

### III. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 BAHAN DAN ALAT

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain kultur *Lactobacillus bulgaricus* FNCC 004P dan *Streptococcus thermophilus* FCNN 1903, serta bakteri asam laktat (BAL) indigenus *Lactobacillus plantarum* 2C12 dan *Lactobacillus fermentum* 2B4 yang diperoleh dari Lab. IPT Ruminansia Besar, Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan IPB, kultur *Enteropathogenic Escherichia coli* K1.1 (EPEC K1.1), media *de Man Rogosa Sharpe Broth* (MRSB), media *de Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSB), media *Nutrient Broth* (NB), media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , akuades, NaOH 1N, glukosa, bacto agar (Difco),  $\text{CaCO}_3$ , susu skim, sukrosa, fruktooligosakarida (FOS) Orafti®, alkohol 70%, dan spiritus.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian antara lain lup (ose), mikropipet, pipet Mohr, pipet tetes, tabung reaksi, labu takar, corong gelas, erlenmeyer, gelas piala, gelas ukur, pengaduk, sudip, vorteks, cawan petri, bunsen, panci, baskom, *cup* yogurt, termometer, neraca analitik, autoklaf, oven, inkubator, *refrigerator*, viskometer Brookfield, dan pH-meter.

#### 3.2 METODE PENELITIAN

Penelitian ini dibagi dalam dua tahap, yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Penelitian pendahuluan meliputi pembuatan formula yogurt sinbiotik dan pengujian antibakteri yogurt sinbiotik terhadap EPEC secara *in vitro*. Penelitian utama meliputi aplikasi penambahan bahan penstabil dan flavor ke dalam formula yogurt sinbiotik terbaik dan analisis karakteristik mutu yogurt, seperti uji sifat fisik, kimia, dan mikrobiologi, uji karakteristik sensori, serta uji stabilitas selama penyimpanan. Secara keseluruhan, tahapan penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada **Gambar 1**.

##### 3.2.1 Pembuatan Formula Yogurt Sinbiotik

###### 3.2.1.1 Pemiakan Kultur Starter Bakteri Asam Laktat

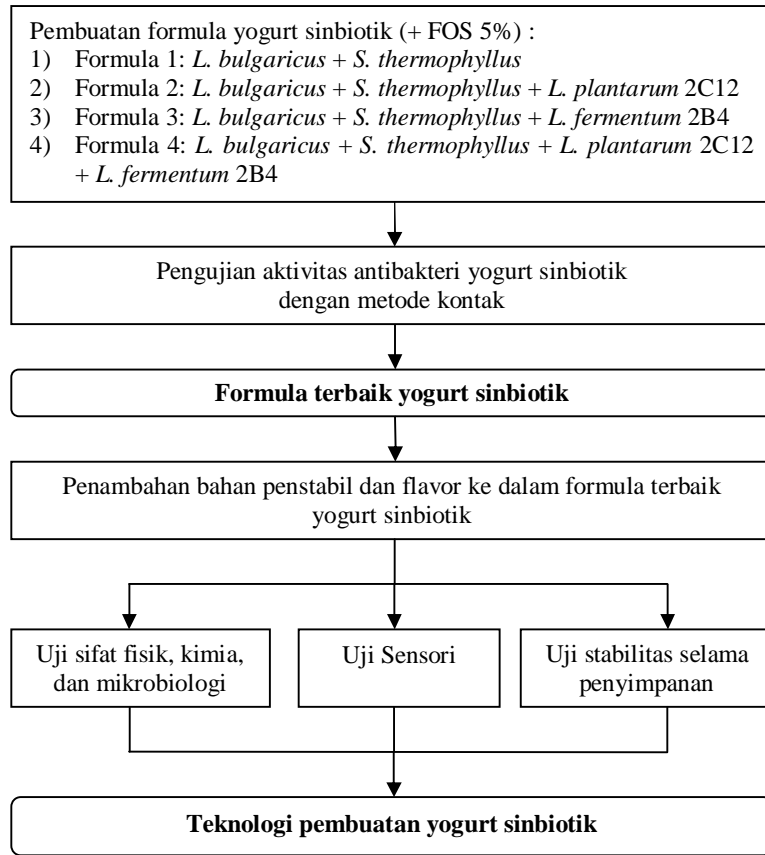
Pembuatan yogurt sinbiotik ini diawali dengan pemiakan kultur yogurt yaitu *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* serta bakteri asam laktat (BAL) lokal (*Lactobacillus plantarum* 2C12 dan *Lactobacillus fermentum* 2B4) yang berpotensi sebagai probiotik. Pertama, kultur murni disegarkan terlebih dahulu pada media *de Man Rogosa Sharpe Broth* (MRSB). Kemudian, sebanyak 2% dari kultur yang telah disegarkan tersebut diinokulasikan ke dalam larutan susu skim steril 10% dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur hasil inkubasi ini disebut dengan kultur induk.

