

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Pangan dan laboratorium Produksi Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta dan Laboratorium Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian Universitas Gadjah Mada. Penelitian dilakukan selama 6 bulan, dimulai dari bulan Februari sampai dengan bulan Agustus 2016.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan untuk produksi bakteriosin dan asam laktat serta supernatan pada penelitian ini diantaranya adalah rak rabung reaksi, tabung reaksi, gelas ukur, pipet, mikro pipet, tabung *Corning*, pro pipet, sentrifugator, inkubator, *refrigerator*, tabung Falcon, cawan petri, stirrer, ose, oven, autoklaf, bunsen, pH meter, vortex, dan *laminar air flow* (ESCO). Alat-alat yang digunakan untuk isolasi *Lactobacillus* sp. yaitu inkubator, tabung reaksi, cawan petri, rak tabung reaksi, bunsen, Erlenmeyer, dan jarum ose. Alat-alat untuk mengidentifikasi bakteri *Lactobacillus* sp. yaitu ada gelas objek, jarum ose, mikroskop, jarum enten, Erlenmeyer, piper ukur, tabung reaksi, cawan petri, bunsen, dan inkubator. Alat-alat yang digunakan untuk pembuatan stok bakteri *Lactobacillus* sp. yaitu *freezer* dan tabung *eppendorf*.

Alat-alat yang digunakan untuk membuat mie basah adalah *slitter*, baskom kecil, nampan plastik, mangkok plastik, kompor gas, panci, dan wajan. Alat untuk uji proksimat adalah labu kjeldahl, (Biobase FH1000x), *moisture balance*

(Phoenix Instrument BM-65), dan timbangan digital. Alat untuk analisis fisik mie basah yaitu pH meter, gelas ukur, timbangan digital, *texture analyzer*.

Bahan-bahan yang digunakan untuk isolasi, identifikasi, dan pembuatan stok bakteri *Lactobacillus* sp. yaitu asinan bogor, medium MRSB (*De Man Rogosa and Sharpe broth*), CaCO_3 1%, akuades, alkohol 70%, larutan H_2O_2 , medium nitrat cair, larutan Kristal ungu, larutan iodin Gram, alkohol 95%, *aluminium foil* dan larutan safranin. Bahan-bahan yang digunakan untuk memproduksi bakteriosin dan asam laktat yaitu : MRSB, membran saring Sartorius AG 0,22 dan 0,45 μm , kapas, plastik bening, NaOH 4N, HCl pekat, dan HCL 4N. Bahan-bahan yang digunakan untuk pembuatan mie basah adalah air, garam dapur, tepung terigu Segitiga Biru, minyak goreng, soda kue, dan kuning telur.

Bahan-bahan yang digunakan untuk uji proksimat yaitu K_2SO_4 , Se, H_2SO_4 pekat, H_2O_2 , dan akuades, plastik bening. Bahan-bahan yang digunakan untuk analisis mikrobiologi yaitu medium PCA (*Plate Count Agar*), PDA (*Potato Dextrose Agar*), akuades, dan kertas payung. Mie basah yang digunakan pada penelitian ini dibuat sendiri dalam skala laboratorium di laboratorium Produksi Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta.

C. Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap faktorial dengan pola 4 x 4 dan menggunakan dua faktor yaitu faktor perbedaan penambahan biopreservatif (bakteriosin, tanpa bakteriosin dan asam laktat, asam laktat, dan gabungan keduanya dari bakteriosin dan asam laktat (supernatan) dan faktor lama penyimpanan (0, 1, 2, dan 3 hari) pada suhu kamar (27°C). Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini dijabarkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Rancangan Percobaan Bakteriosin, Asam Laktat, Kontrol, dan Supernatan dari *Lactobacillus* sp. sebagai Biopreservatif pada Mie Basah pada Suhu Kamar 27°C

Biopreservatif (B)	Ulangan	Lama Penyimpanan			
		0	1	2	3
Kontrol	1	BIT0	BIT1	BIT2	BIT3
	2	BIT0	BIT1	BIT2	BIT3
	3	BIT0	BIT1	BIT2	BIT3
Bakteriosin	1	B2T0	B2T1	B2T2	B2T3
	2	B2T0	B2T1	B2T2	B2T3
	3	B2T0	B2T1	B2T2	B2T3
Asam laktat	1	B3T0	B3T1	B3T2	B3T3
	2	B3T0	B3T1	B3T2	B3T3
	3	B3T0	B3T1	B3T2	B3T3
Supernatan	1	B4T0	B4T1	B4T2	B4T3
	2	B4T0	B4T1	B4T2	B4T3
	3	B4T0	B4T1	B4T2	B4T3

Keterangan :

B = Biopreservatif dari *Lactobacillus* sp.

