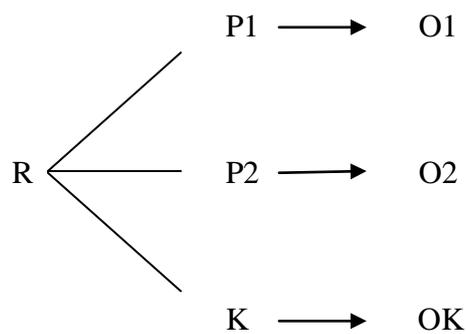


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan rancangan penelitian eksperimental laboratorium dengan tujuan untuk mengetahui adanya pengaruh suhu penyimpanan terhadap angka lempeng total telur ayam kampung. Dengan rancangan penelitian sebagai berikut:



Gambar 3.1: Rancangan Penelitian (Zainuddin, 2003)

Keterangan:

R : Random

P1 : Perlakuan dengan suhu penyimpanan 4°C selama 15 hari

P2 : Perlakuan dengan suhu penyimpanan 12°C selama 15 hari

K : Kontrol dengan suhu penyimpanan 27°C selama 15 hari

OK : Observasi pada kontrol (tanpa perlakuan)

O1 : Observasi setelah perlakuan dengan suhu penyimpanan 4°C selama 15 hari

O2 : Observasi setelah perlakuan dengan suhu penyimpanan 12°C
selama 15 hari

3.2 Populasi Dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi Penelitian

Dalam penelitian ini populasi adalah telur ayam kampung yang baru keluar dari induk ayam setelah nol hari

3.2.2 Sampel Penelitian

Dalam penelitian sampel yang diambil adalah telur ayam kampung, sedangkan jumlah pengulangan sampelnya diperoleh dari rumus sebagai berikut:

$$(n-1) (k-1) \geq 15$$

$$(n-1) (3-1) \geq 15$$

$$(n-1) (2) \geq 15$$

$$2n - 2 \geq 15$$

$$2n \geq 15 + 2$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 17 / 2 = 8,5$$

$$n \sim 9$$

(Zainudin, 2003)

Keterangan:

n : Jumlah sampel

k : Perlakuan/kelompok

Berdasarkan perhitungan jumlah sampel diatas maka jumlah pengulangan dari setiap perlakuan diambil sepuluh butir telur ayam kampung sehingga jumlah sampel adalah tiga puluh butir ayam telur ayam kampung.

3.3 Lokasi Dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di daerah Kangean, Pamekasan, sedangkan pemeriksaan dilakukan di Balai riset dan standarisasi industri Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Februari sampai Juli 2013, sedangkan Waktu pemeriksaan dilakukan pada bulan Mei 2013.

3.4 Variabel dan Definisi Oprasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas	: Suhu penyimpanan
Variabel terikat	: Angka lempeng total telur ayam kampung.
Variabel kontrol	: Lama penyimpanan.

3.4.2. Definisi Oprasional

1. Suhu penyimpanan telur ayam kampung dikategorikan menjadi berbagai macam suhu, yaitu: suhu 4°C merupakan suhu yang setara dengan suhu Freezer , suhu 12°C merupakan suhu yang setara dengan suhu setara dengan suhu Lemari es, dan suhu 27°C (kontrol) yang merupakan suhu yang setara dengan suhu kamar. Semua perlakuan disimpan selama 15 hari.

2. Angka lempeng total telur ayam kampung adalah metode yang menunjukkan jumlah bakteri pada telur ayam kampung (isi telur ayam kampung) yang dihitung dalam satuan CFU (coloni form unit). Berdasarkan standart nasional indonesia (SNI) batas maksimum cemaran mikroba dalam telur dengan metode angka lempeng total adalah 1×10^5 koloni/g.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data tentang ALT telur ayam kampung dikumpulkan dengan observasi laboratorium.

3.5.1 Persiapan sampel telur ayam

1. Alat yang digunakan.
 - a. Lemari es
 - b. Freezer
 - c. Rak telur
 - d. Pengaduk (spatula) steril
 - e. Beaker glass steril
2. Prosedur
 - a. Telur dicuci bersih dengan air dan melakukan pelabelan secara acak.
 - b. Mendinginkan 10 telur dengan suhu penyimpanan $\pm 4^{\circ}\text{C}$, mendinginkan 10 telur dengan suhu penyimpanan $\pm 12^{\circ}\text{C}$, mendinginkan 10 telur dengan suhu penyimpanan $\pm 27^{\circ}\text{C}$ (suhu kamar). Semua telur didinginkan selama 15 hari.
 - c. Telur dipecahkan dengan pengaduk steril dan mengeluarkan isi telur ke dalam beaker glass steril dan diaduk.

