

IV. METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Mikrobiogenetika Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.

Waktu Penelitian pada bulan Januari sampai Mei 1998.

B. Bahan dan Alat

Bahan

Sampel susu sapi segar, susu bubuk skim, glukosa, medium MRS (de Man Ragose and Sharp), medium BSA (Bismuth Sulfit Agar), medium MSA (Monitol Salt Agar), medium NA (Nutiren Agar), medium NB (Nutrien Broth), Bovine Serum Albumin, reagen Lowry A (folin ciocalteu), reagen Lowry B (Na_2CO_3 2%, NaOH, 0,1 N $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1%, natrium kalium tartat 2%), buffer asetat (asam asetat, natrium asetat), ammonium sulfat kristal, indikator Phenolphthalien 1%, alkohol 70%. Kultur murni *Lactobacillus casei* 8090, *Lactobacillus bulgaricus* 0041, *Salmonella typhimurium* FNCC 0050, *Staphylococcus aureus* FNCC 0047.

Alat

Erlenmeyer 250 ml, tabung, cawan petri, gelas ukur, inkubator, buret, pemanas, oven, spektrofotometer, timbangan, pH meter, "colony counter", "blender", pipet ukur 1 ml, bunsen, autoklaf, "laminar air flow", "centrifuse", "shaking water bath", ose, rak tabung.

C. Cara Kerja

C.1. Pembuatan Medium

C.1.1. Medium MRS (Merck)

Pepton (kasein) 10,0 g., ekstrak daging 8,0 g., ekstrak yeast 4,0 g., dipotassium hydrogen phospat 2,0 g., tween 80 0,1 g., diammonium hydrogen citrat 2,0 g., sodium asetat 5,0 g., magnesium sulfat 0,2 g., mangan sulfat 0,04 g., agar 14 g. Bahar-bahan tersebut kemudian dilarutkan dalam 100 ml aquades, dipanaskan sambil diaduk sampai media larut sempurna, kemudian disterilisasi pada 121° C selama 15 menit dengan autoklaf.

C.1.2. Medium BSA

Empat puluh gram BSA (Merck) dilarutkan dalam aquades dididihkan sambil digoyang-goyangkan, ditunggu sampai temperatur \pm 50° C, tidak diautoklaf.

C.1.3. Medium MSA

Seratus sebelas gram MSA (Merck) dilarutkan dalam 1000 ml aquades, dipanaskan sampai media tersebut larut sempurna, strerilisasi pada suhu 121° C selama 15 menit dengan autoklaf.

C.1.4. Medium NB

Duapuluhan delapan gram Nutrien Broth (Merck) dilarutkan dalam 1000 ml aquades, kemudian dipanaskan sampai larut sempurna, dan sterilisasi pada suhu 121° C selama 15 menit dengan autoklaf.

C.1.5. Medium NA

Duapuluhan delapan gram Nutrien Agar (Meek) dilarutkan dalam 1000 ml aquades, kemudian dipanaskan sampai larut sempurna, dan disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit dengan autoklaf.

C.1.6. Medium Strater I

Sepuluh gram susu bubuk skim dilarutkan dalam 100 ml aquades, dipanaskan pada “Shaking water bath” dengan suhu 60 °C selama 30 menit (Frazier & Westhoff, 1988).

C.1.7. Medium Starter II

Sepuluh gram susu bubuk skim ditambah 3 gram glukosa kemudian dilarutkan dalam 100 ml aquades, dipanaskan pada “Shaking water bath” dengan suhu 60 °C selama 30 menit (Frazier & Westhoff, 1988).

C.1.8. Medium Fermentasi

Seratus ml susu sapi segar ditambah susu bubuk skim sebanyak 10 gram, dan glukosa 3 gram campuran diaduk merata, dipanaskan pada suhu 80°C selama 30 menit, kemudian didinginkan sampai suhu ± 37°C, dibuat 3 kali (Jenie *et. al*, 1993).

C.2. Pemeliharaan Kultur

Kultur murni *L. casei* 8090 dan *L. bulgaricus* 0041 masing-masing dipelihara pada medium MRS Agar Tegak dengan metode tusuk dan diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator.

Kultur Murni *S. typhimurium* FNCC 0050 dan *S. aureus* FNCC 0047 masing-masing diinokulasikan pada medium NA miring, dan diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator.

