

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian Pendahuluan

1. Hasil Uji *TPC* (*Total Plate Count*) pada Tahu Putih Kontrol

Penelitian pendahuluan ini bertujuan untuk mengetahui pada hari ke berapa dari perlakuan H+0, H+1, H+2 dan H+3 yang disimpan pada suhu ruang mulai terlihat adanya peningkatan jumlah bakteri yang signifikan, dilihat dari mulai rusaknya tahu berdasarkan pengamatan visual sensori, dan total koloni mikroba yang melebihi standar SNI berdasarkan uji *TPC*. Perlakuan lama penyimpanan pada kondisi tersebut disebut hari kritis. Hari kritis inilah yang akan dijadikan acuan pada penelitian utama. Hasil Uji *TPC* Tahu Kontrol disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji *TPC* Tahu Kontrol

Pengamatan Hari Ke (Pada Suhu Ruang)	Rata-rata Jumlah Koloni (koloni/ml)
0	$5,6 \times 10^4$
1	$9,7 \times 10^6$
2	$4,9 \times 10^8$
3	$6,5 \times 10^{11}$

Tahu kontrol yang tidak diberi pengawet mengalami penurunan mutu mikrobiologis sehingga mikroba dapat tumbuh dengan cepat dan mempercepat kerusakan tahu. Setelah H+1, tahu kontrol sudah tidak dapat diterima lagi dilihat dari mutu mikrobiologisnya. Peningkatan jumlah mikroba pada tahu mungkin terjadi akibat beberapa hal seperti kedelai dan air yang digunakan sudah terkontaminasi oleh mikroba. Sesuai dengan pendapat Winarno (1993), bahwa sumber kontaminasi utama pada produk tahu adalah kedelai serta air yang digunakan dalam pengolahan, masalah sanitasi air juga menjadi masalah besar dalam menentukan mutu tahu. Selain itu, tahu juga merupakan media yang baik bagi pertumbuhan mikroba karena produk tahu memiliki kadar air dan kadar protein yang tinggi. Menurut Shurtleff dan Aoyagi (1984) dalam Wahyundari (2000),

bahwa kadar air dan kandungan zat gizi yang cukup tinggi merupakan media yang baik bagi pertumbuhan mikroba.

Menurut SNI 01-3142-1992, jumlah maksimum total mikroba pada tahu adalah 1.0×10^6 koloni/ml. Berdasarkan persyaratan tersebut, maka setelah H+1, tahu kontrol sudah tidak layak dikonsumsi (melebihi standar SNI). Hal ini menunjukkan lama penyimpanan tahu putih pada suhu ruang mempengaruhi jumlah mikroba pada tahu. Hal ini sesuai dengan penelitian Hamad *et al.* (2017), yang menyatakan bahwa waktu penyimpanan dapat mempengaruhi jumlah bakteri total pada sampel ayam yang ditandai dengan perbedaan nilai absorbansi kultur sampel tahu pada media cair NB. Selain dilihat dari uji *TPC*, untuk memilih taraf perlakuan lama penyimpanan yang akan dipilih dan digunakan pada penelitian utama, juga dilihat dari hasil pengamatan visual sensori. Hasil pengamatan visual sensori disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Pengamatan Visual Sensori Tahu Kontrol

Pengamatan Tahu Hari Ke-	Warna	Aroma	Lendir
0	Putih Normal Khas Tahu	Normal Khas Tahu	Tidak berlendir & tidak berjamur
1	Putih Kekuningan (+)	Normal Khas Tahu	Tidak berlendir & tidak berjamur
2	Putih Kekuningan (++)	Masam (++)	Berlendir & berjamur
3	Putih Kekuningan (+++)	Masam (+++)	Berlendir & berjamur

