

II. MATERI DAN METODE

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September – November 2014 di Laboratorium Teknologi Pasca Panen, dan Laboratorium Patologi, Entomologi dan Mikrobiologi Fakultas Pertanian dan Peternakan Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Bahan

Bahan yang digunakan adalah daging kerbau sebanyak 4000 g yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) Cipta Karya Kota Pekanbaru Provinsi Riau, bahan lain yang digunakan untuk pembuatan sosis probiotik adalah lemak daging, garam, bahan pengisi (tepung tapioka), bahan pengikat (susu skim), es batu, bumbu-bumbu (bawang putih, lada, pala dan gula pasir), selongsong sosis (*casing*). Starter bakteri yang digunakan yaitu *Lactobacillus plantarum* yang diperoleh dari koleksi bakteri Pusat Antar Universitas, Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

Media untuk perbanyakan bakteri adalah *Plate Count Agar* (PCA), *Potato Dextrose Agar* (PDA) dan *de-Mann Rogossa Sharp Agar* (MRSA). Media untuk peremajaan adalah *Nutrient Agar* (NA) dan *de Man's Rogosa Sharpe Broth* (MRSB), sedangkan untuk pengencer menggunakan *Buffer Pepton Water* (BPW).

3.2.2 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian adalah peralatan untuk proses pembuatan sosis probiotik seperti pisau, kompor, panci untuk merebus,

timbangan, blender/*stomaker*, *stuffer*, plastik stomaker, dan lain-lain. Sedangkan untuk analisis mikrobiologis menggunakan alat sebagai berikut: cawan petri, tabung reaksi, labu Erlenmeyer, rak tabung reaksi, bunsen, aluminium foil, kasa steril, kaca pembesar (lup), jarum ose, *vortex*, *laminar air flow*, inkubator, *autoklaf*, mikropipet, pipet tip.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dirancang dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 4 ulangan. Perlakuan yang diterapkan yaitu penambahan konsentrasi bakteri *Lactobacillus plantarum* dengan konsentrasi berbeda pada sosis probiotik daging kerbau. Perbedaan konsentrasi tersebut adalah sebagai berikut :

A : Sosis daging kerbau + 0% bakteri *Lactobacillus plantarum*

B : Sosis daging kerbau + 2% bakteri *Lactobacillus plantarum*

C : Sosis daging kerbau + 4% bakteri *Lactobacillus plantarum*

D : Sosis daging kerbau + 6% bakteri *Lactobacillus plantarum*

E : Sosis daging kerbau + 8% bakteri *Lactobacillus plantarum*

Perlakuan tersebut diacak sesuai dengan rancangan yang digunakan, dimana setiap perlakuan akan mendapatkan empat kali ulangan. Bagan pengacakan perlakuan dapat dilihat pada Gambar 3.1.

E1	C1	D3	B4
C4	B3	A1	D1
A3	E4	B1	C3
D2	A2	C2	E3
B2	D4	E2	A4

Gambar 3.1. Bagan pengacakan perlakuan

3.4 Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan dengan membuat sosis probiotik daging kerbau dilakukan sesuai metode Arief (2000) termodifikasi yang meliputi beberapa tahap sebagai berikut :

1. Tahap peremajaan (Pemurnian kultur starter)

Peremajaan kultur dengan cara memindahkan atau memperbarui biakan mikroba dari biakan lamake medium tumbuh yang baru secara berkala, misalnya sebulan atau dua bulan sekali. Teknik ini merupakan cara paling tradisional yang digunakan peneliti untuk memelihara koleksi isolat mikroba di laboratorium (Mahmud, 2001).

