

PEMERIKSAAN CEMARAN MIKROBIOLOGIS DALAM MEMENUHI MUTU BISKUIT SESUAI DENGAN SNI BISKUIT 2973 TAHUN 2022

Adellyn Willyanda¹⁾, Rina Rismaya¹⁾, Muhamad Zaky²⁾

¹⁾Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Universitas Terbuka, Tangerang Selatan

²⁾Laboratorium Terpadu, Institut Pertanian Bogor, Bogor

*Penulis korespondensi: adellynwibisono@gmail.com

ABSTRAK

Biskuit adalah makanan favorit yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat dari tahun ke tahun. Dengan adanya peningkatan konsumsi biskuit, perlu diikuti dengan jaminan mutu akan produk tersebut. Kualitas produk biskuit dinilai berdasarkan sejauh mana produk biskuit tersebut dapat memenuhi kriteria, khususnya kriteria mikrobiologi menurut SNI 2973:2022. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui kualitas produk biskuit yang diproduksi oleh produsen besar (PT) dalam negeri sebagai bentuk penerapan keamanan pangan mikrobiologis. Cemaran mikrobiologi yang terdapat dalam bahan pangan sesuai dengan SNI Biskuit (SNI 2973:2022) meliputi angka lempeng total (ALT), Enterobacteriaceae, Salmonella, Staphylococcus aureus, kapang dan khamir. Sampel biskuit dengan lima merek berbeda di lima perusahaan berbeda dilakukan uji parameter ALT, Enterobacteriaceae, Salmonella, Staphylococcus aureus, kapang dan khamir. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kelima sampel biskuit telah memenuhi kriteria mikrobiologi untuk produk biskuit sesuai dengan SNI 2973:2022. Dapat disimpulkan bahwa penerapan keamanan pangan mikrobiologis oleh kelima perusahaan besar sudah sangat baik.

Kata kunci : Biskuit, SNI Biskuit 2973: 2022, cemaran mikrobiologi.

1 PENDAHULUAN

Pangan merupakan semua turunan yang diolah dan tidak olah dari sumber hayati dan perairan yang dimaksudkan untuk dikonsumsi manusia, termasuk bahan tambahan pangan, bahan baku pangan dan bahan lain yang digunakan dalam proses penyiapan, pengolahan, dan/atau produksi makanan atau minuman (Ratnasari Ekawati et al., 2017). Pangan yang baik harus memenuhi persyaratan keamanan pangan. Persyaratan keamanan pangan adalah standar dan peraturan lain yang harus diikuti untuk mencegah kemungkinan bahaya pangan dari cemaran biologis, kimia atau fisik (benda asing) yang dapat mengganggu, merugikan atau membahayakan kesehatan manusia (Mansyur, 2020). Masalah keamanan pangan yang masih marak terjadi di Indonesia adalah peredaran pangan yang tidak memenuhi persyaratan higiene, baik dari segi cemaran biologi maupun kimia, serta penggunaan bahan tambahan pangan yang dilarang atau penggunaan bahan tambahan pangan yang melebihi nilai ambang batas (Rini, 2020). Masalah lain adalah tingginya prevalensi penyakit bawaan makanan yang sebagian besar belum dilaporkan secara resmi dan belum diketahui penyebabnya. Oleh karena itu, peran laboratorium di Indonesia dalam menginvestigasi masalah pangan tersebut sangat penting (Nuraida, 2021).

Biskuit adalah produk roti kering yang diperoleh dengan memanggang adonan yang terbuat dari tepung terigu dengan atau tanpa bahan pengganti, minyak dan lemak (susu), dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan yang diizinkan (BPOM, 2022). Biskuit juga termasuk makanan yang paling digemari dan dikonsumsi banyak orang dalam jumlah yang terus meningkat setiap tahunnya (Susanto, 2018). Seiring meningkatnya konsumsi biskuit ini, sebaiknya perlu pemantauan kualitas produk tersebut. Salah satu faktor

penentu mutu produk adalah Standar Nasional Indonesia (SNI). Kontaminan mikroba pada pangan memenuhi standar SNI Biskuit (SNI 2973:2022) untuk biskuit, kukis, wafer dan pai meliputi angka lempeng total (ALT), *Enterobacteriaceae*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, kapang dan khamir. Metode kuantitatif untuk analisis mikrobiologi adalah hitungan cawan. Hitungan cawan dapat digunakan untuk menentukan ALT, jumlah bakteri *Staphylococcus aureus*, jumlah kapang dan khamir, jumlah bakteri *Enterobacteriaceae* serta jumlah bakteri *Bacillus cereus* dalam bahan pangan. Metode pengujian mikrobiologi lainnya adalah isolasi kualitatif dan identifikasi bakteri patogen pada produk, misalnya uji *Salmonella sp* (Hernawati, 2018).

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Susanto (2018) meneliti kualitas biskuit dalam kaitannya dengan pemberlakuan wajib peraturan SNI Biskuit [studi kasus DKI Jakarta] menggunakan SNI Biskuit 2973 tahun 2011. Didapatkan hasil cemaran mikrobiologi memenuhi parameter cemaran mikroba, sehingga dampak negatif cemaran mikroba pada manusia dapat dihindari. Sedangkan, pada penelitian ini akan membahas Pemeriksaan Cemaran Mikrobiologis Dalam Memenuhi Mutu Biskuit Sesuai Dengan SNI Biskuit 2973 Tahun 2022. Dengan adanya SNI Biskuit yang terbaru ini dipastikan bahwa adanya perubahan pemberlakuan, cara analisa, paramater maupun ambang batas maksimal keberterimaan cemaran khususnya cemaran mikrobiologis dari SNI sebelumnya.

Pelaku bisnis harus mampu meningkatkan kualitas produknya agar dapat bersaing secara komersial dan menciptakan kepuasan pelanggan yang dapat berdampak pada loyalitas pelanggan. Kegagalan untuk menyediakan produk yang aman akan mengakibatkan (1) penyakit dan kematian pada konsumen. Ini juga mempengaruhi perekonomian negara; (2) penarikan kembali produk; (3) tindakan pemerintah; (4) penyimpanan dan pemusnahan produk; (5) kehilangan kepercayaan konsumen dan perdagangan internasional; (6) hilangnya kepercayaan wisatawan dan (7) penutupan usaha (Nuraida, 2021). Kualitas produk biskuit dinilai berdasarkan pemenuhan kriteria, khususnya kriteria mikrobiologi SNI 2973:2022. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui mutu biskuit dari produsen besar Nasional sebagai bentuk penerapan keamanan pangan secara mikrobiologis.

