

### III. MATERI DAN METODE

#### 3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai Juni 2013 di Laboratorium Teknologi Pascapanen dan Laboratorium Patologi, Entomologi dan Mikrobiologi Fakultas Pertanian dan Peternakan Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau. Selain itu, analisis juga dilakukan di Unit Pelaksanaan Teknis Dinas Perindustrian dan Perdagangan Provinsi Riau.

#### 3.2. Materi Penelitian

##### 3.2.1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kaldu daging kerbau sebanyak 1,5 kg. Daging kerbau diperoleh dari tempat pemotongan hewan Kabupaten Kampar Provinsi Riau. Bahan tambahan yang digunakan meliputi tepung beras, gula merah, gula pasir, dan bumbu-bumbu (bawang putih, bawang merah, daun jeruk purut, daun salam, garam, jahe, serai, dan vetsin (Nuriningasih, 2007).

Bakteri asam laktat yang digunakan yaitu *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus* yang diperoleh dari Pusat Antar Universitas (PAU) Laboratorium Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta (UGM). Adapun bahan untuk analisis bakteri patogen adalah *buffer pepton water* (BPW) 0,1%, *brilliant green lactose bile broth* (BGLBB), *escherichia coli broth* (ECB), *hektoen enteric* (HE) agar, *lactose broth* (LB), *lauryl sulphate tryptose broth* (LSTB) dan *tetrathionate brilliant green broth* (TBGB).

### 3.2.2. Alat

Alat yang digunakan adalah peralatan untuk pembuatan petis, sedangkan untuk analisis bakteri patogen menggunakan alat sebagai berikut: cawan petri, tabung reaksi dan penutupnya, labu erlenmeyer, botol medium, rak tabung reaksi, tabung *durham*, plastik steril, timbangan, bunsen, aluminium foil, kasa steril, jarum ose, *stomacher*, *laminar air flow*, inkubator, penangas air/*water bath*, mikropipet dan pipet tip.

### 3.3. Metode Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 4 kali ulangan. Perlakuan pada penelitian ini yaitu penambahan bakteri *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus* ke dalam petis daging kerbau sebanyak 0%, 2%, 4%, 6%, dan 8%.

- P0 : Petis daging + bakteri *Streptococcus thermophilus* dan bakteri *Lactobacillus bulgaricus* sebanyak 0% (kontrol)
- P2 : Petis daging + bakteri *Streptococcus thermophilus* dan bakteri *Lactobacillus bulgaricus* sebanyak 2%
- P4 : Petis daging + bakteri *Streptococcus thermophilus* dan bakteri *Lactobacillus bulgaricus* sebanyak 4%
- P6 : Petis daging + bakteri *Streptococcus thermophilus* dan bakteri *Lactobacillus bulgaricus* sebanyak 6%
- P8 : Petis daging + bakteri *Streptococcus thermophilus* dan bakteri *Lactobacillus bulgaricus* sebanyak 8%

### 3.4. Prosedur Penelitian

Pembuatan petis daging kerbau dilakukan sesuai metode Kristianingrum (2003) yang telah dimodifikasi pada penelitian ini meliputi beberapa tahap sebagai berikut.

#### **3.4.1. Peremajaan Kultur Bakteri**

Peremajaan dengan cara memindahkan atau memperbarui biakan mikroba dari biakan lama ke medium tumbuh yang baru secara berkala (Mahmud, 2001). Isolat dari PAU Pangan dan Gizi UGM pada media *de Man's Rogosa Sharpe Broth* (MRSB).

#### **3.4.2. Tahap Pembuatan Kaldu**

Tahap pembuatan kaldu dimulai dari: *a)* 1 kg daging dicuci bersih; *b)* Daging yang telah dipotong kecil-kecil direndam dalam 200 ml aquades dan tambahkan garam sebanyak 35 g; *c)* Kemudian daging didinginkan dalam *refrigerator* pada suhu 4°C selama 6 jam; *d)* Selanjutnya daging ditambahkan aquades sebanyak 3 liter dan dipanaskan pada suhu 90°C selama 10 menit; *e)* Daging disaring, sehingga diperoleh cairan perebusan daging (kaldu) dan daging dapat diolah untuk produk lain.

#### **3.4.3. Tahap Inokulasi BAL (*Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus*)**

Tahap inokulasi BAL yaitu sebagai berikut: *a)* Kaldu dibagi sebanyak perlakuan dan ulangan kemudian dilakukan inokulasi BAL sesuai perlakuan yang diinginkan pada suhu 40°C; *b)* Setiap perlakuan membutuhkan 150 ml kaldu; *c)* Kemudian pemeraman dilakukan pada suhu kamar selama 48 jam.