Sebanyak 2% dari kultur induk diinokulasikan ke dalam larutan susu skim 10% yang telah mengandung glukosa murni 2% dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan hasilnya disebut dengan kultur kerja. Setelah itu, untuk mengetahui viabilitasnya, maka kultur kerja dipupukkan pada media *de Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSB). Kultur yang memenuhi syarat untuk siap dijadikan kultur starter yogurt adalah kultur dengan jumlah populasi yang lebih dari atau sama dengan  $10^8$  cfu/ml (Rahman *et al.* 1992).

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

**Pembuatan  
Formula  
Yogurt  
Sinbiotik**



Gambar 1. Diagram alir penelitian yang dilakukan

### 3.2.1.2 Pembuatan Yogurt Sinbiotik

Dua bakteri asam laktat (BAL) lokal yang berpotensi sebagai probiotik dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Arief *et al.* (2008), yaitu *Lactobacillus plantarum* 2C12 dan *Lactobacillus fermentum* 2B4, selanjutnya diaplikasikan pada pembuatan yogurt sinbiotik (mengandung probiotik dan prebiotik). Sementara itu, jenis prebiotik yang ditambahkan ke dalam masing-masing formula yogurt adalah FOS 5%.

Empat formula yogurt yang dibuat antara lain:

- 1) Formula 1: *L. bulgaricus* + *S. thermophilus*
- 2) Formula 2: *L. bulgaricus* + *S. thermophilus* + *L. plantarum* 2C12
- 3) Formula 3: *L. bulgaricus* + *S. thermophilus* + *L. fermentum* 2B4
- 4) Formula 4: *L. bulgaricus* + *S. thermophilus* + *L. plantarum* 2C12 + *L. fermentum* 2B4

Proses pembuatan yogurt diawali dengan melarutkan gula pasir 5%, FOS 5%, dan susu skim sehingga diperoleh total padatan yogurt 22%. Setelah itu, campuran bahan dipanaskan pada suhu 85°C selama 30 menit (Ansori *et al.* 1992), didinginkan hingga suhu 37°C, diinokulasi starter (2%), lalu diaduk hingga merata. Inkubasi dilakukan dalam inkubator dengan suhu 37°C selama semalam (Suliantari *et al.* 2009). Selanjutnya, yogurt tersebut disimpan di dalam refrigerator.

- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
  2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

### 3.2.2 Penentuan Formula Yogurt Sinbiotik Terbaik

Parameter yang digunakan untuk menentukan formula yogurt terbaik adalah dengan mengetahui aktivitas antimikrobanya terhadap bakteri patogen seperti *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC), nilai pH, dan konsistensi penampakan yogurt.

#### 3.2.2.1 Pemiakan Kultur *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC)

Kultur bakteri uji (*Enteropathogenic Escherichia coli* atau EPEC) yang telah ditumbuhkan dalam media *Nutrient Agar* (NA) berumur 24 jam disegarkan kembali dengan menumbuhkannya ke dalam media *Nutrient Broth* (NB) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

#### 3.2.2.2 Pengujian Aktivitas Antibakteri dari Yogurt Sinbiotik (Davidson *et al.* 2005)

Pengujian aktivitas antibakteri dari yogurt sinbiotik dilakukan dengan melihat efek penghambatan yogurt terhadap bakteri patogen EPEC. Pengujian ini dilakukan dengan metode kontak yaitu melihat penurunan jumlah bakteri EPEC setelah dikontakkan dengan yogurt.