C.3. Pembuatan Starter

Suspensi kultur *L. casei* 8090 0,1 % v/v dan suspensi kultur *L. bulgaricus* 0041 0,1 % v/v pada medium MRS cair umur 24 jam yang mengandung sekitar $1,0 - 4,0 \times 10^8$ sel/ml, masing-masing diinokulasikan ke dalam medium starter I dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam dalam inkubator. Selanjutnya dari medium starter I kultur bakteri tersebut masing-masing diinokulasikan ke dalam medium starter II sebanyak 0,5 % v/v dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator.

C.4. Fermentasi

Erlenmeyer I berisi 100 ml media fermentasi, diinokulasikan dengan 1 ml kultur starter *L. casei* 8090, erlenmeyer II berisi 100 ml media fermentasi diinokulasi dengan 1 ml kultur starter *L. bulgaricus* 0041, erlenmeyer III berisi 100 ml media fermentasi tidak diinokulasi dengan bakteri apapun (sebagai kontrol).

Kemudian masing-masing erlenmeyer diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 x 24 jam dalam inkubator, setelah itu susu hasil fermentasi pada masing-masing erlenmeyer dihomogenisasi dengan ditambahkan larutan sukrosa konsentrasi 64,44% dengan perbandingan 1 : 1, dan diencerkan dengan aquades steril, perbandingan 1 : 4. Sehingga volume susu hasil fermentasi menjadi 600 ml (Jenie *et. al.*, 1993).

Susu hasil fermentasi yang telah dihomogenisasi tersebut, pada erlenmeyer I dibagi ke dalam 6 erlenmeyer 250 ml masing-masing 100 ml demikian juga erlenmeyer II dan III. Pada keadaan awal fermentasi dan akhir fermentasi diukur total asam, total protein dan pH. Semua dilakukan di dalam “laminar air flow”.

C.5. Inokulasi Bakteri Patogen

Dari 6 erlenmeyer 250 ml I yang masing-masing berisi 100 ml susu hasil fermentasi tersebut, 3 erlenmeyer diinokulasi dengan kultur *S. typhimurium* FNCC 0050 pada medium NB umur 24 jam sebanyak 1 ml, dengan konsentrasi 10^6 sel/ ml, dan 3 erlenmeyer lainnya diinokulasi dengan *S. aureus* FNCC 0047 pada medium NB umur 24 jam sebanyak 1 ml dengan konsentrasi 10^6 sel/ ml. Dengan cara yang sama dilakukan juga pada 6 erlenmeyer 250 ml II, dan 6 erlenmeyer III. Kemudian kedelapanbelas erlenmeyer tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Sebelum dan sesudah inkubasi jumlah total koloni bakteri patogen dihitung dengan menggunakan metode “Total Plate Count” dengan medium selektif (Ray, 1996).

C.6. Penghitungan Jumlah Bakteri Patogen (“Total Plate Count”)

Diambil 1 ml susu hasil fermentasi dimasukkan ke dalam 9 ml aquades steril (konsentrasi 1 : 10), dari 1 ml suspensi konsentrasi 1 : 10 di masukkan ke dalam 9 ml aquades steril (konsentrasi 1 : 10^2) dan 1 ml ke dalam cawan petri steril, dilakukan secara aseptik. Demikian seterusnya sampai konsentrasi 1 : 10^6 .

Kemudian semua cawan petri dituangi dengan medium selektif sesuai dengan jenis bakteri patogen. Medium BSA untuk *S. typhimurium* FNCC 0050, dan medium MSA untuk *S. aureus* FNCC 0047. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator, setelah itu dihitung jumlah koloninya dengan “colony counter”. (Fardiaz, 1985).

C.7. Penghitungan Total Asam

Susu ditimbang seberat 18 gram (17,5 ml) dalam erlemneyer kemudian ditambahkan 2 – 3 tetes larutan Phenolphthialien 1 % sebagai indikator. Kemudian dititrasi dengan 0,1 N NaOH, sampai warnanya berubah menjadi kemerah-merahan, dicatat jumlah ml NaOH yang digunakan untuk titrasi.

Kadar total asam dihitung dengan membagi dua selisih angka jumlah ml NaOH 0,1 N. Kemudian dihitung dalam bilangan persepujuhan.

$$\text{Kadar total asam} = \frac{\text{ml NaOH} \times 0,009 \times 100 \%}{\text{gram susu}} \mu\text{g/ml}$$

(Hadiwiyoto, 1988)

C.8. Penghitungan Total Protein terlarut

C.8.1 Pembuatan Reagen

Lowry A : dibuat dengan melarutkan folin ciocalteu dengan aquades dengan perbandingan 1 : 1.

