

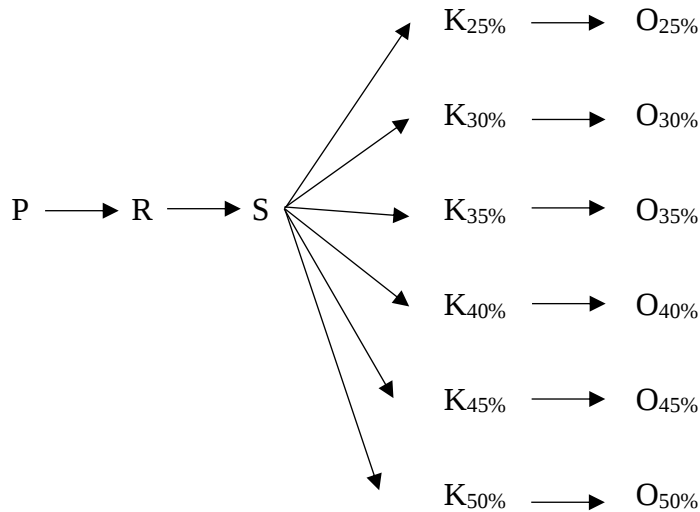
BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah jenis penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian air perasan jeruk lemon terhadap pertumbuhan bakteri pada daging sapi. Dari uji pendahuluan yang telah dilakukan peneliti menggunakan range konsentrasi 0% - 100% dengan interval 25, didapatkan hasil uji daging sapi yang diberi air perasan lemon 0% ditumbuhi bakteri sebanyak 1.590 koloni/gram, daging yang diberi air perasan lemon 25% ditumbuhi bakteri sebanyak 990 koloni/gram, daging yang diberi air perasan lemon 50% ditumbuhi bakteri sebanyak 270 koloni/gram, daging yang diberi air perasan lemon 75% ditumbuhi bakteri sebanyak 190 koloni/gram, dan daging yang diberi air perasan lemon 100% ditumbuhi bakteri sebanyak 70 koloni/gram.

Dari hasil uji pendahuluan tersebut dengan mengacu pada Peraturan Kepala BPOM RI no.16 tahun 2016 tentang kriteria mikrobiologi pada pangan yang menerangkan bahwa batas maksimum cemaran mikroba pada produk daging tidak boleh melebihi 1×10^4 koloni/gr, maka didapatkan range konsentrasi air perasan lemon yang digunakan adalah antara 25% - 50% dengan rancangan penelitiannya sebagai berikut :



Gambar 3.1 Skema Penelitian

Keterangan :

R : randomisasi

K_{25%} : kelompok sampel dengan perlakuan pemberian air perasan jeruk lemon konsentrasi 25%.

K_{30%} : kelompok sampel dengan perlakuan pemberian air perasan jeruk lemon konsentrasi 30%.

K_{35%} : kelompok sampel dengan perlakuan pemberian air perasan jeruk lemon konsentrasi 35%.

K_{40%} : kelompok sampel dengan perlakuan pemberian air perasan jeruk lemon konsentrasi 40%.

K_{45%} : kelompok sampel dengan perlakuan pemberian air perasan jeruk lemon konsentrasi 45%.

K_{50%} : kelompok sampel dengan perlakuan pemberian air perasan jeruk lemon konsentrasi 50%.

O_{25%} : hasil observasi pertumbuhan kuman pada sampel setelah pemberian air perasan jeruk lemon 25%.

O_{30%} : hasil observasi pertumbuhan kuman pada sampel setelah pemberian air perasan jeruk lemon 30%.

O_{35%} : hasil observasi pertumbuhan kuman pada sampel setelah pemberian air perasan jeruk lemon 35%.

O_{40%} : hasil observasi pertumbuhan kuman pada sampel setelah pemberian air perasan jeruk lemon 40%.

$O_{45\%}$: hasil observasi pertumbuhan kuman pada sampel setelah pemberian air perasan jeruk lemon 45%.

$O_{50\%}$: hasil observasi pertumbuhan kuman pada sampel setelah pemberian air perasan jeruk lemon 50%.

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi penelitian

Dalam penelitian ini populasi yang diambil adalah pertumbuhan bakteri pada daging sapi yang dijual di seluruh Supermarket di Surabaya.

3.2.2 Sampel penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri pada daging sapi yang dibeli di Supermarket Daerah Mulyosari Surabaya, untuk setiap perlakuan dalam penelitian dilakukan masing-masing sebanyak 6 perlakuan dengan 4 kali pengulangan menggunakan 100 ml air perasan jeruk lemon yang telah dibuat dalam berbagai konsentrasi untuk merendam daging sapi seberat 10 gram pada setiap perlakuannya.