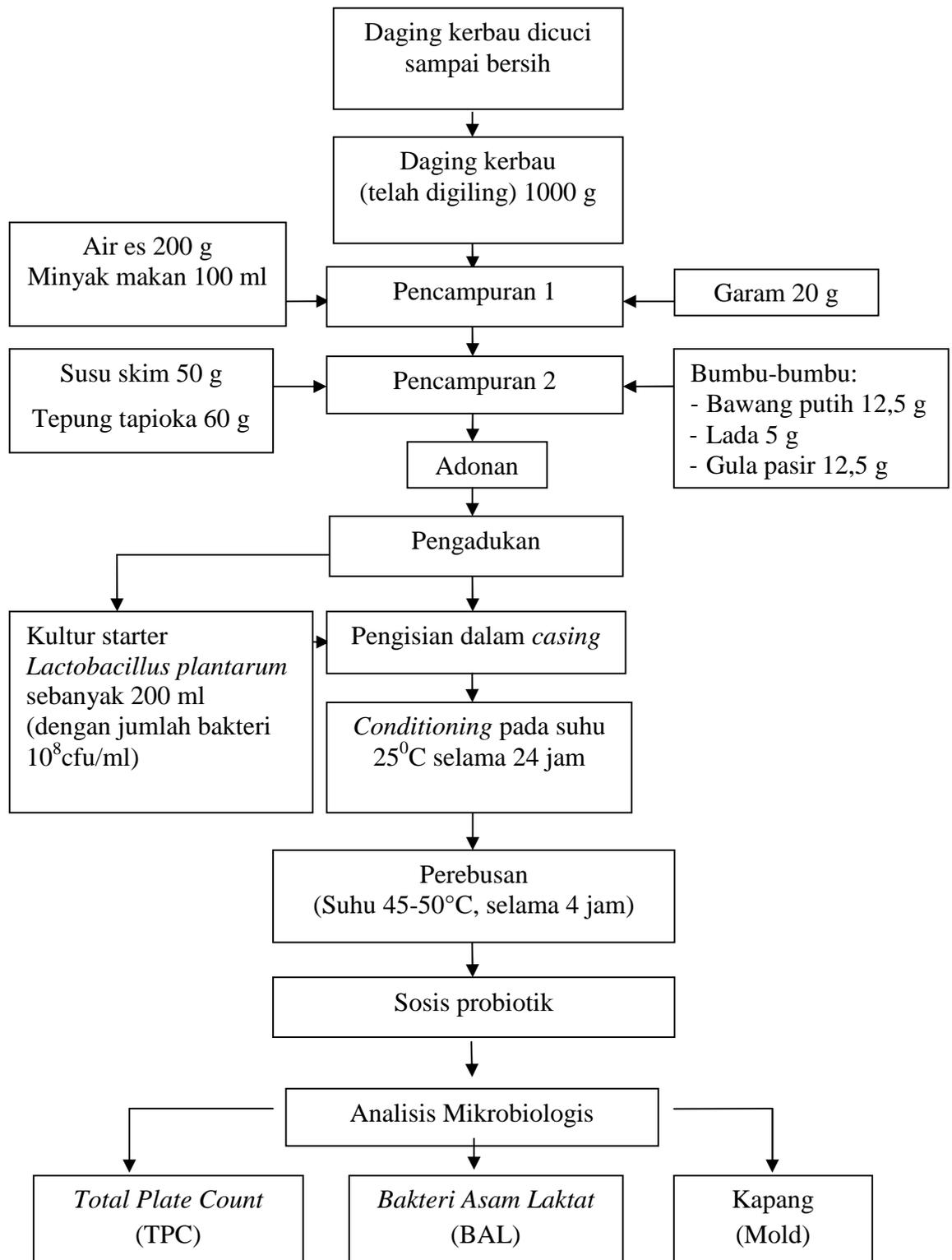
2. Tahap inokulasi BAL (*Lactobacillus plantarum*)

Kultur starter *Lactobacillus plantarum*, yang berupa stok kultur, diambil dengan menggunakan jarum ose lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi 5 ml MRSB dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 16-18 jam (semalam). Setelah diinkubasi 3 ml kultur starter tersebut dimasukan kedalam tabung yang berisi 300 ml MRSB dan diinkubasi lagi pada suhu 30°C selama 16-18 jam (semalam) dan kultur siap untuk digunakan.

