

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 4 bulan dimulai pada bulan Mei 2016 hingga Agustus 2016 di Laboratorium Teknobilogik-Pangan, Universitas Atma Jaya Yogyakarta.

B. Alat dan Bahan

Alat yang akan digunakan untuk ekstrak daun lamtoro antara lain, talenan, pisau, baskom, gelas beker, gelas ukur dan termometer batang. Alat-alat yang akan digunakan untuk uji pendahuluan tanin antara lain, tabung reaksi, pipet ukur, pipet tetes dan neraca digital. Alat-alat yang akan digunakan untuk uji fisik antara lain, jangka sorong, dan penggaris. Alat yang akan digunakan untuk uji kimia adalah pHmeter. Alat-alat yang akan digunakan untuk uji mikrobiologi antara lain. cawan petri, mikropipet, korek api, rak tabung reaksi, kertas payung, karet gelang, *laminar air flow*, incubator, tip dan autoklaf.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain daun lamtoro muda sebanyak 900 gram yang akan didapatkan dan perkebunan di daerah Samigaluh Kabupaten Kulon Progo Yogyakarta, telur ayam berumur kurang dari 24 jam sebanyak 36 butir yang dibeli dan peternakan ayam di Kabupaten Sleman Yogyakarta air, tissu roll, kertas label, akuades, buffer pH 4 dan pH 7, medium *Plate Count Agar* (PCA), *Lactose Broth* (LB), *Selenite Cystine Broth* (SCB), *Salmonella Shigella Agar* (SSA).

C. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial. Penelitian ini menggunakan 2 faktor yaitu konsentrasi dan masa simpan. Masing-masing konsentrasi akan dilakukan 3 kali pengulangan. Rancangan percobaan akan dijabarkan pada Tabel 5.

Masa simpan Hari ke-	Ulangan	Konsentrasi Ekstrak Daun Lamtoro			
		0 % b/v	10 % b/v	30 % b/v	50 % b/v
0	1	H0K0a	H0K10a	H0K30a	H0K50a
	2	H0K0b	H0K10b	H0K30b	H0K50b
	3	H0K0a	H0K10a	H15K30c	H0K50c
15	1	H15K0a	H15K10a	H15K30a	H15K50a
	2	H15K0b	H15K10b	H15K30b	H15K50b
	3	H15K0a	H15K10a	H15K30c	H15K50c
30	1	H30K0a	H30K10a	H30K30a	H30K50a
	2	H30K0b	H30K10b	H30K30b	H30K50b
	3	H30K0a	H30K10a	H30K30c	H30K50c

Keterangan :

H0 = Hari ke 0 K10 = Konsentrasi ekstrak tanin 10% (b/v)

H15 = Hari ke 15 K30 = Konsentrasi ekstrak tanin 30% (b/v)

H30 = Hari ke 30 K50 = Konsentrasi ekstrak tanin 50% (b/v)

a = Ulangan I

b = Ulangan 2

c = Ulangan 3

D. Tahapan Penelitian

1. Penyortiran Daun Lamtoro (Ummah, 2010)

Daun Lamtoro yang digunakan dipilih daun lamtoro muda. Daun lamtoro di cuci hingga bersih kemudian keringkan sebelum digunakan.

2. Ekstraksi Dekok Daun Lamtoro (Lestari, 2016)

Daun lamtoro yang sudah ditiris kemudian direbus pada suhu 90°C menggunakan *slow cooker* sambil sesekali diaduk dengan perbandingan berat per volume (B/V). 100 gram daun lamtoro dalam 1000 ml akuades untuk konsentrasi 10%, 300 gram daun lamtoro dalam 1000 ml akuades untuk konsentrasi 30% dan 500 gram daun lamtoro dalam 1000 ml akuades untuk konsentrasi 50%. Dekok daun lamtoro dijaga tetap dalam suhu tersebut selama 30 menit. Waktu 30 menit terhitung ketika suhu campuran mencapai 90°C . Setelah 30 menit, campuran tersebut diperas dengan menggunakan kain saring.

3. Identifikasi Tanin Daun Lamtoro (Sulastri, 2009)

Dekok daun lamtoro sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah dengan FeCl_3 1 % hingga larutan berwarna biru kehitaman. Larutan H_2SO_4 pekat ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan cokelat.

4. Perendaman Telur (Mukhlisah, 2014 dan Karmila, 2008).

Telur yang digunakan memiliki umur tidak lebih dari 24 jam dan digunakan telur dengan ukuran dan berat yang rata-rata sama (55-65 gram). Kemudian telur dibersihkan dengan air hangat 30°C untuk menghilangkan kotoran dan bakteri yang menempel pada kulit telur. Telur ditimbang lalu dipisahkan berdasarkan konsentrasi dan ulangnya. Kemudian telur dimasukkan ke dalam wadah yang berisi larutan ekstrak daun lamtoro dan terendam semua, selanjutnya wadah ditutup untuk menghindari kontaminasi dengan udara luar

sehingga dapat memaksimalkan terjadinya reaksi penyamakan. Telur direndam selama 24 jam, kemudian dikeringkan dengan menggunakan tisu dan ditaruh pada rak telur (*egg tray*) dan diberi label kemudian disimpan pada suhu ruang. Pengukuran dan pengamatan dilakukan pada hari ke 0, 15 dan 30.