Tabel 3 menunjukkan bahwa tahu putih kontrol pada H+0 masih menunjukkan warna putih normal khas tahu, sedangkan H+1 berwarna putih sedikit kekuningan. Tahu putih H+2 dan H+3 menunjukkan warna putih kekuningan. Setyadi (2008) melaporkan bahwa nilai kecerahan tahu semakin menurun terhadap lamanya waktu penyimpanan. Tahu kontrol

yang diamati pada H+0 dan H+1 masih memiliki aroma normal khas tahu, sedangkan pada H+2 dan H+3 tahu sudah beraroma masam. Menurut Dewayani (2019) bau basi terutama disebabkan oleh aktivitas golongan bakteri *Coliform* dan beberapa spesies bakteri yang dapat menyebabkan pembusukan seperti *Clostridium* dan *Pseudomonas* yang menghasilkan bau busuk. Penyimpangan-penyimpangan bau ini terjadi akibat hidrolisis komponen protein dan asam-asam amino secara lanjut yang menghasilkan senyawa-senyawa dan gas-gas yang mempunyai cita rasa yang tidak disukai.

Pada pengamatan H+0 dan H+1 belum terlihat lendir. Namun pada H+2 dan H+3 mulai terdapat lendir pada tahu. Terbentuknya lendir pada tahu dapat disebabkan oleh aktivitas mikroba antara lain bakteri *Bacillus subtilis* dan *Bacillus mesentericus*, bakteri pembusuk seperti *Coliform*, *Micrococci* dan *Achromycetes* (Setyadi, 2008). Berdasarkan hasil pengamatan pada penelitian pendahuluan di atas, diketahui bahwa titik kritis perubahan jumlah mikroba dan kualitas tahu terjadi setelah lama penyimpanan H+2. Pada taraf perlakuan H+2 ini terjadi peningkatan jumlah mikroba yang paling signifikan yaitu sebesar $4,9 \times 10^8$ koloni/ml. Hal ini terjadi karena pertumbuhan mikroba sudah memasuki fase logaritmik. Sesuai dengan pendapat Fardiaz (1992), dalam Verawati *et al.* (2019), bahwa pada fase pertumbuhan logaritmik, sel mikroba membelah dengan cepat dan konstan. Pada perlakuan H+2 ini pula menunjukkan visual tahu yang sudah rusak. Kandungan protein dan air merupakan salah satu media yang sesuai untuk pertumbuhan mikroorganisme, sehingga tahu akan cepat mengalami kerusakan yang memengaruhi masa simpan tahu. Hal ini disebabkan oleh adanya bakteri *Eschericia Coli* dan *Salmonella* yang dapat menimbulkan bau busuk, rasa asam, dan permukaan yang berlendir (Wahyundari, 2000 dalam Fitriani, 2019). Kerusakan tahu dapat ditandai dengan penurunan kualitasnya yakni dari sifat visual sensori tahu (warna, bau, tekstur dan aroma).

Oleh karena itu lama penyimpanan H+2 ditetapkan sebagai hari kritis dan merupakan hari pengamatan yang paling efektif untuk dipakai

pada pengamatan tahu yang akan diberi perlakuan ekstrak daun beluntas. Walaupun pada H+1 jumlah mikroba melebihi standar SNI, tetapi secara fisik tahu H+1 masih belum menunjukkan adanya tanda-tanda kerusakan. Sedangkan pada tahu H+2 sudah terlihat tanda kerusakan seperti adanya kapang, jamur dan lendir. Oleh karena itu H+2 merupakan hari yang kritis dan dijadikan acuan dalam pengujian berikutnya.