T = Lama penyimpanan Mie basah

D. Tahapan Penelitian

Penelitian ini dibagi dalam lima tahapan utama. Tahapan pertama adalah isolasi bakteri *Lactobacillus* sp. dari asinan bogor dan karakterisasi dari *Lactobacillus* sp. Tahapan kedua adalah ekstraksi bakteriosin, asam laktat, dan pembuatan supernatan dari *Lactobacillus* sp. Tahapan ketiga adalah pembuatan mie basah. Tahapan keempat merupakan penelitian utama yang akan dilakukan, yaitu, pengawetan mie basah dengan bakteriosin, asam laktat, dan supernatan dari *Lactobacillus* sp. Tahapan terakhir adalah uji parameter kualitas mie basah secara mikrobiologis, organoleptik, dan proksimat.

1. Isolasi Bakteri *Lactobacillus* sp. dari Asinan Bogor (Budianto, 2015 dengan modifikasi)

Asinan Bogor diambil airnya sebanyak satu ose dan langsung dilakukan isolasi dengan metode *streak plate*. Kultur tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam sampai terbentuk zona bening di sekitar koloni bakteri tunggal. Kultur dimurnikan pada MRS agar secara *streak plate* dan diinkubasi dengan suhu dan waktu yang sama. Kultur yang sudah murni disimpan pada MRS agar miring pada suhu 4-10°C dalam kulkas.

2. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat (BAL)

- a. Pengecatan Gram Bakteri *Lactobacillus* sp. (Sacher dan McPherson, 2002)

Gelas benda dibersihkan dengan alkohol 70%. Biakan terduga *Lactobacillus* sp. diambil 1 ose (secara aseptis) lalu dioleskan di atas gelas benda dan difiksasi. Gelas benda ditetesi cat Gram A, didiamkan

selama 1 menit, lalu dibilas, dan dikeringkan. Gelas benda ditetesi cat Gram B, didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dan dikeringkan. Gelas benda ditetesi cat Gram C, didiamkan selama 30 detik, lalu dibilas dan dikeringkan. Gelas benda ditetesi cat Gram D, didiamkan selama 2 menit, lalu dibilas dan dikeringkan.

b. Uji Katalase Bakteri *Lactobacillus* sp. (Hardiningsih dkk., 2006)

Satu tetes larutan 3% H₂O₂ diteteskan di atas kultur terduga *Lactobacillus* sp. Katalase positif ditandai dengan terbentuknya gelembung udara. Reaksi katalase negatif apabila saat diteteskan pada sel bakteri namun tidak menunjukkan adanya busa atau buih setelah 1 menit.

c. Uji Motilitas Bakteri *Lactobacillus* sp. (Lindayani dan Hartayanie, 2012)

Isolat bakteri asam laktat diambil secara aseptis dengan jarum ose yang lurus bagian ujungnya (jarum enten), kemudian isolat bakteri ditusukkan ke dalam MRS agar lunak tegak (konsentrasi agar pada MRS diturunkan sampai 0,5%). Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 48 jam. Isolat non motil hanya tumbuh pada sekitar tusukan inokulasi sedangkan isolat motil akan tumbuh menyebar.

d. Uji Reduksi Nitrat (Hadioetomo, 1993 dengan modifikasi)

Isolat BAL diambil secara aseptis dengan jarum ose dan dimasukkan ke dalam medium *nitrate broth* sebanyak 1 ose. Lalu isolat BAL yang telah dimasukkan ke dalam medium *nitrate broth* diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Setelah itu, *nitrate broth* bersama isolat

BAL diteteskan sebanyak 1 ml atau sebanyak 20 tetes Reagen A dan dilanjutkan langsung dengan penambahan Reagen B dengan jumlah atau volume yang sama.

Hasil positif dari reduksi nitrat adalah terbentuknya warna merah tua pada larutan. Jika tidak terbentuk warna merah tua selama 5 menit akan ditambahkan bubuk seng dan didiamkan sebentar. Jika larutan terbentuk warna merah tua kembali berarti hasil uji negatif, sedangkan jika tidak terbentuk warna merah tua sama sekali berarti hasil uji positif.

e. Uji Penggunaan Oksigen (Stamer, 1979 dengan modifikasi)

Isolat BAL diambil secara aseptis dengan jarum enten, lalu ditusukkan secara tegak pada bagian tengah dan dasar pada medium tegak MRS agar dan dilakukan inkubasi 37°C selama 48 jam. Kemudian diamati uji penggunaan oksidennya. Jika bakteri aerob, biakan hanya akan ada di atas permukaan agar. Sedangkan anaerob kebalikannya, hanya berada di dasar agar. Untuk bakteri anaerob fakultatif biakan ada di permukaan dan di tengah agar.