#### **3.4.4. Tahap Pembuatan Petis Daging**

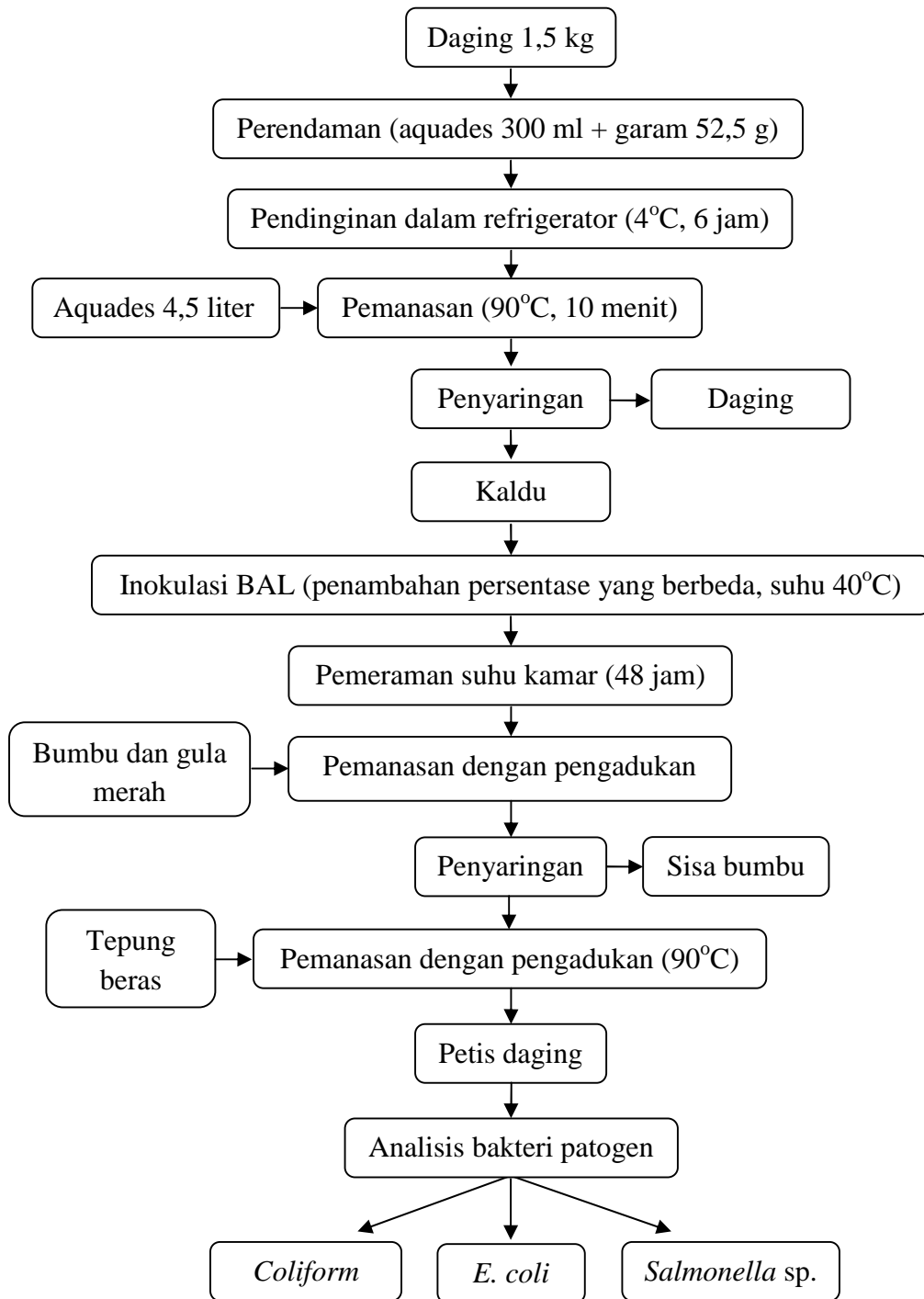
Tahap pembuatan petis daging sebagai berikut: *a)* Bumbu yang dibutuhkan meliputi 3 g bawang merah dan 1,5 g bawang putih yang dihaluskan bersama 8,5 g garam, 0,5 g vetsin dan 15 g gula pasir. Kemudian dicampurkan dalam 150 ml kaldu dengan bumbu lain yaitu daun 0,35 g daun salam, 0,8 g laos,