2. Hasil Rendemen Ekstraksi Daun Beluntas

Ekstraksi yang dipakai pada penelitian ini menggunakan metode maserasi. Metode maserasi adalah metode ekstraksi cara dingin dan merupakan metode ekstraksi yang paling sederhana. Pada metode ini, cairan penyari akan menembus dinding sel tanaman dan akan masuk ke rongga sel yang mengandung zat aktif, sehingga zat aktif yang merupakan larutan terpekat akan didesak keluar dari sel karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif yang ada didalam sel dengan yang ada diluar sel (Wahyulianingsih *et al.*, 2016). Pelarut yang digunakan pada metode ini yaitu etanol 70%. Pelarut etanol dipilih karena dapat menyari senyawa-senyawa yang dapat memberikan aktivitas antibakteri diantaranya alkaloid, glikosida, kurkumin, flavonoid, kumarin, antraknon, klorofil, tannin dan saponin (Kemenkes RI, 1986 dalam Hafsari, 2015). Etanol juga bersifat polar dan tidak beracun sehingga aman digunakan sebagai pelarut pada bahan pangan (Rizkia, 2014). Menurut Saa'dah (2015), pada proses evaporasi etanol lebih cepat menguap dari pada pelarut lainnya seperti air, ini disebabkan karena Pelarut etanol memiliki titik didih yang lebih rendah (78°C) dibandingkan dengan air (100°C) sehingga pada proses evaporasi etanol akan menguap terlebih dahulu dari air yang terkandung dalam ekstrak, maka dipastikan etanol yang terkandung dalam ekstrak kental daun beluntas sudah hilang pada proses evaporasi.

Rendemen adalah perbandingan berat produk yang dihasilkan dengan berat bahan baku. Perhitungan rendemen dari proses ekstraksi diperlukan untuk mengetahui banyaknya ekstrak yang diperoleh selama proses ekstraksi. Selain itu, data hasil rendemen tersebut ada hubungannya dengan senyawa aktif dari suatu sampel. Jika jumlah rendemen semakin

banyak maka jumlah senyawa aktif yang terkandung dalam sampel juga semakin banyak (Hasnaeni, 2019). Pengukuran rendemen ekstraksi daun beluntas dilakukan dengan membandingkan massa ekstrak kental beluntas (gram) dengan massa awal beluntas kering sebelum proses ekstraksi (gram). Ekstrak kental daun beluntas yang didapat pada proses ekstraksi yaitu 410 gram, dan daun beluntas kering yang dipakai sebanyak 4 kg (4000 gram) hasil perhitungan rendemen ekstrak daun beluntas yaitu 10,25%. Adapun penelitian lain yang melakukan ekstraksi daun beluntas dengan menggunakan pelarut etanol diantaranya penelitian Septiana *et al.* (2016), yang mendapatkan rendemen ekstraksi yaitu sebesar 18,4%.

B. Hasil Uji *TPC* (*Total Plate Count*) Tahu Putih Yang Direndam Ekstrak Beluntas

Petumbuhan jumlah bakteri tahu putih dapat dilihat dari uji *TPC* tahu kontrol dan tahu yang diberi perlakuan rendaman ekstrak beluntas disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji *TPC* Tahu yang Direndam dengan Ekstrak Daun Beluntas

Konsentrasi Ekstrak Beluntas	Lama Rendaman			Rataan (Koloni/ml)
	15 menit (Koloni/ml)	30 menit (Koloni/ml)	45 menit (Koloni/ml)	
20%	^c 1,63 x 10 ⁸	^b 1,19 x 10 ⁷	^a 4,00 x 10 ⁴	^r 5,617 x 10 ⁷
25%	^a 5,00 x 10 ⁵	^a 0	^a 0	^q 3,95 x 10 ⁶
30%	^a 7,00 x 10 ³	^a 0	^a 0	^p 1,33 x 10 ⁴
Rataan	^z 5,43 x 10 ⁷	^y 3,95 x 10 ⁶	^x 1,33 x 10 ⁴	
Kontrol		1,94 x 10 ⁹		

Keterangan : Notasi huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata $\alpha = 0,05$

Tabel diatas menunjukkan adanya penurunan jumlah mikroba tahu putih yang direndam menggunakan ekstrak daun beluntas dengan taraf perlakuan konsentrasi ekstrak beluntas 20%, 25%, 30%. Berdasarkan uji analisis statistik menggunakan ANOVA dengan taraf $\alpha=0,05$ diketahui nilai signifikan variabel konsentrasi ekstrak daun beluntas kurang dari 0,05. Hal ini menunjukkan adanya pengaruh dari perlakuan konsentrasi ekstrak daun beluntas terhadap total mikroba tahu putih, semakin tinggi konsentrasi yang ditambahkan menyebabkan semakin terhambatnya pertumbuhan mikroba tahu putih.