2 BAHAN DAN METODE

2.1 Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *waterbath circulation SH scientific*, autoklaf *biobase*, timbangan *kern EG*, *biosafety cabinet class II ESCO*, *colony counter funke berber*, inkubator *thermologic*, *waterbath memmert*, jarum ose, bunsen, mikropipet 1 mL *sartorius*, mikropipet 10 mL *biohit*, tip biru, tip putih, tabung duran *merck*, kantong *stomacher* steril, batang penyebar, *bag mixer interscience FR*, cawan petri, rak tabung dan tabung tutup ulir *pirex*.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini terdapat merek *Himedia* dari India, *Oxoid* dari Inggris dan *Merck* dari Jerman. Bahan-bahan tersebut meliputi *plate count agar ISO CM 0325 (oxoid)*, *sodium chloride (merck)*, *bacteriological peptone LP 0037 (oxoid)*, *potassium hydrogen phosphate (merck)*, *sodium hydrogen phosphate (merck)*, *potassium chloride (merck)*, *baird-parker agar ISO CM 1127 (oxoid)*, *bismuth sulphite agar M 027 (himedia)*, *agar powder GRM 026 (himedia)*, *xylose lysine desoxycholate agar CM 0469 (oxoid)*, *hektoen enteric agar CM 0419 (oxoid)*, *violet red bile glucose agar CM 0485 (oxoid)*, *potassium iodida (merck)*, *iodin (merck)*, *rappaport vassiliadis soya broth CM 0866 (oxoid)*, *tetrathionate novobiocin broth ISO CM 1048 (oxoid)*, *dichloran glycerol medium base M 1129 (himedia)*, *brain heart infusion CM 1135 (oxoid)*, *glucose OF medium M 3951*

(himedia), potassium hydroxide (merck), phenol red lactose broth M 275 (himedia), triple sugar iron agar 1.03915.0500 (merck), lysine iron agar M 377 (himedia), merah metil – voges proskauer CM 0043 (oxid), Simmons citrate agar CM 0155 (oxid), plasma kelinci 240827 (merck), mineral oil (merck), egg yolk (liofilchem), 1-naphthol 1.06223.0050 (merck), microbiology bactident oxidase 1.00181.0002 (merck), aquadest, etanol 70% dan spiritus.

2.2 Preparasi, penimbangan dan pengenceran sampel

Preparasi, penimbangan dan pengenceran sampel didasarkan pada SNI (ISO 6887-1, 2017) dan (ISO 6887-4, 2012). Pengerjaan sampel dilakukan dengan cara aseptik. Kemasan biskuit dibuka secara hati-hati dan aseptik, lalu ditimbang secara aseptik 10 g sampel (untuk pengujian ALT, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus* dan kapang serta khamir). Untuk *Salmonella* ditimbang sebanyak 25 g. Pengujian ALT, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus* dan kapang serta khamir sampel yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam kantong *stomacher* steril lalu 90 mL *peptone salt solution* (PPS) steril dimasukkan ke dalam kantong *stomacher* lalu kantong *stomacher* ditutup. Pengujian *Salmonella* dengan sampel yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam kantong *stomacher* steril lalu 225 mL *buffer peptone water* (BPW) dimasukkan ke dalam kantong *stomacher* lalu kantong *stomacher* ditutup. Setelah homogen, sampel yang telah dihancurkan, disaring dimasukkan ke dalam botol steril. Suspensi ini merupakan pengenceran pertama. Untuk pengenceran berikutnya disesuaikan dengan tingginya cemaran mikrobiologi pada sampel. Dilihat dari penampakan, bau dan kemasan biskuit yang dipakai. Jika penampakan biskuit kurang baik, bau tidak seperti bau biskuit atau bau biskuit susu dan kemasan biskuit sudah terbuka atau robek maka sebaiknya tingkat pengenceran pengujian diperlukan.

2.3 Pengujian ALT

Pengujian ALT didasarkan pada SNI (ISO 4833-1, 2013). Sampel pada pengenceran pertama dipipet sebanyak 1 mL lalu dimasukkan ke dalam petri steril (lakukan duplo). Dituang sekitar 15 mL *plate count agar* (PCA) pada cawan petri tersebut lalu diaduk dengan menggerakkan cawan petri secara horizontal berbentuk angka delapan. Diamkan cawan petri yang telah dituang PCA tersebut hingga PCA padat. Semua cawan petri diinkubasi pada inkubator dengan temperatur 30°C selama 72 jam. Setelah 72 jam, cawan petri dari inkubator dikeluarkan. Pilih cawan petri yang memuat kurang antara 10 – 300 koloni. Koloni yang tumbuh pada petri dihitung. Apabila terlihat koloni yang menyebar atau menyatu (*spreader colony*) dan kurang dari seperempat luas cawan petri, hitung sebagai 1 koloni. Apabila koloni *spreader* ini lebih besar dari seperempat cawan petri maka jangan dihitung. Hitung jumlah koloni per gram sampel (N).

2.4 Pengujian *Enterobacteriaceae*

Pengujian *Enterobacteriaceae* didasarkan pada SNI (ISO 21528-2, 2017). Sampel pada pengenceran pertama dipipet sebanyak 1 mL lalu dimasukkan ke dalam petri steril (lakukan duplo). Sekitar 15 mL *Violet Red Bile Glucose* (VRBG) agar dituang pada cawan petri lalu diaduk dengan menggerakkan cawan petri secara horizontal berbentuk angka delapan. Cawan petri yang telah dituang VRBG agar didiamkan hingga VRBG agar memadat. Setelah VRBG agar memadat, dituangkan kembali 5 - 10 mL VRBG agar lalu dibiarkan kembali memadat. Lakukan langkah diatas pada pengenceran yang lainnya. Semua cawan petri diinkubasi pada inkubator dengan temperature 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, keluarkan cawan petri dari inkubator.

Perhatikan munculnya koloni bakteri yang berwarna merah muda sampai merah atau berwarna ungu (dengan atau tanpa halo presipitasi). Dipilih cawan petri yang memuat kurang dari 150 koloni sesuai karakter yang disebutkan diatas dan dihitung. Apabila terlihat koloni

