakteri sebesar satu siklus log pada suhu tertentu. Data logaritmik perubahan bakteri digunakan untuk menghitung nilai D. Perhitungan nilai D menggunakan microsoft excel, dengan cara menghitung rata-rata log bakteri yang bertahan dan periode pemanasan sehingga diperoleh nilai kemiringan, selanjutnya menghitung absolut dikalikan 1 dibagi dengan nilai kemiringan, sehingga diperoleh nilai D. Nilai D yang diperoleh besar karena pemanasan yang sesuai membutuhkan periode yang lama, bakteri awal tinggi, dan sistem pemanasan menggunakan bath pasteurisasi.

### **Reduksi Biru Metilen Susu Akibat Pemanasan pada Suhu 80°C dalam Periode yang Bervariasi**

Berdasarkan pengamatan reduksi biru metilen, diperoleh hasil bahwa semakin besar volume biru metilen campuran dengan susu maka semakin panjang waktu yang dibutuhkan untuk mereduksi biru metilen. Dari keenam besaran volume biru metilen yang digunakan, diperoleh nilai  $R^2$  dari hasil analisa regresi, seperti yang terlihat pada lampiran 4 sampai 9. Nilai  $R^2 = 0,910$  pada volume biru metilen 10 $\mu$ l,  $R^2 = 0,691$  pada volume biru metilen 20 $\mu$ l,  $R^2 = 0,396$  pada volume biru metilen 30 $\mu$ l,  $R^2 = 0,041$  pada volume biru metilen 40 $\mu$ l,  $R^2 = 0,180$  pada volume biru metilen 50 $\mu$ l,  $R^2 = 0,000$  dengan volume biru metilen 250 $\mu$ l. Hasil dengan nilai  $R^2$  lebih kecil menunjukkan bahwa pola tidak sepenuhnya orde 1, tetapi masih dalam rentang atau mengikuti karena ketahanan panas berbeda. Fardiaz (1992) berpendapat bahwa pencemaran bakteri setelah pemanasan dapat terjadi karena adanya bakteri yang tahan panas atau terjadi kontaminasi bakteri setelah proses pemanasan. Reduksi biru metilen didasarkan pada kemampuan bakteri didalam susu untuk tumbuh dan menggunakan oksigen terlarut, yang menyebabkan penurunan kekuatan oksidasi-reduksi dari campuran tersebut,

akibatnya biru metilen yang ditambahkan menjadi putih. Hadiwiyo (1994) berpendapat bahwa semakin besar volume biru metilen yang ditambahkan dalam campuran susu maka semakin panjang waktu yang dibutuhkan untuk mereduksi biru metilen. Semakin lama hilangnya warna biru, menunjukkan jumlah bakteri yang semakin sedikit, yang menunjukkan kualitas susu nya semakin baik. Reduksi biru metilen yang paling baik yaitu pada volume biru metilen 10 $\mu$ l campuran dengan susu, karena mempunyai nilai  $R^2$  atau koefisien korelasi besar dan berpengaruh terhadap waktu reduksi biru metilen lebih cepat.

#### **Perubahan Intensitas Pencoklatan Susu Akibat Pemanasan pada Suhu 80°C dalam Periode yang Bervariasi**

Berdasarkan pengamatan perubahan intensitas pencoklatan susu, diperoleh hasil bahwa semakin besar perubahan intensitas pencoklatan dipengaruhi oleh suhu dan periode pemanasan yang tinggi. Perubahan intensitas pencoklatan susu sebelum pemanasan sebesar 61%, dan setelah pemanasan perubahan intensitas pencoklatan tertinggi sebesar 105%. Nilai koefisien korelasi ( $R^2$ ) dari analisa regresi sebesar 0,639. Pemanasan susu pada suhu dan periode pemanasan yang bervariasi berpengaruh terhadap perubahan intensitas pencoklatan. Warna susu yang normal adalah putih sedikit kekuningan. Menurut Legowo dkk (2009) bahwa warna kekuningan merupakan cerminan warna karoten dalam susu. Muchtadi (2010) berpendapat bahwa warna coklat merupakan hasil akhir dari reaksi aldehyd-aldehyd aktif terpolimerisasi dengan gugus amino membentuk senyawa coklat yang disebut melanoidin. Reaksi pencoklatan atau reaksi *maillard* terjadi karena adanya reaksi antara gula pereduksi dengan gugus amin bebas dari asam amino atau protein.