3. Tahap pembuatan sosis probiotik

- a) Daging kerbau dibersihkan dari lemak, daging kerbau dicuci dengan air yang mengalir untuk menghilangkan kotoran dan darah yang masih melekat. Daging kerbau digiling dengan menggunakan *food processor* diulang sebanyak 3 kali untuk mendapatkan daging yang halus. Daging hasil gilingan kemudian ditimbang dengan timbangan analitik sebanyak 1000 gram.
- b) Bumbu yang terdiri atas bawang putih (12,5 g), lada (5 g), gula pasir (12,5 g), dan pala (2 g) dihaluskan sampai tercampur merata.
- c) Daging hasil penggilingan dicampur dengan garam (20 g) dan air es (200 g) menggunakan *grinder meat* dengan kecepatan speed 1 selama 0,5 menit.
- d) Pencampuran 1 : Penambahan lemak kerbau sebanyak (100 g) kedalam daging yang sudah tercampur dengan garam, air es dan STTP sebanyak (6 g).
- e) Pencampuran 2 : Penambahan susu skim sebanyak (50 g), tepung tapioka dan bumbu-bumbu kedalam daging hasil penggilingan dengan bahan campuran garam, air es, STTP dan lemak kerbau.
- f) Adonan yang sudah padat dicampurkan dengan kultur starter *Lactobacillus plantarum* sesuai perlakuan.
- g) Setelah adonan tercampur dengan kultur starter *Lactobacillus plantarum*, kemudian dilakukan pengadukan selama 10 menit. Selama pengadukan suhu adonan diusahakan tidak melebihi 22°C.

- h) Adonan sosis hasil pengadukan dimasukkan kedalam selongsong sosis (*casing*) berdiameter 6 cm dengan panjang 20 cm dengan menggunakan *stuffer*, lalu diikat dengan benang kasur.
- i) Adonan yang telah dimasukkan dalam *casing* lalu dilakukan *conditioning* pada suhu 25°C selama 24 jam yang disimpan dalam inkubator.
- j) Perebusan sosis yang sudah jadi pada suhu 45 - 50°C selama 4 jam.
Prosedur pembuatan sosis probiotik daging kerbau dengan penambahan bakteri *Lactobacillus plantarum* disajikan pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2. Diagram alir pembuatan sosis probiotik daging kerbau termodifikasi (Arief, 2000).

3.5 Parameter yang Diamati

Adapun parameter yang diamati pada penelitian ini meliputi :

1. *Total plate count*
2. Bakteri asam laktat
3. *Mold* (kapang)

3.6 Metode Pengujian Mutu Mikrobiologis

3.6.1 *Total Plate Count*

Persiapan media agar dan larutan BPW, untuk persiapan BPW masukkan 1 liter akuades ditambah dengan 25,5 gram BPW ke labu Erlenmeyer kemudian diaduk sampai merata. Sedangkan untuk media agar, 17,5 gram media PCA ditambahkan ke 1 liter akuades kemudian panaskan diatas kompor listrik sampai warna media kuning bening dan tidak keruh. Peralatan seperti cawan petri, gelas ukur, pipettip, tabung reaksi dibungkus dengan aluminium foil lalu dimasukkan kedalam *autoklaf*.

Menurut SNI 2897-2008 penyiapan contoh, cara uji dan penghitungan jumlah koloni adalah sebagai berikut: *a)* Penimbangan sampel semi padat sebanyak 25 gr kemudian masukkan dalam wadah plastik steril; *b)* Untuk contoh semi padat, tambahkan 225 ml larutan BPW 0,1% steril ke dalam wadah plastik yang berisi contoh, homogenkan dengan *vortex* selama 1-2 menit (pengenceran 10^{-1}); *c)* Memindahkan 1 ml suspensi pengenceran 10^{-1} tersebut dengan pipet steril ke dalam larutan 9 ml BPW untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} ; *d)* Melakukan pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} dan 10^{-6} dengan cara yang sama seperti pada butir *a)*; *e)* masukkan sebanyak 1 ml suspensi dari setiap pengenceran ke dalam cawan petri secara duplo; *f)* Menambahkan 15 ml sampai 20 ml PCA yang sudah didinginkan hingga temperatur 44°C sampai dengan 46°C pada masing-masing