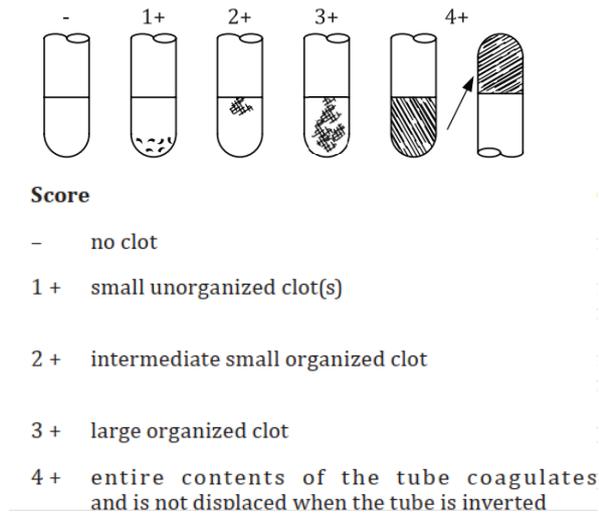
yang menyebar/menyatu (*spreader colony*) dan kurang dari seperempat luas cawan petri, hitung sebagai 1 koloni. Apabila koloni spreader ini lebih besar dari seperempat cawan petri maka jangan dihitung. Pilih secara acak 5 jenis koloni sesuai karakteristik diatas untuk dilakukan uji biokimia. Apabila terdapat kurang dari 5 koloni lakukan uji biokimia pada koloni yang ada. Beberapa *Enterobacteriaceae* tertentu terlihat warna yang agak memudar pada koloninya maupun medianya. Oleh karena itu, apabila tidak terlihat karakteristik koloni bakteri yang berwarna merah muda sampai merah atau berwarna ungu (dengan atau tanpa halo presipitasi), dipilih 5 koloni yang agak keputihan untuk uji biokimia.

Koloni yang di dapat dari VRBG agar diambil dengan ose dan diusap ke *Oxidase Test Strip* (OTS). Perhatikan OTS dan lihat adanya warna ungu kehitaman pada OTS. Jika tidak adanya perubahan warna, maka reaksi tersebut negatif. Ambil koloni yang di dapat dari VRBG dengan ose dan menghasilkan hasil yang negatif dari uji reaksi oksidase. Usapan tersebut dimasukkan ke dalam tabung yang berisi *Glucose OF Medium* (GOF) 5 mL lalu ditambahkan 1 mL mineral oil steril pada tabung. Tabung tersebut diinkubasi pada inkubator dengan temperature 37°C selama 24±2 jam, Setelah 24 jam, lihat adanya warna kuning yang muncul pada tabung. Warna kuning ini mengindikasikan uji fermentasi positif. Jumlah *Enterobacteriaceae* pada sampel dihitung dari jumlah koloni yang menghasilkan reaksi oksidase negatif dan uji fermentasi glukosa positif. Hitung jumlah koloni per gram sampel (N).

2.5 Pengujian *Staphylococcus aureus*

Pengujian *Staphylococcus aureus* didasarkan pada (ISO 6888-1 E, 2021) dan (ISO 6888-2, 1999). Sampel pada pengenceran pertama dipipet sebanyak 0.4 mL, 0.3 mL dan 0.3 mL lalu dimasukkan ke dalam 3 petri yang sudah terdapat *Baird-Parker Agar* (BPA) padat secara terpisah. Suspensi diratakan pada BPA dengan batang penyebar. Cawan petri dibiarkan selama kurang lebih 15 menit sampai suspensi meresap dan media agak kering. Inkubasi semua cawan petri pada inkubator dengan temperature 35°C selama 48 jam. Setelah 48 jam, cawan petri dari inkubator dikeluarkan. Perhatikan munculnya koloni bakteri tipikal yang berwarna hitam atau abu-abu, mengkilap, koloninya berbentuk konvek (1-1.5 mm setelah 24 jam inkubasi, 1.5-2.5 mm Setelah 48 jam inkubasi) dan dikelilingi zona bening (dapat terlihat opak). Perhatikan pula munculnya koloni bakteri atipikal yang mempunyai salah satu ciri-ciri berikut yaitu: koloninya hitam dan mengkilap dengan atau tanpa pinggir berwarna putih (tidak ada zona bening) dan koloninya berwarna abu-abu dan tidak ada zona bening. Pilih cawan petri yang memuat kurang dari 300 koloni. Hitung koloni yang tumbuh pada petri (tipikal dan atipikal).

Uji koagulasi dilakukan pada minimal 5 bakteri tipikal dan 5 bakteri atipikal (apabila ada). Koloni yang di dapat dari BPA diambil dengan ose dan inokulasikan ke dalam *Brain Heart Infusion* (BHI). BHI diinkubasi pada temperature 35°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, ditambahkan 0.1 mL BHI tersebut dengan 0.3 mL plasma kelinci (PK) (atau dengan jumlah lainnya disesuaikan dengan penyedia PK). Inkubasi suspensi tersebut selama 5 jam dan amati adanya gumpalan dari plasma. Jika masih belum terlihat menggumpal, diinkubasi kembali hingga 24 jam lalu diamati kembali hasilnya. Reaksi koagulasi positif apabila mempunyai nilai minimal +3 (Gambar 1). Jumlah *Staphylococcus aureus* pada sampel dihitung dari jumlah koloni yang menghasilkan reaksi koagulasi positif. Hitung jumlah koloni per gram sampel (N).



Gambar 1. Penilaian Reaksi Uji Koagulase (ISO 6888-1 E, 2021)

2.6 Pengujian *Salmonella*

Pengujian *Salmonella* didasarkan pada SNI (ISO 6579-1 E, 2017). Pra pengayaan dalam media cair non selektif dari suspensi 250 mL BPW diinkubasi pada inkubator pada temperature 35°C selama 18 jam. Setelah diinkubasi lakukan pengayaan dalam media selektif dengan dipipet 0.1 mL BPW ke dalam 10 mL *Rappaport - Vassiliadis Soya broth* (RVS) dan dipipet 1 mL BPW ke dalam 10 mL *Tetrathionate-Novobiocin broth* (TTB). RVS diinkubasi pada *waterbath circulation* dengan temperature 41.5°C selama 24 jam sedangkan TTB diinkubasi pada inkubator dengan temperature 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi selama 24 jam, kedua media selektif pengayaan digoreskan ke dalam media cawan petri yang berisi media padat *xylose lysine desoxycholate agar* (XLD), *Hektoen Enteric Agar* (HEA) dan *Bismuth Sulphite Agar* (BSA). Media tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C. Amati kemungkinan adanya koloni *salmonella* dengan ciri-ciri sebagai berikut :

XLD :Koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *salmonella sp* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.

HEA : Koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam, kebanyakan *salmonella sp* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.

BSA : Koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam. Jika massa inkubasi bertambah maka warna media disekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.