3. Produksi Ekstrak Bakteriosin, Asam Laktat, dan Supernatan

a. Produksi Ekstrak Bakteriosin (Usmiati dan Rahayu, 2011 dengan modifikasi)

Sebanyak 1 ml atau 1 ose biakan bakteri asam laktat (BAL) dimasukkan ke dalam 10 ml medium MRS *broth*. Selanjutnya biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah dilakukan inkubasi, biakan dimasukkan ke dalam gelas Erlenmeyer yang berisi MRS *broth*

sebanyak 100 ml dan dilakukan inkubasi kembali dengan waktu dan suhu yang sama. Setelah itu, biakan dalam gelas Erlenmeyer kembali diinkubasi dalam *shaker* inkubator selama 9 jam pada suhu 37°C.

Langkah selanjutnya adalah, kultur BAL dinetralkan dengan larutan NaOH 4N hingga pH biakan berada di kisaran netral yaitu pH 7. Setelah itu proses selanjutnya, kultur BAL di dalam gelas Erlenmeyer dipanaskan dengan kompor pada suhu 80°C selama 15 menit lamanya di atas wajan yang berisi air. Lalu biakan kembali diinkubasi pada suhu 4°C di kulkas selama 24 jam lamanya. Selanjutnya, kultur dipindahkan ke dalam tabung *corning* untuk proses sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 4500 rpm.

Kultur BAL diasamkan kembali dengan larutan HCL 4N sampai berada pada kisaran pH 4. Selanjutnya, kultur kembali diinkubasi pada suhu 4°C selama 24 jam. Proses selanjutnya adalah kultur dipindahkan ke dalam tabung *corning* untuk proses sentrifugasi kembali selama 15 menit dengan kecepatan 4500 rpm. Langkah selanjutnya adalah supernatan hasil sentrifugasi disaring dengan membrane *miliphore* 0,22 µm dan hasil penyaringan inilah yang disebut dengan bakteriosin.

b. Produksi Asam Laktat (Deegan dkk., 2005 ; Ogunbanwo, 2003)

Lactobacillus sp. dikultur dalam media MRS *broth* pada suhu 37°C selama 20 jam. Kultur disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 15 menit pada suhu 40°C, kemudian disaring dengan membran *miliphore*

ukuran 0,45 μm . Filtrat diukur pH nya menggunakan pH meter, kemudian filtrat dipapar di bawah sinar UV selama 40 menit.

c. Produksi Supernatan Isolat BAL Terpilih (Savitri, 2009)

Bakteri asam laktat yang telah disegarkan dihomogenisasi kemudian diambil sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam MRS *broth*, lalu dihomogenisasi dan diinkubasi selama 20 jam dalam suhu 37°C. Setelah 20 jam, isolat BAL terpilih dimasukkan ke dalam tabung *Corning* kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 20 menit. Setelah itu, supernatan tersebut disaring dengan penyaring *milipore* 0,22 μm ke dalam wadah tabung Schott steril. Supernatan bebas sel yang sudah disaring dinamakan substrat antimikrobia.

4. Pembuatan Mie Basah (Rustandi, 2011 dengan modifikasi)

Tepung terigu, soda kue, garam dapur dicampur terlebih dahulu menjadi satu hingga homogen, lalu garam dapur, dan kuning telur ditambahkan ke dalamnya dan diaduk-aduk hingga adonan menjadi kalis. Adonan yang telah kalis didiamkan dalam wadah tertutup yang ditutup dengan plastik selama 10 menit. Adonan yang telah kalis dan telah didiamkan selama 10 menit selanjutnya dibentuk menjadi lembaran (dilakukan pengepresan).

Adonan dipipihkan dan dilipat berulang-ulang lalu dimasukkan ke dalam *slitter* yang telah diatur sehingga adonan menjadi berbentuk lembaran. Setelah dipres menjadi lembaran, adonan diistirahatkan selama 10 menit sebelum ditiriskan dan dipotong. Selanjutnya lembaran adonan ini dimasukkan ke dalam

slitter lagi hingga beberapa kali untuk ditipiskan sampai diperoleh lembaran dengan ketebalan 1-2 cm.