Untuk mengetahui jumlah awal bakteri EPEC (1%), dilakukan pemupukan pada media EMBA (*Eosin Methylene Blue Agar*) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Untuk mengetahui efektivitas penghambatan formula yogurt, bakteri EPEC dikontakkan dengan masing-masing formula yogurt dan diinkubasikan selama dua, empat, dan enam jam pada suhu 37°C. Penentuan lama waktu kontak tersebut didasarkan pada kurva pertumbuhan EPEC dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Quigley (2008) di mana waktu dua, empat, dan enam jam tersebut merupakan waktu bakteri *E. coli* berada pada fase log. Setelah dikontakkan selama 2, 4, dan 6 jam, dilakukan pemupukan terhadap masing-masing yogurt pada media EMBA, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah selesai diinkubasi, dilakukan penghitungan sel untuk mengetahui jumlah bakteri EPEC akhir. Efek penghambatan masing-masing formula yogurt tersebut terhadap EPEC ditunjukkan dengan penurunan jumlah bakteri EPEC (dengan mengurangi jumlah EPEC awal dengan EPEC akhir). Selanjutnya, yogurt yang memberikan nilai penghambatan tertinggi merupakan yogurt formula terbaik yang kemudian digunakan dalam penelitian selanjutnya.

### 3.2.3 Penambahan Bahan Penstabil pada Formula Yogurt Sinbiotik Terbaik

Penambahan bahan penstabil dilakukan terhadap formula yogurt sinbiotik terbaik dari tahap penelitian sebelumnya. Penambahan bahan penstabil ini dilakukan dengan tujuh formula sampel yang meliputi tiga formula dengan penambahan bahan penstabil *carboximethyl cellulose* (CMC), tiga formula dengan bahan penstabil pati jagung, dan satu formula tanpa penambahan bahan penstabil sebagai kontrol. Variasi konsentrasi CMC yang digunakan adalah 0.1%, 0.15%, dan 0.2%, dan variasi konsentrasi yang digunakan untuk pati jagung adalah 1.5%, 1.75%, dan 2.0%. Penambahan bahan penstabil dengan konsentrasi yang sesuai ditentukan melalui parameter sensori (deskriptif) yang meliputi warna, rasa, aroma, tekstur, dan jumlah *whey*, serta parameter fisik dan kimia yang meliputi pH, viskositas, dan total asam tertitrasi.

### 3.2.4 Penambahan Flavor pada Formula Yogurt Sinbiotik Terbaik

Penambahan flavor dilakukan terhadap formula yogurt sinbiotik terbaik dengan penambahan bahan penstabil dengan konsentrasi yang sesuai dari tahap sebelumnya. Jenis flavor yang ditambahkan adalah flavor vanila yang berbentuk serbuk dan ekstrak buah stroberi yang didapat dari

- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
  2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

hasil ekstraksi buah stroberi dengan air (perbandingan 1:1) dan kemudian disaring. Yogurt sinbiotik diberi penambahan flavor vanila sebanyak 0.1% dan 0.2%, serta ekstrak stroberi sebanyak 1% dan 2%. Konsentrasi flavor terbaik didapatkan dengan melakukan uji organoleptik (uji rating dan rangking hedonik) pada yogurt dengan penambahan flavor tersebut sehingga diperoleh yogurt dengan flavor yang paling banyak disukai.

### 3.2.5 Uji Sensori Yogurt Sinbiotik

Uji sensori yang dilakukan adalah uji rating dan rangking hedonik terhadap lima formula yogurt sinbiotik dengan penambahan flavor oleh 30 panelis tidak terlatih. Parameter mutu yang diuji meliputi warna, aroma, tekstur, rasa dan penilaian secara keseluruhan (*overall*). Pemberian skor pada uji rating hedonik menggunakan sistem skala kategori yaitu sangat tidak suka (1), tidak suka (2), agak tidak suka (3), netral (4), agak suka (5), suka (6), dan sangat suka (7). Dalam uji rangking hedonik, angka satu (1) menyatakan tingkat penerimaan tertinggi terhadap produk dan angka selanjutnya menyatakan penerimaan yang semakin rendah. Data dari uji rating hedonik diolah dengan analisis ragam (ANOVA) yang dilanjutkan dengan uji Duncan apabila hasil yang diperoleh berbeda nyata antar sampel.