Jika ditemukan koloni yang khas atau mencurigakan pada media BSA, XLDA, dan HEA setelah 24 jam inkubasi, koloni tidak boleh diambil dan media harus diinkubasi kembali selama 24 jam tambahan. Jika tidak ada koloni yang khas atau mencurigakan pada media BSA, HEA dan XLDA setelah 48 jam diinkubasi, pilih dua atau lebih koloni atipikal. Dipilih salah satu koloni dengan jarum ose, dengan hati-hati diambil bagian tengah koloni dan diinokulasikan ke dalam media *Triple Sugar Iron* (TSI) agar miring dengan cara agar miring digores dan agar tegak ditusuk. Tanpa mengambil koloni baru, ose yang sama digunakan untuk inkokulasi ke media *Lysine Iron Agar* (LIA) dengan cara agar tegak ditusuk terlebih dahulu lalu agar miring digores. Karena reaksi *Lysine decarboxylase* sangat anaerobik, LIA

miring harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Ketiga media agar selektif tersebut disimpan pada suhu 5 - 8°C. TSI dan LIA diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C dengan tutup yang sedikit dilonggarkan untuk menghindari pembentukan H₂S yang berlebihan.

Hasil di media TSI *Salmonella sp.* biasanya basa (merah) pada bagian miring dan asam (kuning) pada tusukan, dengan atau tanpa H₂S (warna agar kehitaman). Pada media LIA *Salmonella sp.* ini biasanya menghasilkan reaksi basa (ungu) di seluruh tabung. Umumnya *Salmonella sp.* membentuk H₂S pada agar miring LIA; Beberapa selain *Salmonella sp.* menghasilkan reaksi merah bata pada agar miring LIA. Semua kultur yang ada pada bagian tusukan didalam media LIA tanpa memperhatikan reaksi TSI akan berpotensi sebagai *Salmonella sp.* dan perlu dilakukan uji biokimia.

Kultur asam pada media LIA dan basa pada bagian miringnya serta reaksi asam pada tusukan di TSI harus dipertimbangkan sebagai potensial *Salmonella sp.* dan diuji secara biokimia. Kultur yang bersifat asam pada tusukan dan bagian miring di media LIA serta reaksi asam pada tusukan di media TSI dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella sp.* Jika kultur TSI tidak menunjukkan reaksi khas *Salmonella sp.* (basa pada goresan dan asam pada tusukan), ulangi pengujian dengan memilih koloni yang dicurigai dalam media selektif dengan menggores kembali ke media TSI dan LIA seperti diatas.

Uji biokimia dilakukan pada tiga kultur presumtif TSI dari satu set media selektif (HEA, XLD dan BSA) yang diinokulasi dari TTB, dan tiga kultur presumtif yang diinokulasikan dari RVS. Jika tiga kultur presumtif positif TSI tidak terisolasi dari satu set media selektif, kemungkinan tes presumtif positif TSI perlu dilakukan dari media agar yang berbeda. Uji setidaknya 6 kultur TSI untuk setiap 25 gram sampel. Uji biokimia dilakukan dengan *Phenol red lactose* atau *purple lactose broth*. Diinokulasikan dari TSI agar miring yang telah diinkubasi selama 24 - 48 jam kedalam *Phenol red lactose*. Inkubasi pada suhu 35°C selama 48 jam, tetapi amati inokulan setelah 24 jam. Koloni positif jika asam (kuning) dan gas terbentuk dalam tabung durham. Jika hanya pembentukan asam yang terjadi, maka dapat dinyatakan positif. Secara keseluruhan *Salmonella sp.* memberikan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham dan warna merah (indikator *phenol red*) atau ungu (indikator *bromocresol purple*) pada semua media.

Uji biokimia Merah metil-*Voges-Proskauer* (MR-VP) broth. Koloni positif dari TSI diinokulasikan ke dalam MR-VP dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 35°C. Uji *Voges-Proskauer* (VP) dilakukan dengan cara dipindahkan 1 mL MR-VP broth yang telah diinkubasi selama 48 jam kedalam tabung reaksi kosong steril dan diinkubasikan kembali MR-VP broth selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C. Tambahkan 0,6 mL *alpha naphthol* dan diaduk. Tambahkan 0,2 mL larutan KOH 40% dan diaduk kembali. Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima pada media menunjukkan reaksi positif. Uji merah metil (MR) dengan ditambahkan 5 – 6 tetes indikator metil merah ke dalam 5 mL media MR-VP yang telah diinkubasi selama 96 jam. Lihat hasilnya dengan segera. *Salmonella sp.* memberikan reaksi positif, ditunjukkan dengan menyebarnya warna merah pada media. Munculnya warna kuning menunjukkan reaksi negatif. Nyatakan sebagai bukan *Salmonella sp.*

Uji biokimia *Simmons citrate agar* (SCA). Koloni positif dari TSI diinokulasi ke dalam SCA menggunakan jarum ose dengan cara agar miring digores dan agar tegak ditusuk. Inkubasi selama 96 jam pada suhu 35°C. Positif apabila terjadi pertumbuhan yang diikuti dengan perubahan warna dari hijau menjadi biru. Secara umum *Salmonella sp.* memberikan hasil sitrat positif. Negatif bila tidak ada pertumbuhan atau sangat sedikit dan tidak terjadi

perubahan warna. Laporkan sebagai *Salmonella sp.* Jika menghasilkan hasil TSI dan LIA positif. Serta positif di keempat uji biokimia diatas sebagai positif/25g. Jika menghasilkan hasil TSI dan LIA negatif. Serta negatif di keempat uji biokimia diatas sebagai negatif/25g.

2.7 Pengujian kapang dan khamir

Pengujian kapang dan khamir didasarkan pada SNI (ISO 21527-2, 2009). Sampel pada pengenceran pertama dipipet sebanyak 0.4 mL, 0.3 mL dan 0.3 mL lalu dimasukkan ke dalam 3 petri *Dichloran 18% Glycerol Agar* (DG-18) padat. Suspensi diratakan pada DG-18 tersebut dengan batang penyebar. Cawan petri tersebut didiamkan selama kurang lebih 15 menit hingga suspensi meresap dan media agak kering. Dipipet 1 mL pengenceran pertama ke pengenceran selanjutnya menggunakan PPS hingga didapat pengenceran yang diinginkan. Inkubasi semua cawan petri pada inkubator dengan temperature 25°C selama 5 – 7 hari (cawan petri jangan dibalik). Setelah 5 hari, cawan petri dari inkubator dikeluarkan. Jika hasilnya negatif kapang dan khamir maka diinkubasi kembali hingga 7 hari (Jika dicurigai adanya *Xeromyces bisporus*, cawan petri diinkubasi kembali selama 10 hari). Jika jamur yang tumbuh cepat menjadi masalah, dihitung koloni/propagul/kuman setelah 2 hari dan lagi setelah 5 hari hingga 7 hari inkubasi.

Penghitungan dan pemilihan koloni untuk konfirmasi setelah masa inkubasi yang ditentukan, munculnya koloni/propagul/kuman kapang yang mempunyai hifa serta berserabut. Sedangkan munculnya koloni/propagul/kuman khamir permukaan seperti koloni bakteri yaitu bulat atau oval, licin dan tidak berhifa. Cawan petri yang memuat kurang dari 150 koloni dipilih sesuai karakter yang disebutkan diatas dan dihitung koloni khamir dan koloni/propagul kapang (N).