#### **Perubahan pH Susu Akibat Pemanasan pada Suhu 80°C dalam Periode yang Bervariasi**

Berdasarkan pengamatan perubahan pH susu, diperoleh hasil bahwa nilai pH susu normal. Nilai pH susu sebelum pemanasan sebesar 6,77 dan setelah pemanasan pada periode 2100 detik sebesar 6,76. Menurut Murti (2010) susu banyak disukai oleh makhluk hidup, termasuk bakteri karena selain komposisi

gizinya yang lengkap, pH susu juga mendekati pH normal, yaitu 6,6 sampai 6,8 dan kadar air yang tinggi, yaitu 87 sampai 88%. Menurut Adnan (1984) penurunan pH diakibatkan oleh aktivitas bakteri yang disebabkan karena aktivitas fosfat buffer, sitrat dan protein atau pengasaman susu karena aktivitas bakteri menyebabkan mengendapnya kasein dalam protein setelah proses pemanasan. Perubahan pH sebagian besar disebabkan oleh asam yang dihasilkan dari aktivitas bakteri yang merusak nilai protein yang terkandung dalam susu. Ditambahkan oleh Widodo (2003) bahwa perubahan laktosa menjadi asam laktat akan disertai dengan terbebasnya ion hydrogen yang akan meningkatkan dan menurunkan pH. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa suhu dan periode pemanasan susu tidak berpengaruh terhadap perubahan pH, penurunan pH tergolong normal atau tidak terjadi penurunan yang berbeda jauh.

### **SIMPULAN DAN SARAN**

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penurunan total bakteri susu dipengaruhi oleh pemanasan, penurunan bakteri belum mencapai 1 siklus logaritma yaitu sebesar 5789,26 detik. Reduksi biru metilen ditunjukkan oleh koefisien regresi lebih besar pada volume 10 $\mu$ l biru metilen dalam waktu pengamatan yang lebih pendek. Perubahan intensitas pencoklatan dipengaruhi oleh perlakuan suhu dan periode pemanasan. Perubahan nilai pH susu normal atau tidak diperoleh penurunan pH yang berbeda jauh, perubahan nilai pH tidak dipengaruhi oleh pemanasan.

Dalam penelitian diharapkan pada parameter reduksi biru metilen, untuk mengetahui kualitas susu yang baik, dapat menggunakan konsentrasi biru metilen dengan nilai koefisien terbesar pada volume biru metilen 10 $\mu$ l dan waktu reduksi yang lebih pendek.

### **DAFTAR PUSTAKA**

Adnan, M. 1984. Kimia dan Teknologi pengolahan Air Susu. Andi Offset. Yogyakarta.

- Badan Standarisasi Nasional. 1998. Standar Nasional Indonesia No. 01 – 3141:2000. Susu Segar. Badan Standarisasi Nasional. Jakarta.
- Fardiaz, S. 1992. Petunjuk Laboratorium Mikrobiologi Pengolahan Pangan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor.
- Forsythe, S. J. dan P. R., Hayes. 1998. Food Hygienes Microbiology and HACCP. Aspen Publishers, Gaithersburg. Maryland.
- Gaman, P. M. dan K. B. Sherrington. 1994. Ilmu Pangan: Pengantar Ilmu Pangan, Nutrisi dan Mikrobiologi. Edisi Kedua. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Hadiwiyoto, S. 1994. Teori dan Prosedur Pengujian Mutu Susu dan Hasil Olahaya. Edisi II. Penerbit Liberty, Yogyakarta.
- Heldman,D. R and R. P. Singh. 2001. Introduction to food engineering. London: Academic Press. Halaman 334-339.
- Legowo, A. M., Kusrahayu, S. Mulyani. 2009. Ilmu danTeknologi Pengolahan Susu. Badan Penerbit Universitas Diponegoro. Semarang.
- Muchtadi, D. 2010. Teknik Evaluasi Gizi Protein. Alfabeta. Bandung.
- Murti, T. W. 2010. Pasca Panendan Industri Susu. Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Widodo. 2003. Bioteknologi Industri Susu. Lacticia Press, Yogyakarta.