

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Uji organoleptik dilaksanakan pada bulan September tahun 2024, hasil perlakuan yang sangat disukai kemudian di analisis daya simpannya dengan parameter angka lempeng total pada Laboratorium Balai Standarisasi dan Pelayanan Jasa Industri Medan.

B. Jenis dan Rancangan Penelitian

Tujuan dari penelitian laboratorium eksperimental ini adalah untuk mengetahui umur simpan formula nugget kombinasi biji nangka, tempe, dan ikan lemuru menggunakan metode total plate count (TLC).

C. Prosedur Pembuatan Nugget Kombinasi Biji Nangka, Forte dan Ikan Lemuru

1. Sampel Penelitian

Sampel penelitian berupa nugget yang terbuat dari ikan lemuru, formula tempe, dan biji nangka. Nugget tersebut diproduksi oleh Laboratorium Teknologi Pangan, Departemen Gizi, Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Medan Lubuk Pakam. Tempe yang telah disortir, dipotong kecil-kecil, lalu dimasak selama setengah jam, digunakan untuk membuat tepung formula tempe. Tepung terigu dicampur dengan tempe yang telah dihaluskan dan direbus, gula halus, minyak, baking powder, dan ovalet hingga membentuk adonan. Adonan ini kemudian dipanggang selama 30 menit dan dikeringkan menggunakan cabinet dryer pada suhu 60°C selama 14 jam, lalu digiling menjadi tepung formula tempe.

Biji nangka yang digunakan berasal dari buah nangka dulang yang diperoleh dari pedagang di Jl. Panglima Denai. Biji nangka direbus selama 30 menit lalu dihaluskan dengan chopper hingga menjadi adonan. Ikan lemuru diperoleh dari pasar di Lubuk Pakam, dibersihkan dari sisik dan kotoran, dipresto selama 15 menit, lalu dihaluskan dengan chopper.

Nugget kombinasi biji nangka, formula tempe, dan ikan lemuru dibuat dengan formulasi tertentu dan disimpan dalam rentang waktu yang berbeda. Pada waktu tertentu, sampel nugget diambil dan diuji kandungan ALT mikroba menggunakan metode standar. Hasil uji ALT mikroba yang diperoleh untuk mengetahui pengaruh kondisi dan lama penyimpanan terhadap jumlah mikroba pada nugget. Informasi ini penting untuk menentukan daya simpan dan keamanan produk nugget yang dihasilkan.

2. Prosedur Pembuatan dan Analisa Nugget

a. Prosedur Pembuatan Formula Tempe

Bahan Dan Alat

Bahan	Alat
1. 250 gram tempe	1. Pisau
2. 100 gram tepung terigu	2. Sendok
3. 100 gram gula halus	3. Baskom
4. 10 gram Minyak	4. Panci
5. 1sdt baking powder	5. Kompor gas
6. 1 sdm ovalet	6. Oven
	7. Cabinet dryer
	8. Mesin penggiling
	9. Toples

Cara Membuat

- Tempe disortir, dipotong kecil-kecil, dan direbus selama 30 menit. Setelah direbus, tempe dihaluskan.
- Bahan pendukung (tepung terigu, gula halus, minyak, baking powder, dan ovalet) ditambahkan.
- Adonan diuleni hingga kalis. Kemudian di masukkan kedalam loyang dengan ketebalan 1 cm untuk dipanggang.
- Adonan dipanggang dalam oven selama 30 menit.
- Adonan dikeringkan selama 14 jam pada suhu 60°C dalam pengering kabinet sebelum digiling menjadi tepung menggunakan prosedur tempe.

b. Prosedur Pembuatan Adonan Biji Nangka

Bahan Dan Alat

Bahan

1. Buah Nangka
2. Air

Alat

1. Pisau
2. Sendok
3. Baskom
4. Panci
5. Kompor gas
6. Chopper
7. Piring

Cara Membuat

- Biji nangka dipisahkan dari buahnya, kemudian dibersihkan.
- Biji nangkadirebus selama 30 menit.
- Setelah matang, biji dihaluskan menggunakan chopper hingga menjadi adonan.

c. Prosedur Pembuatan Nugget Biforil

Bahan Dan Alat

Bahan

- | | |
|--------------------------------|----------------------|
| 1. 75 gr Adonan biji nangka | 1. 250 gr Minyak |
| 2. 200 gr Tepung formula tempe | 2. 60 gr Telur ayam |
| 3. 100 gr Ikan lemuru | 3. 6 gr Bawang putih |
| 4. 50 gr Tepung terigu | 4. 1 sdt Garam |
| 5. 50 gr Wortel | |