2.8 Perhitungan

ALT, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus* dan kapang serta khamir dapat dihitung menggunakan Persamaan (1).

$$N = \frac{\sum c}{V \times 2.2 \times d} \quad (1)$$

Keterangan:

$\sum c$ = penjumlahan semua koloni yang didapat dari semua pengenceran atau dari dua pengenceran yang memuat koloni 10-300

V = volume dari inokulum yang dimasukkan ke dalam cawan petri

d = pengenceran terbesar dari cawan petri yang masuk perhitungan jumlah koloni (misal: 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} dan seterusnya)

3 HASIL DAN PEMBAHASAN

Tingkat mikroorganisme dalam sampel pangan dapat memberikan informasi tentang kualitas bahan baku, status higienis pengolahan pangan dan efektifitas metode pengawetan (Pelczar & Chan, 2010). Untuk memastikan bahwa bahan makanan itu murni, aman untuk kesehatan dan memenuhi persyaratan kualitas yang diperlukan, lembaga pemerintah telah dibentuk untuk mengelola dan memantau standar, peraturan dan kontrol pangan. Salah satunya adalah Badan Standardisasi Nasional (BSN) yang menetapkan Standar Nasional Indonesia (SNI) sebagai kebutuhan untuk melindungi kepentingan umum, keamanan negara, pembangunan ekonomi negara dan menjaga fungsi lingkungan hidup. Salah satu contoh penerapan yang tertuang dalam peraturan kementerian perindustrian No. 60/MIND/PER/7/2015 menerapkan SNI 2973:2011, biskuit secara wajib. Namun setelah adanya perubahan baru SNI 2973, khususnya mengenai penyesuaian mutu cemaran mikrobiologi, produsen biskuit diwajibkan untuk

memenuhi standar SNI 2973:2022 untuk cemaran mikrobiologi ALT, *Enterobacteriaceae*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, kapang dan khamir.

ALT merupakan metode yang dapat digunakan untuk menghitung jumlah mikroorganisme pada bahan pangan dengan mengukur jumlah koloni yang tumbuh pada media agar padat. ALT adalah metode penghitungan yang terkenal dan banyak digunakan dalam bidang mikrobiologi pangan untuk memperkirakan jumlah mikroorganisme yang ada dalam suatu sampel pangan, dengan asumsi bahwa mikroorganisme yang ada tersebar merata di seluruh pangan (Soesetyaningsih, 2020). Produk biskuit mempunyai batasan waktu tertentu untuk dapat dikonsumsi secara aman. Hal ini dikarenakan dalam bahan biskuit tersebut akan mengalami penurunan mutu mikrobiologis yang ditandai dengan nilai ALT di atas maksimum yang disebabkan oleh peningkatan aktivitas pertumbuhan mikroorganisme selama penyimpanan (Hernawati, 2018). Oleh sebab itu adanya batas keberterimaan mikroba setelah proses pengolahan hingga sampai dipasarkan disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil analisis ALT pada sampel biskuit di lima PT berbeda

Parameter	PT	Biskuit	n	Hasil	Limit Regulasi		Unit
					m	M	
Angka Lempeng Total	A	Marie susu	1	< 10	10 ⁴	10 ⁵	koloni/g
			2	< 10			
			3	< 10			
			4	< 10			
			5	< 10			
	B	Gula cokelat	1	< 10	10 ⁴	10 ⁵	
			2	< 10			
			3	< 10			
			4	< 10			
			5	< 10			
	C	Rasa kelapa	1	< 10	10 ⁴	10 ⁵	
			2	< 10			
			3	< 10			
			4	< 10			
			5	< 10			
	D	Krim cokelat	1	< 10	10 ⁴	10 ⁵	
			2	< 10			
			3	< 10			
			4	< 10			
			5	< 10			
E	Rasa pisang	1	< 10	10 ⁴	10 ⁵		
		2	< 10				
		3	< 10				
		4	< 10				
		5	< 10				

Keterangan :

n = ulangan

m = limit mikroba setelah proses pengolahan

M = limit mikroba setelah sampai dipasarkan

Berdasarkan Tabel 1 diatas didapatkan hasil ALT yang masih masuk dalam regulasi limit, baik setelah proses pengolahan maupun sampai dipasarkan. Hal ini terbukti bahwa produsen-produksen besar biskuit ini sangat memperhatikan kebersihan produksi dan memilih bahan baku yang sangat baik. Menurut Fardiaz (2020) metode ALT yang digunakan dalam pengujian mikrobiologi ada pada pangan sangat membantu, misalnya memeriksa tingkat

kerusakan atau kontaminasi bahan pangan dan menguji tingkat kontaminasi pada air. Karena hasil kurang dari 10 koloni menyatakan bahwa dalam pengenceran pertama disemua sampel biskuit tidak tumbuh sama sekali total bakteri dalam 10 mL larutan pengencer.

Pembuatan biskuit melibatkan pemanasan pada suhu diatas 100°C yaitu pemanggangan yang berarti bakteri tidak tumbuh dengan baik dan cenderung menurun (Hernawati, 2018). Biskuit memiliki sifat dasar yaitu kadar air tidak lebih dari 5% (BPOM, 2022). Dengan kadar air yang rendah tersebut, sulit untuk mikroba merusak biskuit selama proses pengolahan dan juga penyimpanan. Pemanggangan merupakan bagian dari proses pengeringan guna mengurangi kadar air bahan sampai batas tertentu yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Hernawati, 2018). Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Susanto (2018) meneliti Kualitas Produk Biskuit dengan penerapan SNI Biskuit 2973 tahun 2011 didapat pada produsen biskuit besar (PT) analisis ALT kurang dari 10 koloni/g. Hal ini menunjukkan hasil yang sama pada semua produsen besar biskuit yang terdapat pada Tabel 1. Kekonsistenan ini menunjukkan bahwa PT biskuit dalam negeri serius dalam mencegah terjadinya kerusakan pangan guna melindungi keamanan pangan mikrobiologis dalam negeri khususnya keamanan pangan biskuit.