### 3.2.6 Uji Stabilitas Yogurt Sinbiotik Selama Penyimpanan

Uji stabilitas selama penyimpanan dilakukan terhadap yogurt sinbiotik terbaik dari hasil uji sensori. Produk disimpan dalam refrigerator dengan suhu sekitar 10°C. Pengamatan dilakukan setiap 3 hari sekali selama 15 hari untuk mengetahui perubahan yang terjadi selama masa penyimpanan. Parameter yang diamati selama penyimpanan meliputi parameter nilai pH, total asam tertitrasi (TAT), viskositas, viabilitas BAL dan pertumbuhan kontaminan kapang khamir.

### 3.2.7 Analisis Fisik

#### 3.2.7.1 Pengukuran pH

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan alat pH-meter. Sebelum digunakan alat distandarisasi terlebih dahulu menggunakan larutan buffer pH 4 dan pH 7. Sekitar 25 ml sampel dimasukkan ke dalam gelas piala. Elektroda pH-meter dicelupkan ke dalam sampel, kemudian dilakukan pembacaan pH sampel setelah dicapai nilai yang tetap.

#### 3.2.7.2 Viskositas

Pengukuran viskositas yogurt menggunakan alat *viscometer Brookfield*. Sebanyak 200 ml sampel dimasukkan ke dalam wadah. Rotor dipasang pada alat kemudian dicelupkan ke dalam sampel. Penggunaan *spindle* dan kecepatan rotor disesuaikan dengan tingkat kekentalan sampel. Selama rotor berputar, jarum penunjuk akan bergerak sampai diperoleh nilai viskositas sampel. Pembacaan nilai viskositas sampel dilakukan setelah jarum stabil.

### 3.2.8 Analisis Kimia

#### 3.2.8.1 Total Asam Tertitrasi (AOAC 1995)

Sebanyak 10 ml sampel dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan 3 tetes indikator fenoltalein 1%. Sampel dititrasi dengan larutan NaOH 0.1 N yang telah distandarisasi

sampai terbentuk warna merah muda. Total asam tertitiasi dinyatakan sebagai persen asam laktat (BM asam laktat = 90).

$$\% \text{ asam laktat} = \frac{V \text{ NaOH} \times N \text{ NaOH} \times 1/10 \times 90}{V \text{ sampel}}$$

### 3.2.8.2 Kadar Air (AOAC 1995)

Pengukuran kadar air dilakukan dengan menggunakan metode oven vakum. Pengukuran kadar air diawali dengan mengeringkan cawan alumunium pada suhu 100<sup>0</sup>C selama 15 menit, kemudian dikeringkan dalam desikator selama 10 menit. Cawan alumunium kemudian ditimbang dengan menggunakan neraca analitik (a gram). Sekitar 2-10 gram (x gram) sampel ditimbang dalam cawan alumunium yang telah diketahui bobot kosongnya. Kemudian dikeringkan dalam oven vakum pada suhu 70<sup>0</sup>C, 25 mmHg dan ditimbang sampai diperoleh bobot konstan dari cawan dan sampel kering (y gram).

$$\text{kadar air (\% b.b)} = \frac{x-(y-a)}{x} \times 100$$

### 3.2.8.3 Kadar Abu (AOAC 1995)

Pengukuran kadar abu dilakukan dengan metode pengabuan kering menggunakan alat tanur. Cawan porselen dikeringkan dengan tanur pada suhu 500<sup>0</sup>C selama satu jam, kemudian didinginkan dalam desikator. Cawan porselen kemudian ditimbang dengan timbangan analitik (a gram). Sebanyak 2 gram sampel (w gram) ditimbang dalam cawan porselen yang telah diketahui bobot kosongnya. Sampel diuapkan di atas *hot plate* selama 30-60 menit sampai kering. Kemudian dimasukkan ke dalam tanur bersuhu 600<sup>0</sup>C selama 2 jam, kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang (x gram).