Dilakukan 5 kali pengulangan didasarkan dari rumus $(r-1)(t-1) \geq 15$, akan diperoleh jumlah ulangan sebagai berikut :

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

$$5(r-1) \geq 15$$

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 15 + 5$$

$$r \geq 20 : 5$$

$$r = 4$$

(Hidayat, 2010).

keterangan :

t : treatment / perlakuan

r : replikasi / pengulangan

3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

3.3.1 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilakukan selama 10 bulan dimulai pada akhir bulan Desember 2017 sampai dengan bulan Agustus 2018.

3.3.2 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analisis Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya, Jl. Sutorejo No. 59 Surabaya, Jawa Timur.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini, variabel penelitian terdiri dari :

1. Variabel bebas : Konsentrasi air perasan lemon.
2. Variabel terikat : Pertumbuhan bakteri pada daging sapi.

3. Variabel kontrol : Jumlah sampel yang digunakan setiap perlakuan, lama inkubasi, suhu inkubasi.

3.4.2 Definisi Operasional

Definisi operasional penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Konsentrasi air perasan lemon adalah air perasan yang didapat dari buah jeruk lemon segar (tidak kering dan tidak busuk) yang di potong, diperas, dan disaring hingga didapatkan air perasan yang bersih kemudian dibuat menjadi konsentrasi 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, dan 50%.
2. Pertumbuhan bakteri adalah semua jenis bakteri yang tumbuh dalam sampel atau bahan uji setelah sampel ditanam pada media NA (Nutrient Agar) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian dihitung jumlah koloni bakteri yang terdapat dalam sampel.
3. Jumlah sampel adalah takaran berat sampel yang digunakan pada setiap perlakuan. Jumlah sampel tersebut adalah 10 gram daging sapi pada setiap perlakuan.
4. Lama inkubasi adalah waktu yang dibutuhkan untuk perkembangbiakan bakteri. Lama inkubasi yang digunakan pada pemeriksaan ini adalah 24 jam.
5. Suhu adalah temperatur yang digunakan untuk perkembangbiakan bakteri. suhu yang digunakan adalah pada suhu 37°C.

3.5 Teknik Pengumpulan Data

Data tentang pertumbuhan bakteri diperoleh dari hasil uji laboratorium pada sampel daging sapi yang telah diberi perlakuan dan sampel yang tidak diberi perlakuan. Setelah itu sampel di inkubasi dalam media NA (Nutrient Agar) pada

suhu $\pm 37^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam, sehingga akan membentuk koloni kuman yang dapat langsung dihitung. Dengan langkah – langkah sebagai berikut :

3.5.1 Pembuatan Air Perasan Lemon

- a. Alat :
 1. Pisau
 2. Alat pemeras jeruk
 3. Saringan
 4. Labu ukur 100ml
- b. Bahan :
 1. Buah jeruk lemon segar (tidak kering dan tidak busuk)
 2. Aquades
- c. Prosedur :
 1. Buah jeruk lemon segar yang akan digunakan sebelumnya dicuci terlebih dahulu, kemudian buah lemon tersebut dipotong menjadi 2 bagian dengan menggunakan pisau.
 2. Tiap - tiap bagian jeruk lemon yang sudah terpotong di peras menggunakan alat pemeras jeruk dan disaring sampai di dapatkan volume 100 ml tanpa penambahan aquades sebagai konsentrasi 100%.
 3. Dari konsentrasi 100% lalu di ambil 25ml kedalam labu ukur dan di add kan dengan aquades sampai 100 ml sehingga didapatkan konsentrasi 25%.
 4. Dari konsentrasi 100% lalu di ambil 30ml kedalam labu ukur dan di add kan dengan aquades sampai 100 ml sehingga didapatkan konsentrasi 30%.
 5. Dari konsentrasi 100% lalu di ambil 35ml kedalam labu ukur dan di add kan dengan aquades sampai 100 ml sehingga didapatkan konsentrasi 35%.

6. Dari konsentrasi 100% lalu di ambil 40ml kedalam labu ukur dan di add kan dengan aquades sampai 100 ml sehingga didapatkan konsentrasi 40%.

7. Dari konsentrasi 100% lalu di ambil 45ml kedalam labu ukur dan di add kan dengan aquades sampai 100 ml sehingga didapatkan konsentrasi 45%.

5. Dari konsentrasi 100% lalu di ambil 50ml kedalam labu ukur dan di add kan dengan aquades sampai 100 ml sehingga didapatkan konsentrasi 50%.