Penelitian Pandiangan (2000), menyatakan bakteri akan terbunuh lebih cepat apabila konsentrasi zat antibakterinya lebih tinggi. Berdasarkan uji Duncan semua perlakuan konsentrasi masing-masing menunjukkan hasil yang berbeda nyata.

Berdasarkan hasil uji analisis statistik menggunakan ANOVA dengan taraf $\alpha = 0,05$ taraf lama perendaman 15, 30 dan 45 menit diketahui nilai signifikan variabel lama rendaman ekstrak daun beluntas kurang dari 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa ada pengaruh lama rendaman ekstrak daun beluntas terhadap total mikroba tahu putih, semakin lama perendaman tahu putih menggunakan ekstrak daun beluntas menyebabkan semakin terhambatnya pertumbuhan mikroba tahu putih. Berdasarkan uji Duncan terlihat bahwa masing-masing taraf perlakuan lama rendaman menunjukkan hasil yang berbeda nyata. Berdasarkan hasil uji total mikroba tahu putih (seperti yang terlihat pada Tabel 4), lama rendaman berpengaruh pada total mikroba tahu putih. Semakin lama rendaman semakin kecil jumlah mikroba yang ditemukan. Hal ini sejalan pendapat Adilfiet (1994) dalam Amalia (2019), yang menyatakan bahwa semakin pekat konsentrasi larutan maka zat aktifnya semakin tinggi, dan semakin lama perendamannya maka akan semakin efektif hambatan pertumbuhan mikroorganisme. Kombinasi perlakuan konsentrasi ekstrak beluntas (20%, 25%, 30%) dan lama rendaman (15 menit, 30 menit dan 40 menit).

Berdasarkan uji analisis statistik menggunakan ANOVA dengan taraf $\alpha = 0,05$ diketahui nilai signifikan variabel interaksi yaitu kurang dari 0,05. Hal ini dapat disimpulkan bahwa interaksi perlakuan konsentrasi ekstrak daun beluntas dan lama rendaman berpengaruh terhadap daya hambat pertumbuhan mikroba pada tahu putih. Setelah diperoleh pengaruh yang signifikan, selanjutnya dilakukan uji Duncan Multipel Range (DMRT) dengan taraf 5% Duncan. Hasil uji menunjukkan bahwa konsentrasi 25% pada setiap taraf lama simpan, tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 30%, namun berbeda sangat nyata dengan konsentrasi 20%. Konsentrasi 25% dan 30% lama rendam 15, 30, 45 tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 20% lama rendam 15 menit namun berbeda sangat nyata dengan konsentrasi 20% lama rendam 30 menit.

Konsentrasi 20% lama rendam 30 menit berbeda sangat nyata dengan konsentrasi 20% lama rendam 15 menit. Hal ini membuktikan adanya pengaruh interaksi antara konsentrasi dengan lama rendaman. Ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Trisnawati (2018), yang menyatakan bahwa perlakuan interaksi antara lama penyimpanan dan jenis konsentrasi kitosan berpengaruh nyata terhadap total bakteri pada tahu putih. Hasil uji efektivitas antibakteri ekstrak daun beluntas terbukti dapat menghambat pertumbuhan koloni bakteri pada tahu dengan terjadinya penurunan rata-rata jumlah koloni bakteri.