$$\text{kadar abu (\% b.b)} = \frac{x-a}{w} \times 100$$

### 3.2.8.4 Kadar Protein Metode Kjeldahl (AOAC 1995)

Sebanyak 3 gram sampel ditimbang menggunakan neraca analitik lalu ditempatkan ke dalam labu Kjeldahl. Kemudian ditambahkan 1.9 ± 0.1 gram K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 40 ± 10 mg HgO, 2.0 ± 0.1 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dan beberapa buah batu didih. Sampel dididihkan selama 1-1.5 jam sampai cairan menjadi jernih. Setelah cairan menjadi jernih. Selanjutnya, cairan didinginkan dan ditambahkan sejumlah kecil air secara perlahan-lahan, kemudian didinginkan kembali. Isi labu tersebut dipindahkan ke dalam alat destilasi. Labu dicuci dan dibilas 5-6 kali dengan 1-2 ml air, air cucian dipindahkan ke dalam alat destilasi.

Erlenmeyer 125 ml yang berisi 5 ml larutan H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> dan 2-4 tetes indikator (campuran 2 bagian metal merah 0.2% dalam alkohol dan 1 bagian metilen biru 0.2% dalam alkohol) diletakkan di bawah kondensor. Ujung tabung kondensor harus terendam di dalam larutan H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. Kemudian ditambahkan 8-10 ml larutan NaOH dan dilakukan destilasi sampai tertampung kira-kira 15 ml destilat dalam erlenmeyer. Tabung kondensor dibilas dengan air dan bilasan ditampung dalam erlenmeyer yang sama. Isi erlenmeyer diencerkan sampai kira-kira 50 ml kemudian dititiasi dengan HCl 0.02 N sampai terjadi perubahan warna menjadi abu-abu. Prosedur yang sama juga dilakukan terhadap blanko.

## Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

$$\% N = \frac{(\text{ml HCl}-\text{ml blanko}) \times N \text{ HCl} \times 14.007 \times 100\%}{\text{mg sampel}}$$

$$\% \text{ protein} = \% N \times \text{faktor konversi (6.38)}$$

### 3.2.8.5 Kadar Lemak (AOAC 1995)

Penentuan kadar lemak dilakukan berdasarkan metode ekstraksi soxhlet. Prinsip dari metode tersebut yaitu mengekstrak lemak dari bahan dengan pelarut organik non polar seperti heksana pada titik didih pelarut sampai pelarut berwarna jernih. Jumlah lemak dalam contoh diketahui dengan menimbang lemak setelah pelarut diuapkan. Labu lemak dikeringkan di dalam oven, didinginkan dalam desikator dan ditimbang (b gram). Contoh ditimbang sebanyak 5 gram (a gram), dibungkus dengan kertas saring dan ditutup dengan kapas bebas lemak. Kertas saring yang berisi contoh diletakkan ke dalam alat ekstraksi soxhlet yang dirangkai dengan kondensor. Pelarut heksana dimasukkan secukupnya ke dalam labu lemak kemudian dilakukan refluks minimal selama 5 jam. Labu lemak akan berisi lemak hasil ekstraksi kemudian dipanaskan pada oven 100-105 °C selama 30 menit atau sampai dengan pelarut pada labu lemak menguap semua. Labu lemak didinginkan dalam desikator dan ditimbang beratnya (c gram).

$$\text{kadar lemak (\% b.b)} = \frac{c-b}{a} \times 100$$

### 3.2.8.6 Kadar Karbohidrat (Metode by difference)

$$\text{Kadar karbohidrat (\%b.b)} = 100 - (\% \text{air} + \% \text{abu} + \% \text{protein} + \% \text{lemak})$$

