

III. MATERI DAN METODE

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Januari 2015 di Laboratorium Patologi, Entomologi dan Mikrobiologi Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau serta di Unit Pelaksanaan Teknis Dinas Perindustrian dan Perdagangan Provinsi Riau.

3.2. Materi Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: HCl 5%, aquades, 90 butir telur puyuh segar dan kaki ayam segar sebanyak 5 kg yang dibeli di pasar tradisional Kota Pekanbaru lalu disimpan selama 2 hari di dalam *freezer* kemudian baru dilakukan proses ekstraksi, BPW 0,1%, *Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLBB) untuk analisis *Coliform*, *Escherichia coli Broth* (ECB) untuk analisis *E. coli*, *Hektoen Enteric Agar* (HEA) untuk analisis *Salmonella*.

Peralatan yang digunakan adalah: *cawan Petri*, tabung reaksi, labu *Erlenmeyer*, tabung *Durham*, plastik *steril*, timbangan, lampu *spiritus*, *aluminium foil*, *kasa steril*, jarum *ose*, *stomacher*, *inkubator*, *water shaker bath*, *mikropipet*, pipet *tip*.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Prosedur Pembuatan Gelatin

Proses pembuatan gelatin dilakukan sesuai metode Zulfikar (2012) yang dimodifikasi dan dipisah menjadi 2 tahap yaitu :

A. Tahap pertama

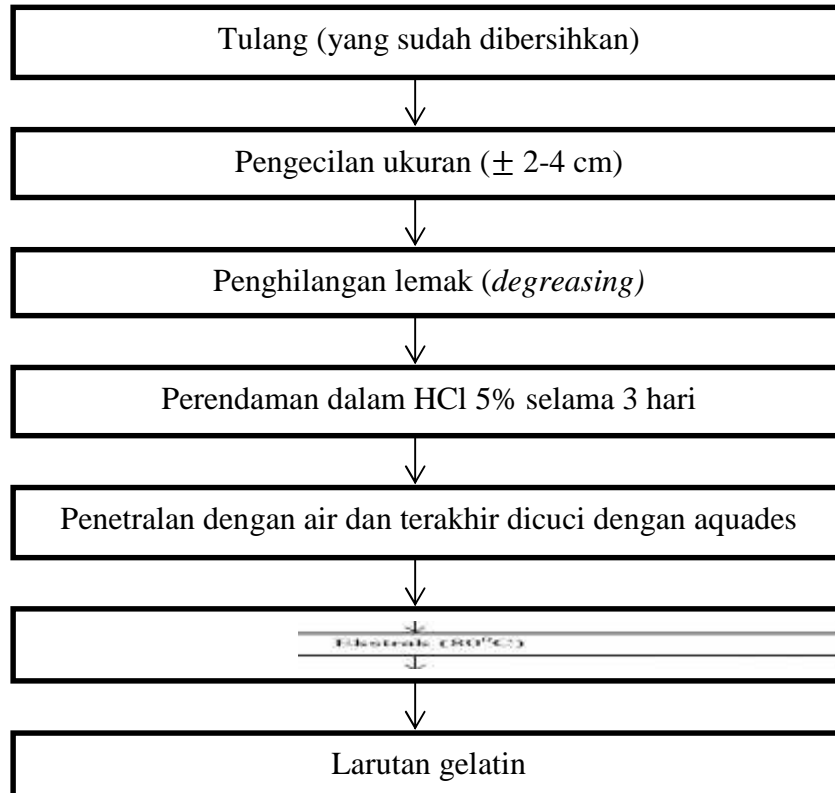
1. Tulang kaki ayam yang sudah didapat dibersihkan dari sisa daging dan lemak yang masih menempel.
2. Tulang dipotong kecil 2-4 cm.
3. Proses penghilangan lemak pada tulang yang kedua dengan cara direbus bersama aquades selama 3 jam di *water shaker bath* dengan suhu 80⁰C sambil diaduk dengan kecepatan 120 rpm.
4. Tulang yang sudah hilang kandungan lemaknya, kemudian dibilas beberapa kali hingga minyak benar-benar bersih, setelah itu tulang direndam dalam HCl 5% selama 3 hari.
5. Tulang yang sudah selesai perendaman menggunakan HCl, selanjutnya dinetralkan menggunakan air suling hingga mencapai pH ± 5 .
6. Tulang yang sudah mencapai pH ± 5 dilakukan ekstraksi dengan aquades selama 3 jam dengan suhu 80⁰C sambil diaduk dengan kecepatan 120 rpm.