Pada tahu putih dengan perlakuan konsentrasi ekstrak daun beluntas 20% dan lama rendam 15 menit terdapat jumlah bakteri $1,63 \times 10^8$ koloni/ml. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi 20% sudah terlihat penurunan total mikroba tahu putih. Ini sejalan dengan penelitian Yanestria *et al.* (2020), yang menyatakan bahwa penggunaan ekstrak daun salam pada konsentrasi 20% sudah efektif dijadikan sebagai pengawet alami dan dapat menghambat pertumbuhan bakteri ikan bandeng. Begitu pula penelitian Soemarie *et al.* (2016), yang menyatakan bahwa konsentrasi optimal ekstrak etanol 70% daun senggani (*Melastoma malabathricum L*) yang dapat menghambat pertumbuhan koloni bakteri, terdapat pada konsentrasi 20%. Penentuan Kombinasi perlakuan paling efektif dalam menghambat mikroba dipilih berdasarkan lama perendaman tersingkat dan total mikroba terendah karena setelah tahu diproduksi, produsen tahu harus menjualnya secepat mungkin untuk mencegah kontaminasi dan kenaikan total mikroba. Kombinasi perlakuan konsentrasi 25% dan lama rendaman 30 menit dipilih sebagai kombinasi paling efektif sebagai antimikroba pada tahu, karena selain waktu rendaman yang lebih singkat, juga menghasilkan total mikroba yang sangat rendah, dengan jumlah mikroba 0. Penurunan jumlah mikroba tahu yang direndam larutan ekstrak daun beluntas, juga terlihat dari hasil pengamatan visual kondisi fisik tahu. Hasil uji visual sensori ditampilkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Pengamatan Visual Sensori Tahu yang Direndam Menggunakan Daun Beluntas pada Penyimpanan di Hari ke-2.

Konsentrasi Ekstrak Beluntas	Lama Rendam (menit)	Warna	Aroma	Lendir
Kontrol	-	Putih kekuningan	Masam	Belendir dan berjamur
20%	15	Hijau muda	Normal khas tahu sedikit aroma daun beluntas	Tidak ada lendir dan tidak ada jamur
	30	Hijau muda	Normal khas tahu sedikit aroma daun beluntas	Tidak ada lendir dan tidak ada jamur
	45	Hijau muda	Normal khas tahu sedikit aroma daun beluntas	Tidak ada lendir dan tidak ada jamur
25%	15	Hijau muda pekat	Khas daun beluntas	Tidak ada lendir dan tidak ada jamur
	30	Hijau muda pekat	Khas daun beluntas	Tidak ada lendir dan tidak ada jamur
	45	Hijau muda pekat	Khas daun beluntas	Tidak ada lendir dan tidak ada jamur
30%	15	Hijau tua pekat	Khas daun beluntas pekat	Tidak ada lendir dan tidak ada jamur
	30	Hijau tua pekat	Khas daun beluntas pekat	Tidak ada lendir dan tidak ada jamur
	45	Hijau tua pekat	Khas daun beluntas pekat	Tidak ada lendir dan tidak ada jamur

Ekstrak beluntas yang dihasilkan dengan menggunakan metode maserasi sangat pekat dan kental hal ini dapat terlihat pada hasil pengamatan visual sensori tahu yang direndam dengan ekstrak daun bluntas pada Tabel 5, tahu putih dengan taraf perlakuan konsentrasi tinggi (25% dan 30%) menunjukkan warna hijau muda pekat dan hijau tua pekat dengan aroma khas daun beluntas pada keadaan tidak ada lendir dan jamur, Pada uji *TPC* perlakuan konsentrasi tinggi (25% dan 30%) menunjukkan tidak adanya pertumbuhan mikroba. Hal ini berarti dapat disimpulkan bahwa semakin kental ekstrak yang tersari maka semakin banyak pula senyawa antimikroba yang dapat diambil. Pernyataan tersebut sejalan dengan penelitian Amalia (2019) yang menyatakan bahwa semakin pekat konsentrasi larutan maka zat aktifnya semakin tinggi. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi maka pertumbuhan mikroba semakin berkurang karena konsentrasi yang lebih tinggi