Alat

- | | |
|-----------|---------------|
| 1. Pisau | 5. Kukusan |
| 2. Sendok | 6. Cetakan |
| 3. Baskom | 7. Kompor Gas |
| 4. Panci | |

Cara Membuat

- Ikan lemuru dibersihkan dari sisik dan kotorannya.
- Ikan dipresto selama 15 menit, kemudian dihaluskan menggunakan chopper.
- Wortel dan bawang putih diparut.
- Semua bahan (tepung formula tempe, adonan biji nangka, ikan lemuru, wortel, telur ayam, garam, dan bawang putih) dicampur dan diuleni hingga kalis.
- Cetakan yang sudah diolesi minyak diisi dengan adonan.
- Adonan dikukus selama 25 menit hingga permukaannya mengeras.
- Setelah dingin, adonan dilapisi tepung terigu dan tepung roti.
- Nugget disimpan dalam freezer.

D. Prosedur Analisa Daya Simpan Nugget Kombinasi Biji Nangka, Formula Tempe dan Ikan Lemuru Menggunakan Metode Angka Lempeng Total (TPC)

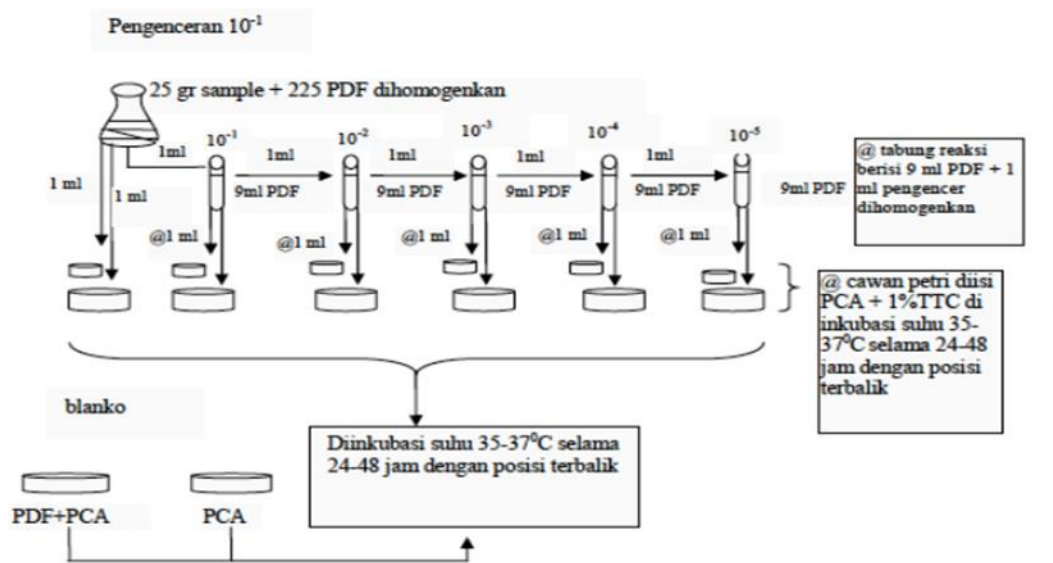
Untuk memastikan jumlah mikroorganisme yang terdapat dalam suatu produk, metode penghitungan jumlah lempeng total (TLC) dalam studi masa simpan melibatkan sejumlah proses krusial. Dengan menggunakan teknik budidaya, TLC mengukur jumlah mikroorganisme yang terdapat dalam suatu produk. Dengan menumbuhkan sampel pada media padat dan membuat serangkaian pengenceran sampel, TLC dihitung. CFU (*colony forming unit*) adalah satuan pengukuran yang digunakan (Standar Nasional Indonesia, 2014).

Berdasarkan Metode Analisis Mikrobiologi (MA PPOM 61/MIK/06), proses uji Angka Lempeng Total (TTL) meliputi pemipetan 25 mililiter sampel ke dalam kantong stomper steril atau penimbangan aseptik 25 gram. Untuk membuat suspensi dengan pengenceran 10⁻¹, 225 ml PDF kemudian ditambahkan dan dihomogenkan selama 30 detik menggunakan stomper. Siapkan lima tabung reaksi atau lebih, masing-masing berisi sembilan mililiter PDF. Setelah pemipetan sebanyak 1 ml ke dalam tabung reaksi pertama, hasil homogenisasi dari preparasi sampel, pengenceran

10-1, dikocok secara merata hingga mencapai pengenceran 10-2. Pengenceran tambahan dilakukan sesuai dengan pengenceran yang dibutuhkan atau hingga mencapai pengenceran 10-6.