B. Tahap kedua

1. Larutan rendemen yang sudah di ekstrak lalu didiamkan hingga memekat.
2. Larutan rendemen disaring kemudian disimpan dalam kulkas hingga larutan rendemen menjadi gel.
3. Lalu rendemen tadi dikeringkan menggunakan *oven* selama 72 jam dengan suhu 40⁰C.
4. Larutan rendemen yang sudah mengering menjadi tepung siap untuk di aplikasikan ketelur puyuh.

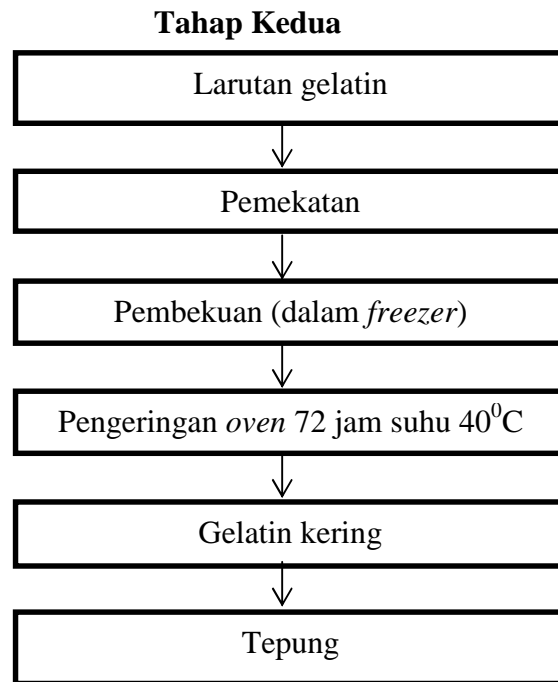
Skema proses pembuatan tulang kaki ayam menjadi larutan gelatin dapat dilihat pada Gambar 3.1 di bawah ini :

Tahap Pertama



Gambar 3.1. Proses produksi gelatin tulang kaki ayam (Zulfikar, 2012)

Skema proses pembuatan larutan gelatin menjadi tepung dapat dilihat pada Gambar 3.2 di bawah ini :



Gambar 3.2. Proses pembuatan tepung gelatin tulang kaki ayam (Zulfikar , 2012)

3.3.2. Proses Perendaman Telur Puyuh

1. Tepung gelatin yang sudah jadi kemudian dilarutkan dalam aquades sebagai media perendaman telur puyuh dengan perbandingan 6,67% : 100 ml untuk setiap media perendaman.
2. Telur puyuh direndam selama 0 menit kemudian langsung diamati bakteri patogen.
3. Telur puyuh direndam selama 0 menit, disimpan selama 15 hari selanjutnya diamati bakteri patogen.
4. Telur puyuh direndam selama 0 menit, disimpan selama 30 hari selanjutnya diamati bakteri patogen.
5. Telur puyuh direndam dalam larutan gelatin selama 30 menit kemudian langsung diamati bakteri patogen.

6. Telur puyuh direndam selama 30 menit, simpan selama 15 hari kemudian diamati bakteri patogen.
7. Telur puyuh direndam selama 30 menit, simpan selama 30 hari kemudian diamati bakteri patogen.
8. Telur puyuh direndam selama 60 menit kemudian diamati bakteri patogen.
9. Telur puyuh direndam selama 60 menit, simpan selama 15 hari kemudian diamati bakteri patogen.
10. Telur puyuh direndam selama 60 menit, simpan selama 30 hari kemudian diamati bakteri patogen.