0,5 g sereh, 1,5 g jahe dan 0,35 g daun jeruk purut (Kristianingrum (2003) yang dimodifikasi); *b*) Gula merah ditimbang sesuai dengan berat konsentrasi yang digunakan yaitu 20% dari jumlah kaldu didasarkan pada perlakuan terbaik dalam penelitian Pratiwi (2006) kemudian diiris tipis-tipis untuk mempermudah pelarutannya dan dicampurkan dalam kaldu yang sudah diberi bumbu *a*); *c*) Campuran kaldu, bumbu dan gula merah direbus sampai mendidih, kemudian dalam keadaan panas disaring. Hasil saringan (cairan) ditampung untuk proses lebih lanjut; *d*) Cairan hasil penyaringan tersebut dimasukkan ke dalam panci *stainless steel* dan dipanaskan sampai mendidih; *e*) Tepung beras ditimbang sesuai konsentrasi yang digunakan yaitu 2% didasarkan pada perlakuan terbaik dalam penelitian Pratiwi (2006) kemudian dilarutkan dengan sedikit air kaldu dan diaduk hingga homogen; *f*) Larutan tepung beras ditambahkan ke dalam kaldu di panci *stainless steel* sambil terus dipanaskan pada suhu 90°C sampai mengental dan elastis; *g*) Setelah kaldu mengental dan elastis, panci *stainless steel* diangkat dan didinginkan sehingga diperoleh petis daging. Prosedur pembuatan petis daging dengan penambahan *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus* seperti terlihat pada Gambar 3.1.

### **3.5. Parameter yang Dujii**

Adapun parameter yang diujii dalam penelitian ini meliputi:

1. *Coliform*
2. *Escherichia coli*
3. *Salmonella* sp.



Gambar 3.1. Diagram Alir Proses Pembuatan Petis Daging menurut Kristianingrum (2003) yang Dimodifikasi.

### 3.6. Prosedur Pengambilan Data

#### 3.6.1. Pengujian *Coliform* (SNI 2897:2008)

Prinsip penghitungan jumlah *Coliform* adalah berdasarkan metode *Most Probable Number* (MPN) yang terdiri dari uji presumtif (pendugaan) dan uji konfirmasi (peneguhan), dengan menggunakan media cair dalam tabung reaksi dan dilakukan berdasarkan jumlah tabung positif. Pengamatan tabung positif dapat dilihat dengan timbulnya gas di dalam tabung *durham*.

Pengujian diawali dengan penyiapan sampel sebanyak 25 g secara aseptik kemudian dimasukkan ke dalam plastik steril yang telah berisi 225 ml larutan BPW 0,1% steril, lalu dihomogenkan dengan *stomacher* selama 1-2 menit. Larutan yang terbentuk merupakan pengenceran  $10^{-1}$ . Uji pendugaan dilakukan dengan pemindahan 1 ml larutan pengencer  $10^{-1}$  tersebut dengan pipet steril ke dalam larutan 9 ml larutan BPW 0,1% untuk mendapatkan pengenceran  $10^{-2}$ . Selanjutnya dengan cara yang sama dibuat pengenceran  $10^{-3}$ . Pipet masing-masing 1 ml dari setiap pengenceran ke dalam 3 seri tabung LSTB yang berisi tabung *durham*. Selanjutnya diinkubasikan pada temperatur  $35^{\circ}\text{C}$  selama 24-48 jam. Diperhatikan adanya gas yang terbentuk di dalam tabung *durham*. Hasil uji dinyatakan positif apabila terbentuk gas.

Uji peneguhan harus selalu disertai dengan menggunakan kontrol positif. Pengujian dilakukan dengan memindahkan biakan positif dari hasil uji pendugaan positif dengan menggunakan jarum inokulasi dari setiap tabung LSTB ke dalam tabung BGLBB yang berisi tabung *durham*. Selanjutnya BGLBB diinkubasikan pada temperatur  $35^{\circ}\text{C}$  selama  $24\pm 2$  jam dan bila hasilnya negatif diinkubasikan kembali selama  $48\pm 2$  jam. Perhatikan adanya gas yang terbentuk di dalam tabung

*durham*. Hasil uji dinyatakan positif apabila terbentuk gas. Selanjutnya gunakan tabel *Most Probable Number* (MPN) untuk menentukan nilai MPN berdasarkan jumlah tabung BGLBB yang positif sebagai jumlah *Coliform* per mililiter atau per gram.