3.5.2 Pemberian Perlakuan pada Daging Sapi

a. Alat : 1. Beaker glass 100ml

2. Pinset steril

3. Pisau

4. Neraca timbangan

5. Etiket

b. Bahan : 1. Air perasan lemon 25%, 30%, 35%, 40%,45%, dan 50%.

2. Daging sapi

c. Prosedur :

1. Beri kode pada sampel daging sapi yang akan diuji dengan etiket (A, B, C, dan D).

2. Pada tiap 1 kode sampel, daging sapi dipotong-potong menjadi 6 bagian dengan berat yang sama masing-masing 10 gram untuk mendapatkan perlakuan yang berbeda-beda dengan pengulangan 4x. Jadi total keseluruhan adalah sebanyak 24 potong.

3. Bagi rata ke 24 potongan daging sapi tersebut menjadi 4 bagian untuk diberi air perasan lemon 25%, 4 bagian untuk diberi air perasan lemon 30%, 4

bagian untuk diberi air perasan lemon 35%, 4 bagian untuk diberi air perasan lemon 40%, 4 bagian untuk diberi air perasan lemon 45%, dan 4 bagian terakhir untuk diberi air perasan lemon 50%.

4. Setelah itu sampel daging sapi direndam pada masing – masing konsentrasi air perasan lemon yang telah dibuat kurang lebih selama 1 jam, kemudian ditiriskan dan didiamkan selama ± 8 jam diruang terbuka pada suhu kamar, lalu siap untuk diuji.

3.5.3 Pemeriksaan Pertumbuhan Bakteri pada Sampel

a. Prinsip Pemeriksaan

Setelah sampel daging sapi diinkubasi dalam media agar NA (Nutrient Agar) pada suhu $\pm 37^{\circ}\text{C}$ akan membentuk koloni yang dapat langsung dihitung dengan mata telanjang tanpa menggunakan mikroskop yang dinyatakan dalam satuan *CFU (Colony From Units)*.

b. Metode : Pour Plate / Tuang

c. Alat	: 1. Spitus	8. Batang pengaduk
	2. Gelas arloji steril	9. Tabung reaksi steril
	3. Blender	10. Cawan petri steril
	4. Gelas Ukur 200 ml	11. Beaker glass 250 ml
	5. Erlenmeyer 250 ml	12. Kertas pH
	6. pipet ukur 10 ml	13. Autoclave
	7. Inkubator	14. Etiket

d. Media dan Bahan : 1. NA (Nutrient Agar)

2. Pz steril

1. Cara pembuatan media NA (Nutrient Agar)

Media NA (Nutrient Agar) ditimbang sebanyak 20 gram pada gelas arloji, lalu media NA yang telah ditimbang dimasukkan dalam Erlenmeyer 1000 ml dan ditambahkan aquadest 1000 ml lalu diaduk hingga rata, setelah itu dipanaskan diatas api spirtus hingga larut sempurna lalu diukur pH sampai 7,4. Bila terlalu asam tambahkan NaOH dan apabila terlalu basa tambahkan HCl. Tutup Erlenmeyer menggunakan kain kasa lalu bungkus dengan kertas koran. Setelah itu masukkan ke dalam autoclave untuk disteril dengan suhu 121°C selama 15 menit.

2. Cara pembuatan NaCl 0,85% steril

NaCl ditimbang sebanyak 8,5 gram kemudian dimasukkan dalam beaker glass lalu tambahkan aquadest $\pm$ 50 ml. Diaduk sampai benar-benar larut dan tercampur sempurna. Pindahkan larutan ke dalam labu ukur 1000 ml lalu tambahkan aquadest sampai tepat batas miniskus. Kocok sampai homogen lalu pindahkan dalam Erlenmeyer 1000 ml. Tutup Erlenmeyer dengan kain kasa lalu bungkus dengan kertas koran dan dimasukkan ke dalam autoclave untuk di steril dengan suhu 121°C selama 15 menit.

e. Prosedur

1. Mempersiapkan alat dan bahan terlebih dahulu.
2. Untuk setiap satu sampel dalam satu perlakuan, daging sapi dengan berat 10 gram di blender dalam 90 ml Pz steril sampai tercampur sehingga diperoleh suspensi pengenceran 10^{-1} . Kemudian dimasukkan dalam Erlenmeyer 250 ml yang telah di beri label 10^{-1} .