3.4. Peubah yang Diukur

Adapun peubah yang akan diukur dalam penelitian ini adalah :

1. *Coliform* (APM/g)
2. *Escherichia coli* (APM/g)
3. *Salmonella sp* (Per 25g)

Telur puyuh sebanyak 90 butir yang disimpan pada suhu kamar selama 0 hari, 15 hari, 30 hari diamati bakteri patogennya. Pengamatan mulai pada 0 hari dengan jumlah telur sebanyak 30 butir, 15 hari penyimpanan menggunakan telur sebanyak 30 butir, dan 30 hari penyimpanan menggunakan telur sebanyak 30 butir telur.

3.5. Teknik Pengambilan Data

3.5.1. 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 telur puyuh sebanyak 25 g secara aseptik kemudian dimasukkan ke dalam plastik steril yang telah berisi 225 ml larutan *Buffered Pepton Water* 0,1% (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 *Buffered Pepton Water* 0,1% (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 *Lauryl Sulfate Tryptose Broth* (LSTB) yang berisi tabung *durham*. Selanjutnya diinkubasikan pada temperatur 35°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 *Lauryl Sulfate Tryptose Broth* (LSTB) ke dalam tabung *Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLBB) yang berisi tabung *durham*. Selanjutnya *Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLBB) diinkubasikan pada temperatur 35°C selama 24 ± 2 jam dan bila hasilnya negatif diinkubasikan kembali selama 48 ± 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 *Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLBB) yang positif sebagai jumlah *Coliform* per mililiter atau per gram.

3.5.2. 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 telur puyuh sebanyak 25 g secara aseptik, kemudian dimasukkan ke dalam plastik steril yang telah berisi 225 ml larutan *Buffered Pepton Water* 0,1% (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 *Buffered Pepton Water* 0,1% (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 *Lauryl Sulfate Tryptose Broth* (LSTB) yang berisi tabung *durham*. Inkubasi dilakukan pada temperatur 35°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 *Lauryl Sulfate Tryptose Broth* (LSTB) ke dalam tabung *Escherichia Coli Broth* (ECB) yang berisi tabung *durham*. Selanjutnya *Escherichia Coli Broth* (ECB) diinkubasikan pada temperatur $45,5^{\circ}\text{C}$ selama 24 ± 2 jam dan bila hasilnya negatif diinkubasikan

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

3.5.3. 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 telur puyuh ditimbang sebanyak 25 g kemudian dimasukkan ke dalam wadah steril yang telah berisi 225 ml larutan *Lactose Broth* (LB) steril, kemudian dihomogenkan dengan *stomacher* selama 1-2 menit. Suspensi dipindahkan ke dalam labu *Erlenmeyer* atau wadah steril kemudian diinkubasi pada temperatur 35°C selama 24 ± 2 jam.

Tahapan uji pengayaan dengan cara mengaduk perlahan biakan pra-pengayaan, kemudian dipipet 10 ml dan dimasukkan ke dalam 100 ml *Tetrathionate Brilliant Green Bile* (TBGB). Selanjutnya *Tetrathionate Brilliant Green Bile* (TBGB) diinkubasikan pada temperatur 43°C selama 24 ± 2 jam. Tahap seleksi dilakukan melalui pengambilan 1 ose dari media pengayaan dan diinokulasikan pada media *Hektoen Enteric* (HE), kemudian diinkubasikan pada temperatur 35°C selama 24 ± 2 jam. Koloni *Salmonella* diamati pada media *Hektoen Enteric* (HE) yang terlihat berwarna hijau kebiruan dengan atau tanpa titik hitam (H_2S).

3.6. Analisis Data

Data hasil pengujian *Coliform*, *E. coli*, dan *Salmonella* sp. dianalisis dengan menggunakan analisis deskriptif, yaitu penghitungan rata-rata dari masing-masing perendaman telur puyuh dengan gelatin tulang kaki ayam dengan

pembandingan batas maksimum cemaran mikroba telur SNI 7388:2009 dan metode pengujian cemaran mikroba dalam daging, telur, dan susu, serta hasil olahannya SNI 2897:2008. Dasar perbandingan yang digunakan adalah lama perendaman dan lama penyimpanan, dengan lama perendaman selama 0 menit, 30 menit dan 60 menit sedangkan lama penyimpanan yaitu 0 hari, 15 hari dan 30 hari.