### 3.2.8.7 Kadar Mineral (AOAC 1995)

Analisis kadar mineral dilakukan menggunakan instrumen *Atomic Absorption Spectrofotometer* (AAS). Metode AAS berdasarkan pada prinsip pengukuran sinar yang diserap oleh atom dari unsur-unsur. Setiap jenis atom memiliki nilai absorbansi yang khas yang dapat diukur pada panjang gelombang tertentu. Jenis mineral yang dianalisis dalam penelitian ini adalah timbal (Pb), tembaga (Cu), timah (Sn), raksa (Hg), dan arsen (As). Untuk dapat dianalisis dengan AAS, contoh harus terbebas dari bahan-bahan organik. Contoh harus dibuat larutan abu dengan cara menambahkan 40-50 HCl encer pada contoh yang telah diabukan dalam cawan. Kemudian dipanaskan dengan penangas air selama 30 menit dan ditutup dengan gelas arloji. Cawan contoh dibilas kembali dengan HCl encer dan dipanaskan kembali selama 30 menit. Selanjutnya, pada cawan ditambahkan 10 ml HCl dan akuades. Larutan pada cawan disaring menggunakan kertas saring dan ditampung dalam labu takar 100 ml. Residu yang tertinggal di kertas saring dibilas dengan HCl encer. Larutan abu dalam labu takar ditepatkan hingga 100 ml dengan akuades. Untuk mengukur kadar mineral yang diinginkan diperlukan kurva standar yang dibuat dari seri larutan mineral standar.

Sebelum pengukuran absorbansi menggunakan instrument AAS dimulai, disiapkan terlebih dahulu lampu elemen mineral yang akan diukur dan larutan standar yang sesuai yang akan digunakan, serta selang inlet contoh dicelupkan dalam air demineral. Nilai absorbansi untuk setiap konsentrasi larutan contoh dan standar dicatat, kemudian konsentrasi unsur mineral contoh dapat ditentukan dengan menggunakan plot kurva standar.

- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
  2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

### 3.2.9 Analisis Mikrobiologi

#### 3.2.9.1 Total BAL dan Kapang-Khamir (Fardiaz 1987)

Uji total BAL dan kapang-khamir dilakukan dengan metode agar tuang. Sebanyak 10 ml sampel diencerkan dalam 90 ml larutan pengencer dan kemudian diencerkan hingga pengenceran  $10^9$ . Untuk uji total BAL, pemupukan dilakukan duplo dari tingkat pengenceran  $10^7$  sampai  $10^{10}$  dengan cara memipet 1 ml sampel yang telah diencerkan ke dalam cawan petri steril, sedangkan untuk uji total kapang-khamir, pemupukan dilakukan dari mulai pengenceran  $10^1$  sampai  $10^3$ . Setelah itu, dilakukan penambahan media sebanyak 15-20 ml pada setiap cawan petri. Media yang digunakan untuk uji total BAL adalah MRSA, sedangkan untuk uji total kapang-khamir adalah *acidified potato dextrose agar* (APDA). Cawan petri digoyangkan secara mendatar agar sampel menyebar rata. Setelah agar membeku, diinkubasi dengan posisi terbalik selama 2-3 hari pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  untuk uji total BAL dan pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  untuk uji total kapang-khamir. Jumlah koloni yang tumbuh dihitung dengan menggunakan metode SPC (cfu/ml).

#### 3.2.9.2 Total Koliform (BAM 2002)

Sebanyak 50 gram atau 50 ml sampel ditambahkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi 450 ml larutan *butterfield's phosphate* dan dihomogenkan. Tahap pengenceran dilakukan hingga mendapatkan pengenceran  $10^3$  atau sesuai kebutuhan. Sebanyak 1 ml larutan contoh dari masing-masing hasil pengenceran dimasukkan ke dalam media LST *broth* kombinasi 3 yang telah dilengkapi tabung Durham. Tabung LST kemudian diinkubasikan pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$  selama 24 – 48 jam. Tabung positif ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung Durham.

Dari hasil tersebut selanjutnya dilakukan uji pendugaan koliform fekal. Dari setiap tabung LST positif, sebanyak satu *loop* larutan dipindahkan ke tabung EC *broth* yang telah dilengkapi tabung Durham dan kemudian diinkubasikan pada suhu  $45,5^{\circ}\text{C}$  selama 24 – 48 jam. Pada setiap tabung EC *broth* yang muncul gas, diambil satu *loop* cairan dan digoreskan ke cawan petri yang berisi media LEMB (*Levin's Eosine-Methylene Blue*) agar, lalu diinkubasikan selama 18 – 24 jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ . Amati adanya bakteri koliform fekal yang berbentuk koloni berwarna gelap dengan atau tanpa kilau hijau metalik.