3.5.2. Pemeriksaan Jumlah Kuman

1. Metode *Plate count*

2. Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah sampel diinkubasi dalam pertumbuhan yang cocok selama 24-48 jam pada suhu $37 \pm 1^\circ\text{C}$

3. Alat yang digunakan

a. Neraca analitik

b. Autoclaf

c. Bunsen

d. Kaki tiga

e. Erlenmeyer steril

f. Pengaduk steril

g. Petridis steril (90-100 mm)

h. Pipet ukur 1,5 dan 10 ml steril

i. Tabung reaksi steril

j. Kertas berlemak

k. Gelas ukur

l. Inkubator

m. Colony Counter

n. Rak tabung.

Cara steril alat :

Alat-alat yang dibutuhkan dibungkus koran kemudian disterilkan pada autoclaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

4. Bahan dan reagen :

a. Aquadest

b. Cara pembuatan Media Nutrien Agar

Timbang media Nutrien agar ke dalam erlenmeyer steril dan dilarutkan dengan aquadest, melarutkannya dengan cara dipanaskan sampai larut sempurna (tidak ada gumpalan gel pada Erlenmeyer). Mencocokkan pH 7,4 setelah dibungkus dengan koran dan disterilkan pada autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit

c. Pembuatan Larutan pengencer Pz (NaCl 0,85%)

Timbang sebanyak 0,85 gram NaCl, larutkan dalam 100 ml aquadest dan homogenkan kemudian tutup dengan kapas berlemak lalu bungkus dengan koran dan sterilkan pada autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

5. Prosedur kerja

a. Persiapan

1) Erlenmeyer steril yang diberi tanda pengenceran 10^{-1}

2) Disiapkan 4 buah tabung reaksi yang diberi tanda pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} .

3) Disiapkan 6 buah petridis/cawan petri steril yang diberi tanda pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} dan petridis ke 6 sebagai control media.

b. Mengencerkan sampel yaitu dengan memipet 10 ml sampel dimasukkan ke Erlenmeyer steril yang bertanda 10^{-1} dan ditambahkan 90 ml Pz steril, kemudian dihomogenkan.

- c. Masing-masing tabung reaksi steril yang telah diberi tanda pengenceran diisi 9 ml Pz steril.
- d. Dari erlenmeyer bertanda 10^{-1} , dipipet 1 ml dan dimasukkan pada tabung reaksi bertanda 10^{-2} , dikocok samapi homogen.
- e. Dari tabung reaksi bertanda 10^{-2} dipipet 1 ml, masukkan ke dalam tabung reaksi bertanda 10^{-3} , kemudian kocok sampai homogen. Demikian seterusnya dilakukan hal yang sama sampai tabung reaksi bertanda 10^{-5} .
- f. Dari masing-masing tabung reaksi, dimulai dari tabung reaksi bertanda 10^{-2} dipipet 1 ml larutan menggunakan pipet volume steril, dimasukkan ke petridis sesuai dengan tanda pengenceran. Demikian seterusnya sampai tabug reaksi bertanda 10^{-5} .
- g. Ke dalam setiap cawan petri tuangkan sebanyak 12-15 ml media Nutrien Agar yang telah dicairkan yang bersuhu $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$ dalam waktu 15 menit dari pengenceran pertama.
- h. Goyangkan cawan pteri dengan hati-hati (putar dan giyangkan ke depan dan ke belakang serta ke kanan dan ke kiri) hingga sampel tercampur rata.
- i. Mengerjakan pemeriksaan kontrol dengan diberi 10 ml Pz dan dituangkan 12-15 ml Nutrien agar ke dalam petri.
- j. Membiarkan hingga campurkan dalam cawan petri membeku.
- k. Dimasukkan semua cawan petr dengan posisi terbalik dan inkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam.
- l. Mencatat pertumbuhan koloni setelah 48 jam

m. Dihitung angka lempeng total dalam 1 gram atau 1 ml contoh dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan dengan faktor pengeceran yang digunakan (sesuai)

Diagram 3.1 : Bagan proses Pemeriksaan Angka Lempeng Total (TPC)