Tabel 2. Hasil analisis *Enterobacteriaceae* pada sampel biskuit di lima PT berbeda

Parameter	PT	Biskuit	n	Hasil	Limit Regulasi		Unit
					m	M	
<i>Enterobacteriaceae</i>	A	Marie susu	1	< 10	10	10 ²	koloni/g
			2	< 10			
			3	< 10			
			4	< 10			
			5	< 10			
	B	Gula coklat	1	< 10	10	10 ²	
			2	< 10			
			3	< 10			
			4	< 10			
			5	< 10			
	C	Rasa kelapa	1	< 10	10	10 ²	
			2	< 10			
			3	< 10			
			4	< 10			
			5	< 10			
	D	Krim coklat	1	< 10	10	10 ²	
			2	< 10			
			3	< 10			
			4	< 10			
			5	< 10			
E	Rasa pisang	1	< 10	10	10 ²		
		2	< 10				
		3	< 10				
		4	< 10				
		5	< 10				

Keterangan :

n = ulangan

m = limit mikroba setelah proses pengolahan

M = limit mikroba setelah sampai dipasarkan

Beberapa bakteri anggota famili *Enterobacteriaceae* bersifat patogen, antara lain anggota genus *Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia coli*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* dan *Klebsiella* (Pelczar & Chan, 2010). Analisis *Enterobacteriaceae* diuji untuk mengetahui ada tidaknya kontaminasi tinja manusia dan hewan. Kontaminasi dengan bakteri ini tidak diinginkan, baik dari segi estetika maupun kemurniannya dan kemungkinan infeksi berbahaya bagi yang mengkonsumsinya (Kaparang et al., 2020). *Enterobacteriaceae* merupakan bakteri yang biasa mencemari makanan dan minuman, baik yang dimasak, dibekukan, mentah, maupun yang tidak dimasak dan tidak dibekukan (Darna, 2018). Bakteri *Enterobacteriaceae* memiliki enzim amilase yang berfungsi untuk memecah pati yang juga dapat merusak pangan berbahan dasar tepung (Kaparang et al., 2020). Berikut Tabel 2. Hasil analisis *Enterobacteriaceae* pada sampel biskuit di lima PT berbeda.

Tabel 3. Hasil analisis *Staphylococcus aureus* pada sampel biskuit di lima PT berbeda

Parameter	PT	Biskuit	n	Hasil	Limit Regulasi		Unit
					m	M	
<i>Staphylococcus aureus</i>	A	Marie susu	1	< 10	10 ²	10 ⁴	koloni/g
			2	< 10			
			3	< 10			
			4	< 10			
			5	< 10			
	B	Gula coklat	1	< 10	10 ²	10 ⁴	
			2	< 10			
			3	< 10			
			4	< 10			
			5	< 10			
	C	Rasa kelapa	1	< 10	10 ²	10 ⁴	
			2	< 10			
			3	< 10			
			4	< 10			
			5	< 10			
	D	Krim coklat	1	< 10	10 ²	10 ⁴	
			2	< 10			
			3	< 10			
			4	< 10			
			5	< 10			
	E	Rasa pisang	1	< 10	10 ²	10 ⁴	
			2	< 10			
			3	< 10			
			4	< 10			
			5	< 10			

Keterangan :

n = ulangan

m = limit mikroba setelah proses pengolahan

M = limit mikroba setelah sampai dipasaran

Berdasarkan Tabel 2. Hasil analisis *Enterobacteriaceae* kurang dari 10 koloni/g hasil yang baik ini masih dibawah mutu ambang batas regulasi yaitu di 10 koloni/g Setelah proses pengolahan dan 100 koloni/g Setelah sampai dipasaran. Telah diketahui bahwa *E.coli* dan kelompok bakteri *Coliform* merupakan anggota dari keluarga *Enterobacteriaceae*. Pada saluran cerna, strain *Enterobacteriaceae* ini dapat mengiritasi saluran cerna pada anak-anak dan orang dewasa, yang banyak digunakan dalam penelitian munculnya resistensi antibiotik (Hernawati, 2018). Dengan digantinya parameter *E.coli* dan *Coliform* dengan parameter *Enterobacteriaceae* dapat menghasilkan jumlah bakteri secara kuantitatif serta menghemat

waktu dan biaya analisa. Pada penelitian yang dilakukan oleh Susanto (2018) meneliti Kualitas Produk Biskuit dengan penerapan SNI Biskuit 2973 tahun 2011 didapat pada produsen biskuit besar (PT) analisis *Escherichia coli* dan bakteri *Coliform* kurang dari 3 APM/g. Hal ini masih sejalan dengan hasil analisis Tabel 2 diatas yaitu diasumsikan bahwa negatifnya keberadaan bakteri *Enterobacteriaceae*.

Berbagai jenis *Staphylococcus* merupakan mikroflora normal kulit manusia dan membran mukosa manusia. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri patogen yang dapat menyebabkan hemolisis darah dan pembekuan plasma serta menghasilkan berbagai enzim dan ekstraseluler (Sara, 2017). Analisis *Staphylococcus aureus* penting dilakukan karena *Staphylococcus aureus* merupakan penyebab utama penyakit bawaan makanan karena ditemukan di air, debu dan udara. Berikut Tabel 3. Hasil analisis *Staphylococcus aureus* pada sampel biskuit di lima PT berbeda.

Berdasarkan Tabel 3 diatas bahwa semua sampel biskuit masih dibawah ambang batas regulasi. Hal ini menunjukkan bahwa sanitasi dan higienitas khususnya para pekerja pengolahan produk terjamin aman. Karena menurut Hernawati (2018) kontaminasi *Staphylococcus aureus* juga dapat disebabkan oleh kontak langsung dengan orang yang terpapar bakteri ini. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri patogen yang dapat menyebabkan penyakit bawaan makanan dan menghasilkan enterotoksin (Fardiaz, 2020). Pada penelitian yang dilakukan oleh Susanto (2018) meneliti Kualitas Produk Biskuit dengan penerapan SNI Biskuit 2973 tahun 2011 didapat pada produsen biskuit besar (PT) analisis *Staphylococcus aureus* menghasilkan nilai 0 koloni/g ini menandakan bahwa tidak terdapatnya bakteri enterotoksin dalam sampel biskuit sama seperti yang terlihat pada Tabel 3. Ditemukannya *Staphylococcus koagulase* negatif (terlihat pada Gambar 1) berkorelasi dengan fakta bahwa bakteri ini merupakan mikroflora alami pada kulit. Sedangkan *Staphylococcus aureus* dan *Enterobacteriaceae* merupakan mikroba patogen sementara. Penularan mikroorganisme sementara tergantung pada spesies dan jumlah mikroorganisme pada permukaan kulit. Selain itu, mikroba tersebut umumnya lebih mudah dihilangkan dengan pembersihan manual (cuci tangan atau mempunyai kebiasaan hidup bersih dan sehat) dan prosedur yang tepat (cara mencuci tangan yang baik dan benar) (Bagus et al., 2019). Kesadaran akan prinsip pola hidup bersih dan sehat terlihat dalam menjaga kebersihan tangan pekerja setelah menggunakan toilet (Fardiaz, 2020).