Setelah itu, *slitter* diatur ke mode pemotong lembaran adonan ditaburi sedikit tepung tapioka secara merata dan dimasukkan ke dalam *slitter*, sehingga lembaran adonan terpotong membentuk untaian-untaian mie. Untaian-untaian mie ini kemudian diolesi dengan minyak goreng lalu dipisah-pisahkan agar tidak lengket satu sama lain. Untaian-untaian mie direbus kurang lebih selama 15 menit dan dengan api yang besar agar mie tidak menjadi lembek. Mie hasil perebusan kemudian ditiriskan dan didinginkan.

5. Penelitian Utama

Mie basah dipotong seberat 5 gram, kemudian kelompok pertama mie basah langsung disimpan pada suhu ruang (27°C). Pengamatan kualitas mie basah mulai dari kelompok pertama sampai keempat baik itu secara mikrobiologis, uji proksimat (kadar air, pH), uji tekstur, dan uji organoleptik dilakukan pada hari ke- 0, 1, 2 dan 3. Uji proksimat (uji protein) dilakukan pada hari 0 dan 2 saja.

Selanjutnya pada kelompok kedua mie basah dicelupkan dalam bakteriosin (± 50 ml per sampel), dan direndam selama 5 menit, dikemas dengan plastik *polyethylene* lalu mie basah disimpan pada suhu ruang (27°C). Kelompok ketiga mie basah dicelupkan dalam asam laktat (± 50 ml per sampel), dan direndam selama 5 menit, dikemas dengan plastik *polyethylene* lalu mie basah disimpan pada suhu ruang (27°C). Kelompok keempat mie basah

dicelupkan dalam supernatan (± 50 ml per sampel), dan direndam selama 5 menit, dikemas dengan plastik *polyethylene* lalu mie basah disimpan pada suhu ruang (27°C).

6. Uji Kualitas Mie Basah

a. Penghitungan Angka Lempeng Total (Jutono dkk., 1980 ; Fardiaz, 1993 dengan modifikasi)

Analisis total mikrobial dilakukan dengan metode Angka Lempeng Total (ALT). Sebanyak 5 gram sampel mie basah yang direndam dengan bakteriosin dihancurkan dengan menggunakan lumpang dan alu, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 45 ml larutan akuades steril. Campuran divortex, diambil 1 ml kemudian dan dimasukkan dalam tabung reaksi berisi 9 ml larutan akuades steril sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2} . Dengan cara yang sama dilakukan hingga 10^{-5} untuk hari pengujian hari ke 0 dan hari ke 3.

Masing-masing pengenceran diambil 1 ml suspensi sampel secara aseptis dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril. Selanjutnya ditambahkan medium *Plate Count Agar* (PCA) steril. Setelah medium membeku, cawan petri diinkubasi dengan posisi terbalik pada inkubator dengan suhu 37°C selama 48 jam. Penghitungan total mikrobial dilakukan menggunakan metode ALT. Langkah-langkah di atas diulangi untuk tahu yang direndam dengan asam laktat, supernatan, dan kontrol.

Penghitungan total mikrobia dilakukan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) dengan rumus :

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n1) + (0,1 \times n2)] \times d}$$

Keterangan :

- N : Jumlah koloni setiap ml atau setiap gram sampel
- ΣC : Total koloni dari seluruh cawan yang dihitung
- n1 : Jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung
- n2 : Jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung
- d : pengenceran pertama yang dihitung

b. Uji Kapang (BPOM, 2006 dengan modifikasi)

Sampel diambil sebanyak 25 gram kemudian digerus dengan alat penggerus di dalam mortar. Lalu sampel yang sudah halus dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditambahkan sebanyak 225 ml akuades, lalu dimohogenkan (merupakan pengenceran 10^{-1}). Langkah selanjutnya dilakukan pengenceran berseri sampai 10^{-5} . Setelah itu, dari masing masing pengenceran diambil sebanyak 1 ml lalu dituang pada permukaan medium PDA (*Potato Dextrose Agar*) dan dibuat duplo dan di *pour plate*.

Langkah selanjutnya, seluruh cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C dan diamati pada kedua. Koloni kapang yang tumbuh akan berbentuk seperti kapas atau bulat dengan berbagai warna, dan permukaannya kasar. Sedangkan untuk koloni khamir memiliki bentuk bulat kecil putih, hampir menyerupai bakteri.