cawan yang sudah berisi suspensi. Supaya larutan contoh dan media PCA tercampur seluruhnya, lakukan pemutaran cawan ke depan dan ke belakang atau membentuk angka delapan dan diamkan sampai menjadi padat; g) Menginkubasi pada temperatur 34°C sampai dengan 36°C selama 24 jam sampai dengan 48 jam dengan meletakkan cawan pada posisi terbalik; h) Menghitung jumlah koloni pada setiap seri pengenceran kecuali cawan petri yang berisi koloni menyebar (*spreader colonies*). Jumlah koloni yang dihitung berada pada kisaran 25 sampai dengan 250.

3.6.2 Bakteri Asama Laktat (BAL)

Bakteri asam laktat belum terdapat dalam SNI, maka untuk BAL diharapkan terdapat dalam sosis dan belum dapat ditentukan jumlahnya. Karena indikator fermentasi dari bahan pangan berhasil yaitu terdapatnya BAL dalam bahan pangan yang diolah.

Bakteri asam laktat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Lactobacillus plantarum* sedangkan media yang dapat digunakan untuk menganalisis adalah MRSA. MRSA merupakan media yang diperkenalkan oleh De Mann, Rogosa, dan Shape (1960) untuk memperkaya, menumbuhkan, dan mengisolasi jenis *Lactobacillus* dari seluruh jenis bahan. MRS agar mengandung polysorbat, asetat, magnesium, dan mangan yang diketahui untuk beraksi/bertindak sebagai faktor pertumbuhan bagi *Lactobacillus* (Partic, 2008).

Persiapan media MRSA, suspensikan 62 gram MRSA ke dalam 1 liter akuades. Panaskan di atas kompor listrik sambil diaduk, rebus selama 1 menit hingga tidak menggumpal. Sterilisasi dalam *autoklaf* pada suhu 121°C selama 12

menit. Dinginkan pada suhu 45–50°C, media siap untuk digunakan (Pronadisa, 2011).

Pemupukan dilakukan dengan cara timbang contoh semi padat sebanyak 25 gr kemudian masukkan dalam wadah plastik steril. Untuk contoh semi padat, tambahkan 225 ml larutan BPW 0,1% steril ke dalam wadah plastik yang berisi contoh, homogenkan dengan *vortex* selama 1-2 menit. Ini merupakan larutan dengan pengenceran 10^{-1} . memindahkan 1 ml suspensi pengenceran 10^{-1} tersebut dengan pipet steril ke dalam larutan 9 ml BPW untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} . Lakukan hal yang sama untuk mendapatkan pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} dan 10^{-6} . Kemudian 1 ml suspensi dipipet ke dalam cawan petri steril dan selanjutnya dinginkan hingga suhu 44–46°C, kemudian tuangkan sebanyak 15–20 ml media MRSA. Lakukan pemutaran cawan membentuk angka delapan hingga tercampur seluruhnya dan diamkan sampai menjadi padat. Inkubasi pada temperatur 34°C sampai dengan 36°C selama 24 jam sampai dengan 48 jam dengan meletakkan cawan pada posisi terbalik. Jumlah koloni yang dihitung berada pada kisaran 25 sampai dengan 250 (SNI 2897-2008).

3.6.3 *Mold* (kapang)

PDA digunakan untuk menumbuhkan atau mengidentifikasi *yeast* dan kapang. Dapat juga digunakan untuk enumerasi *yeast* dan kapang dalam suatu sampel atau produk makanan. PDA mengandung sumber karbohidrat dalam jumlah cukup yaitu terdiri dari 20% ekstrak kentang dan 2% glukosa sehingga baik untuk pertumbuhan kapang dan khamir tetapi kurang baik untuk pertumbuhan bakteri. Cara membuat PDA adalah mensuspensikan 39 g media PDA dalam 1 liter air yang telah didestilasi, campur dan panaskan serta aduk.

Didihkan selama 1 menit untuk melarutkan media secara sempurna. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Dinginkan hingga suhu 40-45°C dan tuang dalam cawan petri dengan pH akhir 5,6.