1 ml dari setiap pengenceran dipipet ke dalam cawan petri, dan setiap cawan dibuat dua kali. 15–20 ml media PCA ditambahkan ke setiap cawan pada suhu 45°C bersama dengan 1% TTC. Untuk memastikan suspensi terdispersi secara merata, cawan petri segera diaduk dan dibalik. Uji kontrol (blanko) dibuat untuk memastikan sterilitas media dan pengencer. Media agar dan 1 mililiter pengencer ditempatkan di satu cawan, sementara media ditempatkan di cawan lainnya. Setelah media memadat, cawan diinkubasi secara terbalik pada suhu 35–37°C selama 24–46 jam. Setelah itu, jumlah koloni yang tumbuh dicatat dan dihitung. Gambar 6 mengilustrasikan prosedur untuk uji jumlah cawan total.

Gambar 1. Proses Uji Angka Lempeng Total



1. **SOP Penganataran Sampel**

- a. Datang mengantar sampel harus menggunakan masker
- b. Menemui satpam dan memeriksa suhu tubuh, memandu untuk mencuci tangan atau menggunakan hand sanitizer, menyemprot sampel yang dibawa dengan disinfektan, dan mengantar keuangan.
- c. Menunggu antrian, mengisi formulir di ruangan konsultasi, dan menyerahkan formulir kepada petugas.
- d. Petugas memeriksa contoh yang sudah diletakkan pada wadah petugas meregistrasi sampel yang dibawa berdasarkan formulir yang sudah diisi ke dalam sistem.
- e. Memeriksa SPPC dan enandatanganinya, lalu membawa SPPC ke bagian pembayaran.
- f. bendahara menerima Meregistrasi data berdasarkan mengapa SPPC ke dalam sistem, dan menerbitkan billing tagihan.
- g. Membayar tagihan sejumlah yang tertera di billing melalui debit transfer (non-cash)
- h. Menunggu proses pengecekan 30 hari waktu kerja.

2. **Prosedur Perhitungan Koloni Dengan Media Plate Count Agar (PCA)**

Bahan dan Alat

Bahan

10 gr/sampel (nugget biforil) dengan lama penyimpanan yang berbeda (0 hari, 5 hari, 10 hari, dan 15 hari)

- a. 23,5 gr Plate Count Agar
- b. 1 L aquadest steril
- c. 600 ml larutan NaCl 85%
- d. Alkohol 70%

Alat

- | | |
|--------------------|----------------------------------|
| a. Neraca analitik | h. Colony counter |
| b. Stomacher | i. Hot plate + magnetic stirrer |
| c. Micropipette | j. Beaker glass |
| d. Tabung reaksi | k. Erlenmeyer |
| e. Cawan petri | l. Bunsen |
| f. Autoklaf | m. Biosafety Cabinet Class II A2 |
| g. Inkubator | n. Vortex |

Persiapan Media PCA

- Timbang media PCA sebanyak 23,5 gram untuk setiap 1 liter aquades sesuai petunjuk produsen.
- Larutkan media ke dalam aquades sambil dipanaskan dan terus diaduk hingga larut sempurna.
- Sterilkan larutan media dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.
- Sebelum digunakan, biarkan media mendingin hingga sekitar $\pm 45^{\circ}\text{C}$.

Persiapan Sampel

- Ambil 10 gram sampel nugget dari bagian tengah secara aseptik.
- Masukkan sampel ke dalam kantong stomacher steril yang berisi 90 mL larutan NaCl 0,85%.
- Homogenkan sampel selama 1 menit hingga tercampur merata.

Pengenceran Bertingkat

- Siapkan 24 tabung reaksi untuk pengenceran bertingkat dari 10^{-1} hingga 10^{-6} , masing-masing berisi 9 mL larutan NaCl 0,85% steril.
- Ambil 1 mL sampel dari larutan homogen menggunakan mikropipet, lalu masukkan ke dalam tabung pertama (pengenceran 10^{-1}).
- Lakukan pengenceran serial dengan memindahkan 1 mL dari tabung sebelumnya ke tabung berikutnya hingga pengenceran 10^{-6} .
- Gunakan tip mikropipet yang baru dan steril pada setiap pemindahan untuk mencegah kontaminasi silang, homogenkan setiap tabung menggunakan vortex.