Salmonella termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae*, sehingga bakteri ini dapat mencemari makanan yang diproses dan tidak diproses. Analisis *Salmonella* dilakukan untuk mendeteksi infeksi *Salmonella sp.* yang mempengaruhi saluran pencernaan, yaitu meliputi lambung, usus kecil, usus besar dan kolon. Beberapa spesies *Salmonella sp* dapat menyebabkan infeksi bawaan makanan. Ini termasuk *Salmonella enteritidis*, *typhimurium* dan *Salmonella choleraesuis*. Infeksi *Salmonella* pada manusia hampir selalu disebabkan oleh makanan atau minuman yang terkontaminasi bakteri ini (Fatiqin et al., 2019). Berikut Tabel 4. Hasil analisis *Salmonella* pada sampel biskuit di lima PT berbeda.

Tabel 4. Hasil analisis *Salmonella* pada sampel biskuit di lima PT berbeda

Parameter	PT	Biskuit	N	Hasil	Limit Regulasi		Unit
					m	M	
<i>Salmonella</i>	A	Marie susu	1	Negatif	Negatif/25g	NA	
			2	Negatif			
			3	Negatif			
			4	Negatif			
			5	Negatif			
	B	Gula coklat	1	Negatif	Negatif/25g	NA	
			2	Negatif			
			3	Negatif			
			4	Negatif			
			5	Negatif			
	C	Rasa kelapa	1	Negatif	Negatif/25g	NA	Negatif/25g
			2	Negatif			
			3	Negatif			
			4	Negatif			
			5	Negatif			
	D	Krim coklat	1	Negatif	Negatif/25g	NA	
			2	Negatif			
			3	Negatif			
			4	Negatif			
			5	Negatif			
	E	Rasa pisang	1	Negatif	Negatif/25g	NA	
			2	Negatif			
			3	Negatif			
			4	Negatif			
			5	Negatif			

Keterangan :

n = ulangan

NA = not applicable (tidak dapat diterapkan)

m = limit mikroba setelah proses pengolahan*M* = limit mikroba setelah sampai dipasaran

Berdasarkan Tabel 4 diatas bahwa semua sampel biskuit dinyatakan negatif/25g. Pada penelitian yang dilakukan oleh Susanto (2018) meneliti Kualitas Produk Biskuit dengan penerapan SNI Biskuit 2973 tahun 2011 didapat pada produsen biskuit besar (PT) analisis *Salmonella sp* menghasilkan hasil negatif/25g. Hal mengindikasikan bahwa dalam semua sampel biskuit tidak adanya patogen bawaan makanan dan aman untuk dikonsumsi. Studi menunjukkan bahwa mikroorganisme terutama *Salmonella* dapat bertahan hidup dalam tepung terigu dalam waktu yang lama dan dapat muncul dari fase dorman pada saat kondisi yang menguntungkan, misalnya pada campuran pangan atau adonan kue (Hernawati, 2018). Selain itu, bahan baku biskuit seperti tepung terigu, gula pasir, susu bubuk, *baking powder*, coklat, coklat bubuk, kacang dan selai kacang yang digunakan dalam pembuatan makanan yang dipanggang dapat menularkan patogen dan menghasilkan mikroba yang sudah dimasak sebelumnya. Meskipun bahan baku diatas berpotensi menularkan bakteri penyebab penyakit, namun sebagian besar kontaminasi terjadi pada peralatan yang digunakan untuk membuat biskuit dan banyaknya kasus kontaminasi muncul akibat pemanasan biskuit yang tidak tepat. Selama ini, memanaskan makanan, biskuit dan sebagainya efektif membunuh dan mengendalikan patogen bawaan makanan (Hernawati, 2018).

Analisis kapang dan khamir pada pangan yang mengandung terigu menunjukkan kemungkinan besar terkontaminasi oleh mikroba ini (Dwisari, 2020). Terigu kaya akan karbohidrat dan dapat menjadi sumber energi untuk perkembangan cendawan (kapang dan khamir). Makanan tinggi gula juga bisa menjadi tempat berkembang biak kapang dan khamir. Karena kebanyakan bakteri tidak bisa tumbuh dalam kondisi gula tinggi. Oleh sebab itu mengapa biskuit dengan isian selai dan manisan dengan konsentrasi gula tinggi dapat dirusak kapang dan bukan bakteri. Demikian juga, kapang dan khamir umumnya dapat bertahan dalam kondisi yang lebih asam daripada kebanyakan mikroba lainnya (Pelczar & Chan, 2010). Berikut Tabel 5. Hasil analisis kapang dan khamir pada sampel biskuit di lima PT berbeda.

Tabel 5. Hasil analisis Kapang dan Khamir pada sampel biskuit di lima PT berbeda

Parameter	PT	Biskuit	n	Hasil	Limit Regulasi		Unit
					m	M	
Kapang dan Khamir	A	Marie susu	1	< 10	5 x10 ²	10 ⁴	koloni/g
			2	< 10			
			3	< 10			
			4	< 10			
			5	< 10			
	B	Gula coklat	1	< 10	5 x10 ²	10 ⁴	
			2	< 10			
			3	< 10			
			4	< 10			
			5	< 10			
	C	Rasa kelapa	1	< 10	5 x10 ²	10 ⁴	
			2	< 10			
			3	< 10			
			4	< 10			
			5	< 10			
	D	Krim coklat	1	< 10	5 x10 ²	10 ⁴	
			2	< 10			
			3	< 10			
			4	< 10			
			5	< 10			
E	Rasa pisang	1	< 10	5 x10 ²	10 ⁴		
		2	< 10				
		3	< 10				
		4	< 10				
		5	< 10				

Keterangan :

n = ulangan

m = limit mikroba setelah proses pengolahan

M = limit mikroba setelah sampai dipasaran

Berdasarkan Tabel 5 di dapat bahwa hasil uji kapang khamir pada semua sampel biskuit masih aman dibawah baku mutu yang ditetapkan. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian Susanto (2018) yang mengevaluasi mutu produk biskuit dengan SNI Biskuit 2973 tahun 2011 didapat pada produsen biskuit besar (PT) analisis kapang khamir menghasilkan hasil kurang dari 10 koloni/g. Hasil yang didapat pada Tabel 5 diatas menunjukkan bahwa bahan baku utama produk yaitu tepung terigu memiliki kualitas yang baik.