Menurut SNI 2897-2008 penyiapan contoh, cara uji dan penghitungan jumlah koloni adalah sebagai berikut: a) Penimbangan contoh semi padat sebanyak 25 gr kemudian masukkan dalam wadah plastik steril; b) Untuk contoh semi padat, tambahkan 225 ml larutan BPW 0,1% steril ke dalam wadah plastik yang berisi contoh, homogenkan dengan *vortex* selama 1-2 menit. Ini merupakan larutan dengan pengenceran 10^{-1} ; c) Memindahkan 1 ml suspensi pengenceran 10^{-1} tersebut dengan pipet steril ke dalam larutan 9 ml BPW untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} ; d) Selanjutnya memasukkan sebanyak 1 ml suspensi dari setiap pengenceran ke dalam cawan petri secara duplo; e) menambahkan 15 ml sampai 20 ml PDA yang sudah didinginkan hingga temperatur 40-45°C pada masing-masing cawan yang sudah berisi suspensi. Supaya larutan contoh dan media PDA tercampur seluruhnya maka lakukan pemutaran cawan ke depan dan ke belakang atau membentuk angka delapan dan diamkan sampai menjadi padat; f) Inkubasikan pada temperatur 34°C sampai dengan 36°C selama 24 jam sampai dengan 48 jam dengan meletakkan cawan pada posisi terbalik; g) menghitung jumlah koloni pada setiap seri pengenceran. Jumlah koloni yang dihitung berada pada kisaran 25 sampai dengan 250.

Rumus perhitungan jumlah mikroba:

$$\text{Jumlah mikroba (cfu/g)} = \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{Faktor pengenceran}}$$

3.7. Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis sidik ragam (ASIRA) dan analisis regresi. Analisis sidik ragam (ASIRA) digunakan untuk mengetahui berpengaruh nyata atau tidak terhadap perlakuan dan data disajikan dalam bentuk tabel. Sedangkan analisis regresi digunakan untuk melihat korelasi antara level yang digunakan dengan parameter yang diamati dan uji ini menggunakan software SPSS. Jika perlakuan berpengaruh nyata atau sangat nyata maka dilakukan uji lanjut menggunakan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) menurut Steel and Torrie (1991). Tabel analisis keragaman rancangan acak lengkap dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Analisis keragaman acak lengkap

Sumber	DB	JK	KT	F hit	F tabel	
					0,05	0,01
Perlakuan	t-1	JKP	KTP	KTP/KTG	-	-
Galat	t (r-1)	JKG	KTG	-	-	-
Total	tr-1	JKT	-	-	-	-

Model matematis Rancangan Acak Lengkap menurut Steel and Torrie(1991) sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan :

- Y_{ij} : Nilai pengamatan karakteristik sosis daging kerbau pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j
- μ : Rataan umum hasil perlakuan penambahan BAL
- t_i : Pengaruh perlakuan penambahan ke-i
- ϵ_{ij} : Pengaruh kesalahan perlakuan ke-i dan ulangan ke-j
- i : 1,2,3,4,5
- j : 1,2,3,4

Faktor korelasi (FK)	$= \frac{(\sum y_{ij})^2}{rt}$
Jumlah kuadrat total (JKT)	$= \sum (y_{ij})^2 - FK$
Jumlah kuadrat perlakuan (JKP)	$= \frac{\sum (y_i)^2}{r} - FK$
Jumlah Kuadrat galat (JKG)	$= JKT - JKP$
Kuadrat tengah perlakuan (KTP)	$= JKP / dbP$
Kuadrat tengah glat (KTG)	$= JKG / dbS$
F Hitung	$= KTP / KTG$

Hipotesis Statistik

H0 : Pengaruh perlakuan A=B=C=D=E

H1 : Pengaruh perlakuan A B C D E

Dengan kaedah

H0 diterima jika F hitung \leq F tabel ($\alpha = 0,05$)

H1 diterima jika F hitung $>$ F tabel ($\alpha = 0,05$)