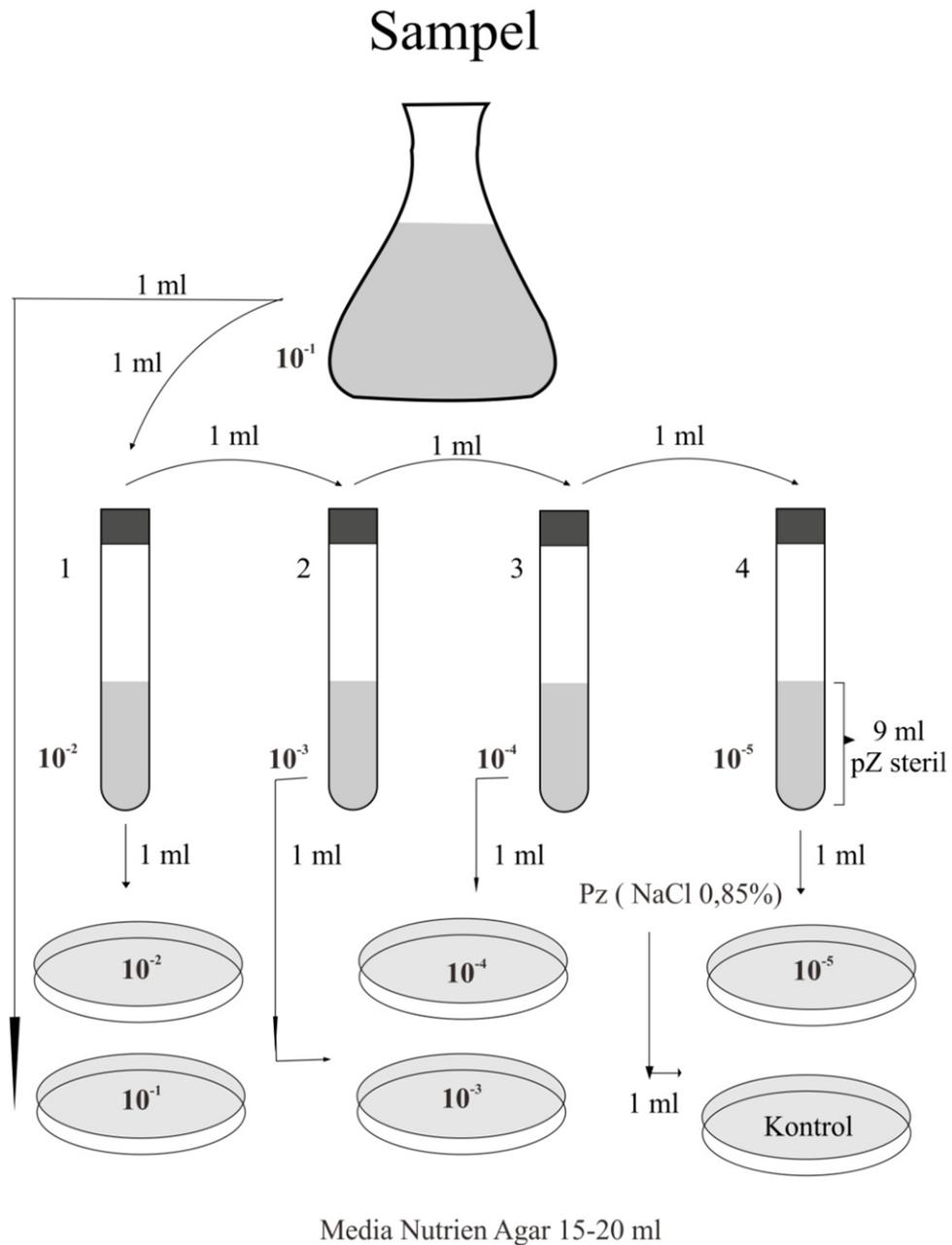
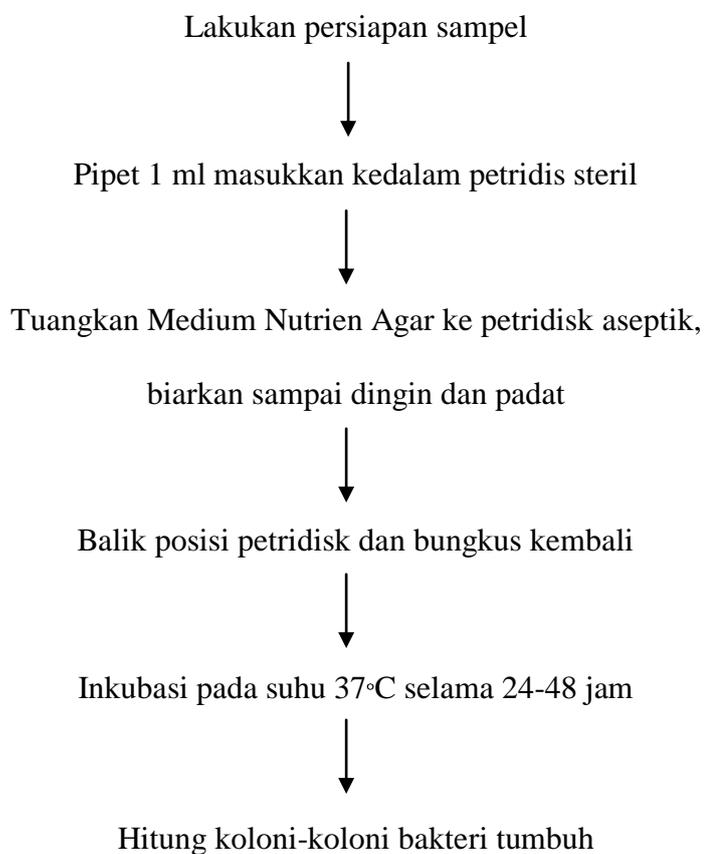