Penanaman Sampel

- Dari setiap tingkat pengenceran, biasanya antara 10^{-3} dan 10^{-6} , ambil 1 mL sampel.
- Sampel harus ditempatkan dalam cawan petri yang telah disterilkan.
- Isi setiap cawan sampel dengan sekitar 15 mL media PCA cair bersuhu $\pm 45^{\circ}\text{C}$.
- Putar cawan perlahan hingga sampel dan media tercampur merata.
- Diamkan media hingga memadat sebelum proses inkubasi.
- Selama 24 hingga 48 jam, letakkan cawan petri terbalik dalam inkubator yang diatur pada suhu 35 hingga 37°C .

Penghitungan Koloni

- Tentukan berapa banyak koloni yang ada pada cawan petri, berkisar antara 25 hingga 250, karena rentang ini optimal untuk analisis mikrobiologis.
- Gunakan alat colony counter untuk memastikan ketepatan dan efisiensi dalam pencatatan jumlah koloni.
- Hitung jumlah koloni menggunakan rumus :

$$\text{Angka Lempeng Total (ALT)} \left(\frac{\text{CFU}}{\text{gr}} \right) \\ = \text{Jumlah kloni setiap cawan} \times \frac{1}{\text{Faktor pengenceran}}$$

Waktu Analisis

Uji ALT dilakukan terhadap 4 sampel berdasarkan lama penyimpanan hari ke-0, ke-5, ke-10, dan ke-15.

3. Pemeriksaan Pelengkap

Prosedur Deteksi Pertumbuhan Mikroba Dengan Media Nutrient Agar (NA) Dan Potato Dextrose Agar (PDA)

Bahan dan Alat

Bahan	Alat
a. 10 gr nugget biforil (penyimpanan 15 hari)	a. Neraca analitik
b. 7 gr Nutrient Agar (NA)	b. Stomacher
c. 19,5 gr Potato Dextrose Agar (PDA)	c. Micropipette
d. 225 ml larutan NaCl 85% steril	d. Tabung raksi
e. 2 L Aquadest steril	e. Cawan petri
f. Crystal violet (pewarna primer)	f. Autoklaf
g. Larutan iodine (mordan)	g. Inkubator
h. Alkohol 95%	h. Colony counter
i. Safranin (pewarna sekunder)	i. Hot plate + magnetic stirrer
j. Lactophenol Cotton Blue	j. Beaker glass
k. Minyak imersi	k. Erlenmeyer
l. Alkohol 70%	l. Bunsen
	m. Biosafety Cabinet Class II A2
	n. Vortex
	o. L shaped cell
	p. Mikroskop cahaya
	q. Ose/jarum inokulasi
	r. Bunsen burner/pembakar spiritus
	s. Object glass dan cover glass
	t. Botol semprot
	u. Tissue/kertas lens
	v. Pipet tetes
	w. Mounting needle (untuk jamur)

Pembuatan Media Nutrunet Agar (NA)



Gambar 2. Prosedur Pembuatan Media NA

- Timbang 7 gram bubuk NA.
- Larutkan bubuk NA dalam 500 mL aquades steril.
- Panaskan larutan hingga bubuk NA larut sempurna.
- Sterilkan larutan pada suhu 121°C selama lima belas menit.
- Sebelum digunakan, biarkan media mendingin hingga sekitar $\pm 45^{\circ}\text{C}$.

Pembuatan Media Potato Dextrose Agar (PDA)



Gambar 3. Prosedur Pembuatan Media PDA

- Timbang 19,5 gram bubuk PDA.
- Larutkan bubuk PDA dalam 500 mL aquades steril.
- Panaskan larutan hingga bubuk PDA larut sempurna.
- Sterilkan larutan pada suhu 121°C selama 15 menit.
- Dinginkan media hingga suhu sekitar $\pm 45^{\circ}\text{C}$ sebelum digunakan.

Persiapan Sampel



Gambar 4. Persiapan Sampel Nugget Biforil

- Ambil 10 gram sampel nugget biforil yang telah disimpan selama 15 hari pada suhu lemari pendingin (refrigerator) secara aseptik dari bagian tengah.
- Masukkan 90 mL larutan NaCl 0,85% ke dalam kantong stomacher steril bersama sampel.
- Homogenkan sampel selama 1 menit hingga tercampur merata.