Identifikasi terhadap koliform dilakukan melalui uji reaksi IMViC sebagai berikut :

- a. *Produksi Indole*  
Koloni koliform diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi TB (*Tryptone Broth*) kemudian diinkubasi selama 24 – 48 jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ . Tes terhadap keberadaan *indole* dilakukan dengan menambahkan 0,2 – 0,3 ml reagen Kovacs setelah inkubasi selesai. Reaksi positif ditandai dengan timbulnya warna merah pada permukaan media.
- b. *Methyl Red*  
Koloni koliform diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi VP *broth* kemudian diinkubasi selama 4 – 5 hari pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ . Setelah inkubasi ditambahkan dengan lima tetes *methyl red*. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna merah, sedangkan hasil negatif berwarna kuning.
- c. *Voges-Proskauer*  
Koloni koliform diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi VP *broth* kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ . Selesai inkubasi, sebanyak 1 ml larutan dipipet ke dalam tabung lalu ditambahkan 0,6 ml  $\alpha$ -naphthol dan 0,2 ml 40% KOH kemudian dikocok. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah muda.

## Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

d. *Kocer Citrate* (KC)

Koloni koliform diambil dan dimasukkan ke tabung reaksi yang berisi media *KC broth*. Media KC diinkubasikan selama 96 jam pada suhu 35°C. Reaksi positif ditandai dengan munculnya kekeruhan.

Interpretasi uji IMViC adalah positif *E. coli* bila menghasilkan kombinasi +++ (tipe 1), atau +-- (tipe 2).

### 3.2.9.3 Presumtif Salmonella (BAM 2007)

Sebanyak 25 gram atau 25 ml sampel dimasukkan ke Erlenmeyer yang telah berisi 225 ml media *Lactose Broth* (LB). Erlenmeyer digoyang-goyangkan sehingga sampel tercampur dengan merata. Selanjutnya LB diinkubasikan pada suhu 35°C selama 24 jam.

Sebanyak 1 ml larutan dipindahkan dari LB ke 10 ml *tetrathionate* (TT) *broth*. Media TT diinkubasikan pada suhu 43°C selama 24 jam. Selesai inkubasi, media divorteks kemudian digoreskan masing-masing ke *bismuth sulfite agar* (BSA), *xylose lysine desoxycholate agar* (XLDA), dan *hektoen enteric agar* (HEA). Media agar tersebut diinkubasikan pada suhu 35°C selama 24 jam. Koloni tipikal Salmonella yang muncul diambil dua atau lebih dengan ciri-ciri sebagai berikut:

- a. HEA. Koloni berwarna biru kehijau-hijauan atau biru dengan atau tanpa pusat yang gelap. Banyak kultur Salmonella yang tampak sebagai koloni yang lebar, pusat yang hitam mengkilat atau tampak hitam menyeluruh.
- b. XLDA. Koloni berwarna merah muda dengan atau tanpa pusat gelap. Banyak kultur Salmonella yang tampak sebagai koloni yang lebar, pusat yang hitam mengkilat atau tampak hitam menyeluruh.
- c. BSA. Koloni berwarna coklat, abu-abu, atau hitam, kadang-kadang terlihat warna metalik. Awalnya media BSA berwarna coklat, namun lama kelamaan berubah menjadi warna hitam ketika waktu inkubasi ditambah sehingga menghasilkan efek halo di sekitar koloni.

Jika koloni tipikal Salmonella tidak tumbuh, maka koloni atipikal Salmonella diambil dengan ciri-ciri sebagai berikut:

- a. HEA dan XLDA. Koloni atipikal Salmonella menghasilkan warna kuning dengan atau tanpa pusat hitam.
- b. BSA. Beberapa koloni Salmonella atipikal menghasilkan warna hijau dengan atau tanpa warna gelap di sekeliling koloni.

Cuplikan koloni tipikal Salmonella diinokulasikan pada media agar miring *triple sugar iron agar* (TSIA) dan *lysine iron agar* (LIA). Media TSIA dan LIA diinkubasikan pada suhu 35°C selama 24 jam. Salmonella tipikal akan menghasilkan warna merah di atas dan kuning di bagian bawah media TSIA dengan atau tanpa produksi H<sub>2</sub>S (warna hitam). Adapun pada media LIA, Salmonella tipikal menghasilkan warna ungu di bagian bawah.