3. Untuk setiap sampel dalam satu perlakuan seperti pada poin nomor 2, digunakan 4 tabung reaksi steril yang telah diberi label (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , dan 10^{-5}) dan masing-masing tabung tersebut diisi dengan Pz steril sebanyak 9 ml.
4. Siapkan 5 cawan petri yang diberi label (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}).
5. Pipet 2 ml bahan dari Erlenmeyer berlabel 10^{-1} dengan menggunakan pipet ukur, lalu masukkan 1 ml ke dalam cawan petri berlabel 10^{-1} dan 1 ml ke dalam tabung reaksi berlabel 10^{-2} (homogenkan dengan cara hisap tiup).
6. Pipet 2 ml bahan dari tabung reaksi berlabel 10^{-2} lalu masukkan 1 ml ke dalam cawan petri berlabel 10^{-2} dan 1 ml ke dalam tabung reaksi berlabel 10^{-3} (homogenkan dengan cara hisap tiup).
7. Pipet 2 ml bahan dari tabung reaksi berlabel 10^{-3} lalu masukkan 1 ml ke dalam cawan petri berlabel 10^{-3} dan 1 ml ke dalam tabung reaksi berlabel 10^{-4} (homogenkan dengan cara hisap tiup).
8. Pipet 2 ml bahan dari tabung reaksi berlabel 10^{-4} lalu masukkan 1 ml ke dalam cawan petri berlabel 10^{-4} dan 1 ml ke dalam tabung reaksi berlabel 10^{-5} (homogenkan dengan cara hisap tiup).
9. Pipet 1 ml bahan dari tabung berlabel 10^{-5} lalu masukkan ke dalam cawan petri berlabel 10^{-5} .
10. Setelah itu tuangkan media NA yang telah di steril dengan autoclave ke dalam masing-masing cawan petri sebanyak ± 15 ml (selama proses penuangan media, tutup cawan petri tidak boleh dibuka terlalu lebar untuk menghindari kontaminasi dari luar).

11. Segera setelah penuangan, cawan petri digerakkan diatas meja dengan gerakan melingkar secara hati-hati untuk menyebarkan cairan sampel sehingga bakteri dalam sampel tumbuh merata dalam media dan mudah diamati.
12. Untuk mengetahui baik atau tidaknya proses sterilisasi media dan pengenceran, maka perlu dibuat uji kontrol (blanko). Pada satu cawan petri diisi 1 ml Pz steril dan $\pm$ 15 ml media NA (Nutrient Agar) saja lalu di homogenkan.
13. Setelah semua media memadat, semua cawan-cawan tersebut di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator.

3.6 Penetapan Hasil Akhir

Cara penghitungan koloni pada cawan sesuai dengan Standard Plate Counter adalah sebagai berikut :

1. Cawan yang dipilih dan dihitung adalah yang mengandung jumlah koloni antara 30 dan 300 dikalikan dengan besarnya pengenceran.
2. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan suatu kumpulan koloni yang besar dimana jumlah koloninya diragukan, dapat dihitung sebagai satu koloni.
3. Satu deretan atau rantai koloni yang terlihat sebagai suatu garis tebal dihitung sebagai satu koloni.

Data yang dilaporkan sebagai Standard Plate Counter harus mengikuti peraturan sebagai berikut :

1. Angka yang dilaporkan hanya terdiri dari dua angka, yaitu angka pertama didepan koma dan angka kedua dibelakang koma dengan dikalikan besarnya pengenceran.

2. Jika semua pengenceran yang dibuat pemupukan menghasilkan angka kurang dari 30 koloni pada cawan, maka hanya jumlah koloni pada pengenceran terendah yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai kurang dari 30 dikalikan besarnya pengenceran, tetapi jumlah sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung.
3. Jika semua pengenceran yang dibuat pemupukan menghasilkan angka lebih dari 300 koloni pada cawan, hanya jumlah koloni pada pengenceran tertinggi yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai lebih dari 300 dan dikalikan besarnya pengenceran, tetapi jumlah sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung.
4. Jika cawan dari dua tingkat pengenceran menghasilkan koloni dengan jumlah antara 30 dan 300, dan perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah dari pengenceran tersebut lebih kecil atau sama dengan 2, tentukan rata-rata dari kedua nilai tersebut dengan memperhitungkan pengencerannya. Jika perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah lebih besar dari 2 maka yang dilaporkan hanya hasil yang terkecil.

3.7 Metode Pengumpulan Data

Untuk memperoleh data dan informasi yang mempunyai kualitas dan validitas yang cukup tinggi, maka penelitian dilakukan dengan eksperimen laboratorium yang kemudia hasil ditabulasikan.

3.8 Metode Analisis Data

Setelah diperoleh hasil dalam bentuk tabel, data kemudian dianalisis menggunakan uji anova oneway dengan nilai signifikan $< 0,05$.