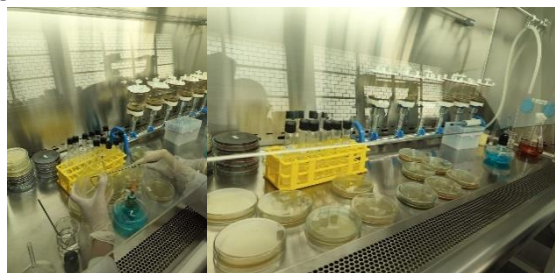
Pengenceran Bertingkat



Gambar 5. Prosedur Pengenceran Sampel

- Siapkan 6 tabung reaksi untuk pengenceran bertingkat dari 10^{-1} hingga 10^{-6} , masing-masing berisi 9 mL larutan NaCl 0,85% steril.
- Ambil 1 mL sampel dari larutan homogen menggunakan mikropipet, lalu masukkan ke dalam tabung pertama (pengenceran 10^{-1}).
- Lakukan pengenceran serial dengan memindahkan 1 mL dari tabung hingga pengenceran 10^{-6} tercapai, dalam tabung berikutnya yang berisi 9 mL larutan NaCl 0,85% steril.
- Gunakan tip mikropipet yang baru dan steril pada setiap pemindahan untuk mencegah kontaminasi silang.
- Homogenkan setiap tabung menggunakan vortex selama beberapa detik hingga larutan tercampur merata.

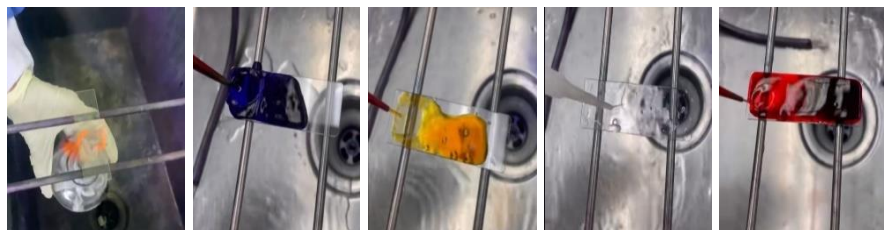
Penanaman Sampel



Gambar 6. Prosedur Penanaman Sampel

- Ambil 1 mL sampel dari setiap tingkat pengenceran.
- Dalam cawan petri steril, teteskan sampel ke permukaan bahan padat NA dan PDA yang telah memadat.
- Sebarkan sampel secara merata ke seluruh permukaan media menggunakan batang L (L-shape spreader) yang telah disterilkan dengan cara dicelupkan ke dalam alkohol dan dipanaskan.
- Setelah penyebaran satu pengenceran selesai, sterilkan kembali batang L sebelum digunakan untuk pengenceran berikutnya untuk mencegah kontaminasi silang.
- Diamkan cawan petri sejenak agar permukaan mengering.
- Cawan petri harus diinkubasi selama waktu dan suhu yang tepat untuk perkembangan mikroba.
- Media NA: inkubasi selama 24 hingga 48 jam (untuk bakteri) pada suhu 35 hingga 37°C.
- Media PDA: inkubasi selama 3–5 hari (untuk jamur) pada suhu 25–28°C.

Pengamatan di Bawah Mikroskop



Gambar 7. Prosedur Persiapan Preparat

a. Deteksi Pertumbuhan Bakteri Pada Media NA

- Ambil koloni bakteri menggunakan ose steril.
- Campurkan koloni dengan satu tetes akuades steril di atas kaca objek.
- Ratakan campuran hingga membentuk lapisan tipis dan biarkan mengering di udara.
- Fiksasi preparat dengan melewatkannya tiga kali di atas nyala api bunsen.