memiliki komponen antimikroba yang lebih banyak sehingga penghambatan pertumbuhan mikroba akan semakin baik, sejalan dengan pertanyaan Yanti *et al.* (2000), dalam Pratiwi (2019), yang menyatakan bahwa ekstrak daun sirih mengandung fenol, dan semakin tinggi konsentrasi yang digunakan akan semakin dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Beberapa penelitian terdahulu juga menunjukkan bahwa ekstrak daun beluntas dapat menghambat pertumbuhan berbagai jenis bakteri patogen bagi manusia. Hasil penelitian Nurhalimah *et al.* (2015), menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun beluntas dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhimurium*. Penelitian Septiana *et al.* (2015), mendapatkan hasil bahwa ekstrak daun etanol daun beluntas dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

Hasil uji *TPC* tahu putih kontrol (tahu putih tanpa pemberian ekstrak daun beluntas) yang diuji setelah penyimpanan H+2 yaitu 1.94×10^9 koloni/ml. Hal ini membuktikan adanya penurunan jumlah koloni dibandingkan dengan perlakuan kontrol (tanpa beluntas). Penurunan jumlah bakteri pada tahu putih dengan perlakuan dibanding tahu putih kontrol disebabkan oleh banyak faktor yang dapat mempengaruhi penghambatan mikroorganisme oleh bahan atau proses antimikroba yang terkandung dalam daun beluntas. Salah satu faktor tersebut adalah konsentrasi zat antimikroba. Menurut penelitian yang telah dilakukan oleh Syafira *et al.* (2019), adanya pengaruh ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica Less*) terhadap koloni bakteri saliva disebabkan oleh kandungan flavonoid, alkaloid, minyak atsiri, dan tanin. Flavonoid merupakan golongan terbesar dari fenol yang memiliki sifat efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara inaktivasi protein.

Flavonoid memiliki fungsi sebagai antibakteri dengan menghambat membran dan luar membran sel, sehingga terjadi kerusakan pada permeabilitas sel bakteri dan membran tidak dapat berfungsi normal atau tidak baik. Senyawa lain yang mempunyai fungsi sebagai antibakteri yaitu tanin, yang bekerja dengan cara mengkoagulasi protoplasma sehingga membektu ikatan protein yang tidak stabil pada bakteri. Tanin diketahui dapat menggugurkan toksin pada saluran pencernaan. Menurut Riyanti (2014), tanin juga memiliki aktivitas antibakteri yang berhubungan dengan kemampuan untuk menginaktivasikan

adhesin sel mikroba, mengaktifasi enzim dan mengganggu transportasi protein pada lapisan dalam sel.

Alkaloid dapat berfungsi sebagai antibakteri yaitu dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Riyanti, 2014). Kelompok senyawa lain yang dapat menghambat aktivitas mikroba adalah minyak atsiri, yang merupakan gabungan dari berbagai persenyawaan organik yang mudah menguap pada kondisi suhu kamar dan larut dalam pelarut organik. Minyak atsiri yang terkandung dalam tanaman mempunyai aktivitas biologis sebagai antijamur dan antibakteri (Ulya, 2019). Menurut Sumono dan Wulan (2008) dalam Ulya (2019), minyak atsiri juga dapat dijadikan sebagai pengawet makanan dan antimikroba. Selain itu minyak atsiri juga memiliki aktivitas antioksidan dan antiseptik. Menurut SNI SNI01-3142-1998 dan SII 0270-1990 batas maksimal jumlah total bakteri pada tahu yaitu 1.0×10^6 koloni/ml. Dari penelitian ini diperoleh hasil bahwa penambahan ekstrak daun beluntas dengan konsentrasi 20% yang memenuhi standar SNI hanya pada rendaman 45 menit. Sedangkan pada perlakuan konsentrasi 25% dan 30% semua perlakuan lama rendaman telah memenuhi standar SNI.