Pemeriksaan cemaran mikrobiologis (ALT, *Enterobacteriaceae*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, kapang dan khamir) terhadap bahan pangan produk biskuit dapat memberikan

informasi mengenai mutu bahan baku, kebersihan pengolahan dan kebersihan para pekerjanya serta keefektifan metode pengawetan. Hal ini terbukti dari keenam cemaran mikrobiologi didapatkan hasil negatif dan kurang dari 10 koloni mikroba pada masing-masing parameter, masih di bawah ambang batas aman regulasi dikarenakan masalah-masalah keamanan pangan salah satunya cemaran mikrobiologi tersebut dapat teratasi produsen besar dalam negeri dalam menerapkan prinsip *Good Manufacturing Practice* (GMP), sanitasi serta HACCP dengan sangat baik. GMP adalah persyaratan dari prosedur minimum sanitasi di seluruh mata rantai produksi atau pengolahan untuk memastikan bahwa hasil produksi yang dihasilkan memenuhi standar yang telah ditetapkan (Mansyur, 2020). Dilaporkan oleh BPOM tahun 2016 dari Rini (2020) tercatat insiden keracunan Nasional berdasarkan penyebab makanan paling banyak terjadi yaitu pangan olahan yang menyebabkan Kejadian Luar Biasa (KLB) karena pengolahan pangan yang tidak benar. Tanpa menerapkan GMP dan sanitasi yang baik dalam industri maka akan sulit untuk menerapkan HACCP, sebab HACCP adalah sistem untuk mengidentifikasi, mengevaluasi dan mengendalikan bahaya agar keamanan pangan terpenuhi seluruhnya (Mansyur, 2020). Pada penelitian ini diteliti lima merek dari produsen besar biskuit berbeda di Indonesia dalam memenuhi syarat mutu biskuit SNI 2973:2022. Berdasarkan hasil penelitian didapat bahwa dari kelima sampel tersebut telah memenuhi syarat mutu biskuit 2973:2022.

4 KESIMPULAN

Sampel biskuit dengan lima merek berbeda di lima PT biskuit berbeda telah dilakukan uji parameter ALT, *Enterobacteriaceae*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, kapang dan khamir. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semua sampel telah memenuhi syarat mutu SNI Biskuit 2973:2022. Dapat disimpulkan bahwa penerapan keamanan pangan mikrobiologis oleh kelima perusahaan besar sudah sangat baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Bagus, I., Bhaskara, A., Agus Hendrayana, M., Januartha, K., & Pinatih, P. (2019). Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Salmonella* sp. Pada Kenop Pintu Keluar Toilet Umum Pria dan Wanita di Kampus Fakultas Kedokteran Universitas Udayana Denpasar. In *MEDIKA UDAYANA* (Vol. 8, Issue 8). <https://ojs.unud.ac.id/index.php/eum>
- BPOM. (2022). *Handbook Registrasi Pangan Olahan Biskuit, Kukis, Wafer and Krekers*.
- Darna, T. M. R. (2018). Identifikasi Bakteri Anggota *Enterobacteriaceae* pada Makanan Tradisional Sotong Pangkong. *Jurnal Laboran Medika*, 2(2), 6–12. <http://jurnal.unimus.ac.id/index.php/JLabMed>
- Dwisari, P. (2020). *Uji Angka Lempeng Total (ALT) dan Angka Kapang/Khamir (AKK) dalam Jamu Gendong Kunyit Asam di Pasar Tradisional Yang Berada di Kabupaten "X."*
- Fardiaz, S. (2020). *Mikrobiologi Pangan* (1st ed., Vol. 9796891573). Universitas Terbuka.
- Fatiqin, A., Novita, R., Apriani, I., Biologi, P., Sains, F., & Teknologi, D. (2019). Pengujian *Salmonella* dengan Menggunakan Media SSA dan *E. coli* Menggunakan Media EMBA Pada Bahan Pangan. In *Jurnal Indobiosains* (Vol. 1, Issue 1). <https://doi.org/JurnalIndobiosainsVol1.No.122-29>.
- Hernawati, A. A. R. S. (2018). Uji Mikrobiologi Biskuit dengan Penambahan Tepung Kulit Pisang. *Life Science*, 7(2).
- ISO 4833-1. (2013). *ISO 4833-1 Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms Part - 1: Colony count at 30°C by the pour plate technique*.

- ISO 6579-1 E. (2017). *ISO 6579-1 (E) Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella*.
- ISO 6887-1. (2017). *ISO 6887-1 Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination Part 1 : General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. Second Edition, 1–4*.
- ISO 6887-4. (2012). *ISO 6887-4 Microbiology of food and feed - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiology examination Part 4 : Special for the preparation of product other than milk and dairy product, meat and meat product and fish and fishery product*. www.bsn.go.id
- ISO 6888-1 E. (2021). *ISO 6888-1 (E) Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive Staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) Part 1 : Method using Baird-Parker agar medium*. www.iso.org
- ISO 6888-2. (1999). *ISO 6888-2 Microbiology of food and feed - Horizontal procedure for the counting of coagulase - positive Staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) Part 2 : Rabbit plasma / fibrinogen agar method*.
- ISO 21527-2. (2009). *ISO 21527-2 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds Part 2 : Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0.95*. www.unbs.go.ug
- ISO 21528-2. (2017). *ISO 21528-2 Microbiology of the food chain - Horizontal Method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae Part 2 : Colony-count technique*. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c8ce5547-a3ed-4128-a2e3-d9acca126a8e/>
- Kaparang, M., Palandi, R., Tulandi, S., & Tumbel, S. (2020). Analisis Mikrobiologi Bakteri Coliform dan Enterobacter Terhadap Kualitas Tepung Kelapa di PT Royal Coconut Gorontalo. *Majalah Info Sains*, 2020(1), 11–15.
- Mansyur, M. (2020). *Keamanan Pangan dan Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP)*.
- Nuraida, L. (2021). *Keamanan Pangan* (1st ed., Vol. 9789790113930). Universitas Terbuka.
- Pelczar, M., & Chan. (2010). *Dasar-dasar Mikrobiologi* (2nd ed.). Universitas Indonesia.
- Ratnasari Ekawati, E., Nur Husnul, S. Y., & Rooslan Hamidi, F. (2017). Deteksi Escherichia coli Patogen Pada Pangan Menggunakan Metode Konvensional dan Metode Multiplex PCR. *Jurnal Saint Health*, 1(2).
- Rini, T. (2020). Penyelenggaraan Keamanan Pangan sebagai Salah Satu Upaya Perlindungan Hak Masyarakat sebagai Konsumen. *Masalah-Masalah Sosial*, 11(1). <https://doi.org/10.22212/aspirasi.v11i1.1523>
- Sara, S. (2017). *Uji Angka Staphylococcus aureus Dalam Biskuit Kemasan*.
- Soesetyaningsih, E. A. (2020). Akurasi Perhitungan Bakteri pada Daging Sapi Menggunakan Metode Hitung Cawan (Calculation Accuracy of Bacterical in Beef Meat Using Total Plate Count Method).
- Susanto, D. A. (2018). *Kualitas Produk Biskuit Menghadapi Pemberlakuan SNI Biskuit Secara Wajib [Studi Kasus di DKI Jakarta]*.