Lowry B : terdiri dari dua larutan , larutan I adalah larutan 2 % Na_2CO_3 dalam NaOH 0,1 N. Larutan II adalah campuran 1 ml $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 1%, dan 1ml larutan Natrium kalium tartat 2%, dibuat segera sebelum digunakan. Lowry B dibuat dengan mencampur kedua larutan tersebut dengan perbandingan 100 : 1.

Buffer Asetat pH 5, dibuat dengan mencampur 14,8 ml larutan A, dan 35,2 ml larutan B, diencerkan sampai 100 ml. Larutan A terdiri dari 0,2 M asam asetat (11,55 ml dalam 1000 ml aquades). Larutan B terdiri dari 0,2 M natrium asetat (16,4 g. $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$ atau 27,2 g. $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ dalam 1000 ml aquades).
(Sudarmadji, 1984)

C.8.2. Penyiapan Kurva Standar Larutan Protein

Disiapkan larutan protein (Bovine Serum Albumin), sekitar 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$, diukur dengan tepat. Larutan protein tersebut disiapkan dalam tabung reaksi sehingga kadarnya bertingkat dari 30 – 300 μg . Pengenceran dilakukan seperti pada

Tabel 02.

Tabel 02. Pengenceran bertingkat dari larutan Bovine Serum Albumin pada pembuatan kurva standar larutan protein

tabung	ml. larutan	ml H ₂ O	μg protein / ml
1	0,1	0,9	30
2	0,2	0,8	60
3	0,3	0,7	90
4	0,4	0,6	120
5	0,5	0,5	150
6	0,6	0,4	180
7	0,7	0,3	210
8	0,8	0,2	240
9	0,9	0,1	270
10	1,0	0	300

Ditambahkan ke dalam masing-masing tabung 8 ml reagen Lowry B dan dibiarkan selama 10 menit, kemudian ditambahkan 1 ml reagan Lowry A, digojok dan dibiarkan selama 20 menit.

Kemudian dibaca absorbansinya (OD) pada panjang gelombang 600 nm, dengan spektrosometer, dan dibuat kurva standar pada kertas grafik yang menunjukkan hubungan antara OD (pada ordinat) dan konsentrasi (pada absis), diperhitungkan jumlah pengencerannya (Sudarmadji, 1984).

C.8.3. Pengukuran sampel

Larutan substrat fermentasi (yang terlarut enzim, albumin, dan lain-lain) diendapkan terlebih dahulu dengan Ammonium sulfat kristal, kemudian

dipisahkan larutan protein yang mengendap dengan sentrifuge pada kecepatan 11000 rpm selama 10 menit, supernatannya dipisahkan.

Presipitan yang merupakan protein dilarutkan kembali dengan buffer Asam asetat pH 5,0 sampai 10 ml. Setelah itu diambil sejumlah volume tertentu dari larutan protein tersebut dan ditambahkan 8 ml reagen Lowry B dan dibiarkan selama 10 menit, kemudian ditambahkan 1 ml reagen Lowry A, digojok dan dibiarkan selama 20 menit, dengan cara yang sama dibuat blanko dari aquades.

Kadar protein ditentukan dengan memplotkan OD kadar protein pada kurva standar, dengan memperhitungkan jumlah pengenceran yang telah dilakukan.

D. Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan acak langkap (RAL) untuk setiap bakteri patogen, dengan ulangan 3 kali. Data diuji homogenitas dan normalitasnya kemudian dianalisa dengan analisa sidik ragam kemudian dilanjutkan dengan uji BNJ pada taraf kepercayaan 95% (Yitnosumarto, 1993 dan Widasari, 1989).

Perlakuan yang digunakan adalah :

Jenis agen fermentasi :

L.0 : Kontrol (tanpa agen fermentasi)

L.1 : *Lactobacillus casei* 8090

L.2 : *Lactobacillus bulgaricus* 0041

yang masing-masing diujikan pada bakteri patogen *S. typhimurium* FNCC 0050 dan *S. aureus* FNCC 0047.

Parameter yang diamati adalah jumlah bakteri patogen (*S. typhimurium* FNCC 0050 dan *S. aureus* FNCC0047), pH, total asam, total protein.

Tabel 03. Skema perancangan percobaan

Ulangan	Jumlah bakteri patogen pada susu dengan agen fermentasi		
	L.0	L.1	L.2
1			
2			
3			