5. Uji Fisik Telur Ayam

a. Analisis warna (Budisutya, 2005)

Sampel telur disiapkan dan selanjutnya alat *color reader* dinyalakan sehingga muncul salah satu system pengukuran pada layar. Pengukuran yang digunakan menggunakan system L, a, b. Hasil pengukuran berupa L, a, b kemudian nilai L, a, b dimasukkan ke dalam rumus x dan y lalu di hitung dengan rumus:

$$X = \frac{a + 1,75 \times L}{5,645 \times L + 3,012 \times b}$$

$$Y = \frac{1,786 \times L}{5,645 \times L + a - 3,012 \times b}$$

b. Uji rongga udara telur (Mukhlisah, 2014)

Ujung bagian atas telur di buka sedikit untuk mengukur kedalaman rongga udara dengan memasukkan jangka sorong ke dalam telur sampai menyentuh bagian cair telur.

c. *Haugh Unit* (Mukhlisah, 2014)

Haugh Unit merupakan satuan yang dipakai untuk mengetahui kesegaran telur terutama bagian putih telur. Telur ditimbang beratnya lalu dipecahkan secara hati-hati dan diletakkan di tempat yang datar selanjutnya

putih telur diukur dengan jangka sorong (dalam mm) bagian putih dan pinggir putih telur.

$$HU = 100 \log (H + 7,57 - 1,7 W^{0,37})$$

Keterangan : H = Ketinggian albumen (mm)

W = Berat Telur (g)

HU= *Haugh Unit*

d. Uji *Indeks Yolk* (Budisutya, 2005)

Indeks Yolk (cm) dihitung dengan perbandingan antara tinggi yolk dengan diameter rata-rata yolk. *Indeks Yolk* diukur dengan menggunakan jangka sorong. *Indeks Yolk* dihitung dengan menggunakan rumus:

$$YI = \frac{H}{Wd}$$

Keterangan : YI = *Yolk indeks*

H = Tinggi Yolk (mm)

Wd = Lebar yolk (mm)

6. Uji pH Telur Ayam (Mukhlisah, 2014)

Telur yang telah di uji *Indeks Yolk* dimasukkan ke dalam gelas beker.

Setelah itu pHmeter di celupkan ke dalam telur sampai didapat angka konstan.

Nilai pH yang tertera dicatat.

7. Uji Mikrobiologi

a. Perhitungan Angka Lempeng Total (Fardiaz dan Margino, 1993)

Sampel telur dikocok sampai homogen, setelah itu sampel telur diambil sebanyak 10 gram dan dilarutkan ke dalam 90 ml akuades steril kemudian divortex sampai homogen untuk pengenceran 10^{-1} . Larutan diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan kedalam akuades steril (Konsentrasi 10^{-2}) dan dibuat seri pengenceran dengan konsentrasi 10^{-3} , 10^{-4} dan 10^{-5} . Larutan seri pengenceran masing-masing diambil sebanyak 0,1 ml dan diinokulasi pada medium *Plate Count Agar* (PCA) dalam petri secara *spread plate* kemudian diratakan dengan trigaiski. Petri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh dihitung dengan menggunakan *colony counter*. Jumlah total mikroorganisme dihitung dengan rumus:

$$\text{ALT} = \frac{\sum c}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

Keterangan : $\sum C$ = Jumlah koloni pada cawan petri

n_1 = Jumlah petri pada pengenceran pertama

n_2 = Jumlah petri pada pengenceran kedua

d = Pengenceran pertama yang dihitung

b. Uji Kualitatif *Salmonella* sp.

Sampel telur dikocok sampai homogen, setelah itu sampel kuning telur diambil 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam 9 ml *Lactose Broth* (LB), kemudian divortex dan di pada suhu 35°C selama 24 jam. Hasil inkubasi pada medium LB selama 24 jam diambil, kemudian diambil 1 ml kemudian

diinokulasi pada 10 ml *Selenite Cystine Broth* (SCB), kemudian divortex dan diinkubasi selama 24 jam. Hasil inkubasi kemudian diinokulasi pada medium *Salmonella Shigella Agar* (SSA) dengan metode *Streak Plate*. Medium SSA kemudian diinkubasi selama 24 jam. Koloni yang terbentuk diamati dan dilanjutkan pada uji TSIA dengan metode tusuk tegak serta inokulasi selama 24 jam pada suhu 35°C.

8. Analisis Data (Gasperz, 1991)

Analisis data yang digunakan adalah ANAVA (*Analysis of Variance*) dan dilanjutkan dengan DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) untuk mengetahui letak beda nyata antar perlakuan dengan tingkat kepercayaan yang digunakan 95%. Data diproses dengan program SPSS versi 16