- Teteskan crystal violet pada olesan, diamkan selama 60 detik, lalu bilas dengan air mengalir.
- Setelah meneteskan setetes larutan iodine Lugol dan membiarkannya selama 60 detik, bilas kembali dengan air.
- Segera bilas dengan air setelah penghilangan warna selama 10 hingga 15 detik dengan alkohol 95%.
- Teteskan safranin, diamkan selama 30 detik, bilas, lalu keringkan dengan menepuk-nepuk ringan menggunakan tisu bersih.
- Letakkan preparat di atas meja mikroskop. Pengamatan dengan menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 100x (dengan minyak immersi).
- Amati morfologi, warna, dan Hasil pewarnaan Gram ditentukan oleh komposisi bakteri (Bakteri ungu bersifat Gram positif, sedangkan bakteri merah muda bersifat Gram negatif).
- Catat hasil pengamatan dengan teliti.

b. Deteksi Pertumbuhan Kapang Dan Khamir Pada Media PDA

- Sterilkan area kerja menggunakan nyala api dari bunsen burner untuk menciptakan lingkungan aseptis.
- Sterilkan jarum ose atau mounting needle dengan cara dipijarkan pada nyala api hingga berpijar.
- Ambil sampel jamur dari koloni yang tumbuh pada media PDA, pilih bagian tepi koloni yang merupakan zona pertumbuhan aktif dan biasanya mengandung sporangium matang berwarna gelap.
- Lakukan pengambilan dengan hati-hati agar substrat agar tidak ikut terangkat dan tidak mengganggu kejelasan preparat.
- Buat preparat dengan teknik water mount dengan meneteskan satu tetes air steril pada kaca objek.
- Letakkan sampel jamur di atas tetesan air steril.
- Pisahkan struktur hifa dan sporangium secara perlahan menggunakan jarum untuk memperjelas morfologi.

- Tutup preparat dengan kaca penutup (cover glass) secara perlahan tanpa memberikan tekanan berlebih agar struktur tetap utuh.
- Jika struktur kurang kontras, lakukan pewarnaan dengan meneteskan satu tetes larutan Lactophenol Cotton Blue (LCB) pada preparat.
- Diamkan selama 2–3 menit agar pewarna meresap dengan baik.
- Hilangkan kelebihan larutan dengan menepuk perlahan menggunakan tisu bersih.
- Pengamatan mikroskopis menggunakan minyak imersi pada perbesaran 100x.
- Teteskan minyak imersi pada kaca penutup tepat di atas area pengamatan.
- Tempelkan lensa objektif imersi pada tetesan minyak, lalu lakukan fokus perlahan hingga struktur jamur seperti hifa dan sporangium terlihat jelas.
- Amati dan dokumentasikan karakteristik morfologi jamur secara detail.

E. Jenis dan Cara Pengumpulan Data

1. Data Primer

Data primer diperoleh melalui pengujian laboratorium secara langsung terhadap sampel nugget kombinasi biji nangka, formula tempe, dan ikan lemur. Data primer meliputi jumlah angka lempeng total (ALT) pada nugget.

2. Pengumpulan Data

Jumlah Angka Lempeng Total pada nugget kombinasi biji nangka, formula tempe dan ikan lemur diperoleh dari Laboratorium Balai Standarisasi dan Pelayanan Jasa industri Medan.

A. Pengolahan dan Analisis Data

Analisis data deskriptif dilakukan.

1. Pengolahan Data Angka Lempeng Total (ALT) Mikroba

- Data ALT mikroba yang diperoleh dari perhitungan jumlah koloni pada setiap sampel nugget dan pengenceran akan dimasukkan ke dalam tabel atau spreadsheet.
- Data ALT mikroba akan disajikan dalam satuan CFU/gram (Colony Forming Unit per gram) dengan interval waktu penyimpanan 0 hari, 5 hari, 10 hari, dan 15 hari.

2. Analisis Data

Analisis Deskriptif

- Data ALT mikroba akan disajikan secara deskriptif berdasarkan hasil pengujian laboratorium pada setiap interval waktu, guna menggambarkan kecenderungan jumlah mikroba yang terdeteksi selama penyimpanan.

3. Interpretasi Hasil

- Hasil analisis data akan diinterpretasikan secara komprehensif dengan mengaitkan temuan penelitian dengan teori dan literatur yang relevan.
- Berdasarkan hasil analisis dan interpretasi data yang telah selesai dilakukan, akan ditarik kesimpulan.
- Etika penelitian

Penelitian ini tidak melibatkan subjek manusia atau hewan yang memerlukan persetujuan etis khusus. Namun, penelitian ini tetap akan mengikuti pedoman etika penelitian yang berlaku, seperti keamanan laboratorium dan penggunaan bahan kimia secara aman.

4. Penyajian Data

- Tabel, grafik, dan/atau gambar yang mudah dipahami akan digunakan untuk menampilkan data yang diproses dan dianalisis.
- Penyajian data akan dilengkapi dengan penjelasan yang memadai untuk memudahkan pemahaman pembaca.