Diagram 3.2 : Skema Pemeriksaan Angka Lempeng Total (TPC)

3.5.3. Penetapan hasil Akhir

1. Setelah cawan petri diinkubasi pertumbuhan koloni pada setiap cawan yang mengandung 25-250 koloni setelah 48 jam.
2. Menghitung angka lempeng total dalam 1 gram atau 1 ml contoh dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan petri dengan faktor pengenceran yang digunakan (sesuai).

3.5.4. Cara Menghitung Koloni

1. Memilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah dalam koloni antara 25-250 setiap cawan. Hitung semua koloni dalam cawan petri

dengan menggunakan alat penghitung koloni (colony counter). Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran dan menyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per mililiter atau gram.

2. Jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 atau lebih dari 250, hitung rata-rata jumlah koloni, kalikan dengan faktor pengenceran dan nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri permililiter atau gram.
3. Jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25-250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran seperti yang disebut pada butir a dan b diatas dan hitung rata-rata jumlah koloni dari kedua pengenceran tersebut. Jika jumlah yang tertinggi lebih besar dari dua kali jumlah yang terkecil, nyatakan jumlah yang lebih kecil sebagai jumlah bakteri permililiter atau gram.
4. Jika rata-rata jumlah koloni masing-masing cawan petri tidak terletak antara 25-250 koloni, hitung jumlah koloni seperti yang disebut pada butir a dan b diatas dan nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiran per mililiter atau gram.
5. Jika jumlah koloni dari semua pengenceran lebih dari 250 koloni, maka setiap cawan petri dengan pengenceran tertinggi dibagi ke dalam 2,4 atau 8 sektor. Hitung jumlah koloni dalam satu cawan petri, hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pembagian dan pengenceran.
6. Jika dalam 1/8 bagian cawan petri terdapat lebih dari 200 koloni maka jumlah koloni yang dapat = 8×200 (1600), dikalikan dengan faktor pengenceran dan menyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri perkiraan

permililiter atau gram lebih besar dari jumlah yang didapat (lebih besar dari 1600 x faktor pengenceran)

7. Jika tidak ada koloni yang tumbuh dalam cawan petri, nyaakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari satu dikalikan dengan pengenceran yang terendah (<10)
8. Menghitung koloni perambatan (*spreader*)

Ada 3 macam perambatan pada koloni, yaitu :

- a. Merupakan rantai yang terpisah-pisah.
- b. Perambatan yang terjadi diantara dasar cawan petri dan perbenihan.
- c. Perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan perbenihan.

Kalau terjadi hanya 1 (satu) perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap 1 (satu). Tetapi bila satu atau lebih rantai terbentuk 4 dan yang berasal dari sumber yang berpisah-pisah, maka tiap hari sumber dihitung sebagai 1 (satu) koloni.

Perambatan yang terjadi diantara dasar cawan petri dan perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan perbenihan terjadi maka sebaiknya pemeriksaan diulangi karena koloni dalam keadaan semacam ini agak sukar dihitung . Berdasarkan standart nasional indonesia (SNI) batas maksimum cemaran mikroba dalam telur dengan metode angka lempeng total adalah 1×10^5 koloni/g (SNI-SSN-012887, 1992).

3.5.5 Cara Menghitung Dan Membulatkan Angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan yaitu angka yang pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

sedangkan angka yang ketiga diganti 0 apabila kurang dari 5 dan apabila lebih dari 5 dijadikan 1 yang ditambahkan pada angka yang kedua. (munajin,1992).

Contoh : 523.000 dilaporkan sebagai 520.000 ($5,2 \times 10^5$), 83.600 dilaporkan sebagai 84.000 ($8,4 \times 10^4$) (SNI-SSN-012887, 1992).

3.6. Tabulasi Data

Data yang diperoleh ditabulasikan sebagai berikut :

Tabel 3.1. Contoh tabulasi data

No	Kode Sampel	Suhu	Pengenceran					Jumlah koloni	
			10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}		kontrol
1	A1	$\pm 4^{\circ}\text{C}$							
2	A2	$\pm 12^{\circ}\text{C}$							
3	A3	$\pm 27^{\circ}\text{C}$							
30									

Keterangan :

Berdasarkan standart nasional indonesia (SNI) batas maksimum cemaran mikroba dalam telur dengan metode angka lempeng total adalah 1×10^5 koloni/g

3.7 Metode Analisis Data

Data yang diperoleh diuji menggunakan uji Annova dengan tingkat kesalahan 5% (0,05).