Jumlah koloni kapang yang tumbuh diamati dan dihitung dengan rumus :

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n1) + (0,1 \times n2)] \times d}$$

Keterangan :

- N : Jumlah koloni setiap ml atau setiap gram sampel
 $\sum C$: Total koloni dari seluruh cawan yang dihitung
 n1 : Jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung
 n2 : Jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung
 d : pengenceran pertama yang dihitung

c. Uji Protein (Bintang, 2010)

0,1 gram sampel mie basah diambil dan ditambahkan katalisator N (campuran K_2SO_4 dan HgO dengan perbandingan 20:1) sebanyak 0,5-1 gram yang dibungkus dengan kertas saring untuk memudahkan memasukkannya ke dalam labu mikro Khejdal. Setelah ditambah katalisator N, sampel dimasukkan dalam labu mikro Khejdal, kemudian ditambahkan 3 ml asam sulfat pekat. Labu mikro Khejdal yang berisi sampel kemudian ditempatkan dalam alat destruksi dan ditutup, tahap destruksi dinyatakan selesai bila larutan berubah menjadi jernih.

Larutan NaOH- $Na_2S_2O_3$ sebanyak 20 ml dimasukkan ke dalam larutan sampel jernih yang telah dingin. Langkah berikutnya, larutan sampel tersebut dimasukkan ke dalam labu mikro Khejdal dan diletakkan di sebelah kiri. Alat destilasi berupa pipa kecil panjang dimasukkan ke dalam labu mikro Khejdal hingga mencapai dasar. Erlenmetyer yang berisi 5 ml asam borat 4% + indicator BCG-MR (*crom cresol green*, dan *methyl red*) diletakkan dibagian kanan labu mikro Khejdal. Reaksi destilasi selesai

ditandai dengan larutan sampel yang berwarna biru setelah ditambahkan asam borat dan indikator BCG-MR menjadi warna kuning jerami.

Larutan sampel yang telah didestilasi kemudian dititrasi dengan HCL 0,02 N. Kadar nitrogen (%N) dapat ditentukan dengan rumus berikut ini :

$$\% N = \frac{(\text{Volume titrasi sampel-blanko})}{\text{Berat sampel (gram)}} \times N \text{ HCL} \times 14,0008 \times 100\%$$

Dengan demikian % protein adalah sebagai berikut :

$$\% \text{ protein} = \% N \times 5,7 \text{ (fk bakmie)}$$

d. Uji Kadar Air (Sembiring, 2009)

Alat *Moisture Balance* dihidupkan dan dinolkan angkanya. Sebanyak 1 gram sampel mie basah ditempatkan dalam cawan aluminium. Alat *Moisture Balance* ditutup dan ditunggu sampai memberikan tanda. Angka yang tercatat pada alat *Moisture Balance* dibaca dan dicatat kadar airnya.

e. Uji pH (Fujiawan, 2012)

Sampel mie basah diukur dengan menggunakan pH meter. Instrumen dikalibrasi dengan larutan buffer dengan nilai pH 4 dan 7. Sampel mie basah ditimbang sebanyak 5 gram dan dihancurkan, kemudian ditambahkan akuades 45 ml lalu campuran tersebut dihomogenkan, sampel dipindahkan ke dalam gelas ukur, pH meter dicelupkan ke dalam sampel kira-kira 2-4 cm. Nilai pH diperoleh dengan membaca skala yang tertera pada alat tersebut.

f. Uji Tekstur (Utama dkk., 2011)

Kekerasan mie basah diukur dengan menggunakan *texture analyzer* (TA, XTplus, England). Alat ini dihubungkan dengan perangkat *computer*

yang dilengkapi dengan *software* “Texture Exponent 32”. Nilai kekerasan secara langsung diperlihatkan pada komputer dengan satuan N/mm^2 yang merupakan tenaga yang dibutuhkan oleh *probe* untuk menekan mie basah.

g. Uji Organoleptik (Mervina, 2012)

Uji organoleptik digunakan untuk melihat penerimaan panelis serta menentukan formula terpilih. Uji yang digunakan adalah uji hedonik atau uji kesukaan yang dilakukan terhadap peneliti sendiri. Nilai yang diberikan berada pada rentang 1 sampai 5. Untuk parameter bau = 1 (bau busuk) – 5 (bau khas mie basah), rasa = 1 (rasa asam) – 5 (rasa khas mie basah), warna = 1 (sangat coklat) – 5 (kuning khas mie basah), dan tekstur = 1 (sangat lembek) – 5 (kenyal khas mie basah). Sebelum mie basah diberi pengawet dan setelah mie basah diberi pengawet pada hari ke-0,1,2, dan 3, dilakukan uji organoleptik berupa uji kesukaan yang meliputi bau, rasa tekstur, dan warna.

7. Analisis Data (Gasperz, 1991)

Data hasil penelitian yang diperoleh akan dianalisis menggunakan ANAVA untuk mengetahui ada tidaknya beda nyata antar perlakuan. Jika ada beda nyata, analisis data akan dilanjutkan dengan uji DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) dengan tingkat kepercayaan 95% dengan *software* SPSS 16.