### **3.6.2. Pengujian *Escherichia coli* (*E. coli*) (SNI 2897:2008)**

Prinsip dari pengujian *E. coli* menggunakan metode *Most Probable Number* (MPN) dengan menggunakan seri 3 tabung. Pengujian dilakukan dengan uji presumtif (pendugaan) dan uji konfirmasi (peneguhan). Pengujian diawali dengan menyiapkan sampel sebanyak 25 g secara aseptik, kemudian dimasukkan ke dalam plastik steril yang telah berisi 225 ml larutan BPW 0,1% steril, lalu dihomogenkan dengan *stomacher* selama 1-2 menit. Larutan yang terbentuk merupakan pengenceran  $10^{-1}$ . Uji pendugaan dilakukan dengan memindahkan 1 ml larutan pengencer  $10^{-1}$  tersebut dengan menggunakan pipet steril ke dalam 9 ml larutan BPW 0,1% untuk mendapatkan pengenceran  $10^{-2}$ . Dengan cara yang sama dibuat pengenceran  $10^{-3}$ . Pipet masing-masing 1 ml dari setiap pengenceran ke dalam 3 seri tabung LSTB yang berisi tabung *durham*. Inkubasi dilakukan pada temperatur  $35^{\circ}\text{C}$  selama 24-48 jam dan diperhatikan adanya gas yang terbentuk di dalam tabung *durham*. Hasil uji dinyatakan positif apabila terbentuk gas.

Uji peneguhan harus selalu disertai dengan penggunaan kontrol positif. Pengujian dilakukan melalui pemindahan biakan positif dari hasil uji pendugaan positif dengan menggunakan jarum inokulasi dari setiap tabung LSTB ke dalam tabung ECB yang berisi tabung *durham*. Selanjutnya ECB diinkubasikan pada temperatur  $45,5^{\circ}\text{C}$  selama  $24\pm 2$  jam dan bila hasilnya negatif diinkubasikan

kembali selama  $48 \pm 2$  jam dan perhatikan adanya gas yang terbentuk di dalam tabung *durham*. Hasil uji dinyatakan positif apabila terbentuk gas.

### **3.6.3. Pengujian *Salmonella* sp. (SNI 2897:2008)**

Pengujian jumlah *Salmonella* menggunakan media selektif melalui tiga tahapan yaitu pra pengayaan (*pre-enrichment*), pengayaan (*enrichment*) kemudian dilanjutkan dengan uji seleksi. Tahap pra-pengayaan dilakukan dengan mempersiapkan sampel petis ditimbang sebanyak 25 g kemudian dimasukkan ke dalam wadah steril yang telah berisi 225 ml larutan LB steril, kemudian dihomogenkan dengan *stomacher* selama 1-2 menit. Suspensi dipindahkan ke dalam labu *Erlenmeyer* atau wadah steril kemudian diinkubasi pada temperatur  $35^{\circ}\text{C}$  selama  $24 \pm 2$  jam.

Tahapan uji pengayaan dengan cara mengaduk perlahan biakan pra-pengayaan, kemudian dipipet 10 ml dan dimasukkan ke dalam 100 ml TBGB. Selanjutnya TBGB diinkubasikan pada temperatur  $43^{\circ}\text{C}$  selama  $24 \pm 2$  jam. Tahap seleksi dilakukan melalui pengambilan 1 ose dari media pengayaan dan diinokulasikan pada media HE, kemudian diinkubasikan pada temperatur  $35^{\circ}\text{C}$  selama  $24 \pm 2$  jam. Koloni *Salmonella* diamati pada media HE yang terlihat berwarna hijau kebiruan dengan atau tanpa titik hitam ( $\text{H}_2\text{S}$ ).

### **3.7. Analisis Data**

Data hasil pengujian *Coliform*, *E. coli*, dan *Salmonella* sp. yang diperoleh dari masing-masing perlakuan dianalisis dengan menggunakan analisis deskriptif, yaitu dengan menentukan rata-rata dengan menggunakan rumus sebagai berikut:



$$= \frac{\sum i}{n}$$

Keterangan:

: Nilai rata-rata pengamatan atau rata-rata sampel

: Penjumlahan

i : Nilai pengamatan ke- i (i = 1, 2, 3,....., n)

n : Jumlah sampel