

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret – April 2016. Penelitian ini dilakukan di Pasar Tradisional di Kabupaten Semarang yaitu Pasar Projo Ambarawa, Pasar Sumowono, Pasar Babadan, Pasar Bandarjo, Pasar Jimbaran dan Pasar Bandungan. Perhitungan bakteri dengan metode TPC di Laboratorium Fisiologi dan Biokimia Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro Semarang. Pengukuran pH di Laboratorium Kesehatan Hewan Dinas Peternakan dan Perikanan Kabupaten Semarang. Analisis proksimat daging ayam meliputi kadar protein di Laboratorium Kimia dan Gizi Pangan Fakultas Gizi dan Keperawatan Universitas Muhammadiyah Semarang.

3.1. Materi

Bahan digunakan dalam penelitian ini adalah sampel daging ayam sebanyak 18 potong bagian dada, *Nutrient Agar* (NA) sebagai media untuk perhitungan total bakteri, aquadest, alkohol, 0,5 g selenium, 18 ml NaOH, HCl 0,01 N, asam borat 0,02 N, Indikator *Methyl Orange*, indikator *Methyl Red*, indikator PP dan 2 ml H₂SO₄.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *cooling box*, *ice pack*, pH meter untuk mengukur nilai pH dengan merek Hanna dengan tingkat ketelitian ± 0,02, pisau, timbangan analitik, inkubator, gelas ukur, cawan petri, rak tabung, *autoclave*, tabung reaksi, gunting steril, pinset steril, kantong plastik sampel, pipet

tetes, *colony counter*, sarung tangan, alat penumbuk, mortar, botol timbang, erlenmeyer, labu Kjeldahl 100 ml, kompor listrik, *cruis* porselin, *beaker glass*, pompa vakum, pemanas Kjeldahl, alat destilasi, buret 50ml, botol timbang, pipet volum, labu destilasi, statif, kertas label, alat tulis dan kamera untuk dokumentasi segala kegiatan saat berlangsung.

3.2. Metode

Metode yang digunakan dalam penelitian dibagi menjadi 3 tahap yaitu :

3.2.1. Penentuan lokasi

Penentuan lokasi yang digunakan dalam penelitian ini dengan melakukan survei langsung ke pasar tradisional di Kabupaten Semarang. Pada tahap ini dilakukan skoring untuk menentukan Pasar Tradisional yang sesuai dengan kriteria untuk penelitian. Pada skoring ini terdiri dari 3 kelompok pasar yaitu kelompok A (sangat baik), kelompok B (baik) dan kelompok C (kurang baik) dengan menggunakan metode Linkert (2008). Keterangan kriteria skoring pasar dapat dilihat pada Lampiran 1.

Tabel 2. Skoring Pasar

Kebersihan (0-3)	Alat-Alat (0-3)	Penjual (0-3)	Los Daging (0-3)	Sumber Air (0-3)
3	3	3	3	3
2	2	2	2	2
1	1	1	1	1
0	0	0	0	0

Penghitungan skoring menggunakan metode Linkert (2008) yaitu :

Jumlah Pilihan	: 4
Jumlah Pertanyaan	: 5
Skor Terendah	: 0
Skor Tertinggi	: 3
Kriteria Penilaian	:
Skor Tertinggi	: $3 \times 5 = 15$ ($15/15 \times 100 = 100\%$)
Skor Tengah 1	: $2 \times 5 = 10$ ($10/15 \times 100 = 66,67\%$)
Skor Tengah 2	: $1 \times 5 = 5$ ($5/15 \times 100 = 33,33\%$)
Skor Terendah	: $0 \times 5 = 0$ ($0/15 \times 100 = 0\%$)

Hasil perhitungan skoring pemilihan pasar tradisional dapat dilihat pada Lampiran

2. Dari hasil perhitungan skoring, pasar dapat dikelompokkan menjadi 3 yaitu :

- * Kelompok A : $\geq 66,67\%$
- * Kelompok B : $33,33\% < B < 66,67\%$
- * Kelompok C : $< 33,33\%$

Dari hasil survei yang sudah dilakukan dan berdasarkan skoring pasar dapat ditentukan seperti yang terlihat pada Tabel 3. Penentuan pasar tradisional ini juga ditentukan oleh jarak tempuh yang paling terdekat karena parameter yang diamati adalah total bakteri sehingga sampel harus dengan cepat dibawa ke laboratorium untuk di analisis.

Tabel 3. Kelompok Pasar Sesuai Kelompok

Kelompok A	Kelompok B	Kelompok C
Pasar Projo Ambarawa Pasar Sumowono	Pasar Babadan Pasar Bandarjo	Pasar Bandungan Pasar Jimbaran

3.2.2. Pengambilan Sampel Daging Ayam

Pengambilan sampel yang dilakukan pada penelitian ini diambil secara acak dengan menggunakan *Simple Random Sampling*, kemudian di analisis dengan menggunakan metode Rancangan Acak Kelompok (RAK). Pengambilan sampel dengan metode ini karena pasar tradisional di Kabupaten Semarang sangat berbeda (heterogen) oleh karena itu terdapat kriteria tertentu yang dapat mengelompokkan pasar tradisional ke dalam 3 kelompok (Kelompok A = sangat baik, Kelompok B = baik, Kelompok C = kurang baik) dan 6 pasar tradisional tersebut sebagai ulangan. Kriteria pedagang dalam pengambilan sampel yaitu :

- Pasar sesuai dengan kriteria penilaian skoring.
- Pedagang yang menjual daging ayam dengan rentang waktu pukul 03.00 s/d 07.00 WIB dapat dilihat pada Lampiran 7.

Pengambilan sampel daging ayam tiap sampelnya sebanyak 10 g atau dengan ukuran 5 cm x 5 cm untuk dilakukan analisis perhitungan total bakteri, nilai pH dan kandungan gizi (protein). Waktu pengambilan sampel juga disesuaikan dengan waktu pemotongan ayam yang dilakukan di masing-masing pasar. Waktu pemotongan ayam biasanya dilakukan sekitar pukul 02.00 WIB sehingga pengambilan sampel dimulai pukul 03.00 WIB disaat daging ayam sudah dipasarkan. Waktu pengambilan sampel terdapat dalam Tabel 4. Waktu pengambilan sampel dilakukan mulai jam 03.00 di pasar tradisional, kemudian berselang 2 jam sampai pukul 07.00 WIB. Pada pukul 07.00 WIB di sebagian pasar tradisional daging ayam yang dijual sudah mulai habis terjual.

Tabel 4. Waktu Pengambilan Sampel

Sampel	Waktu Pengambilan
I	03.00
II	05.00
III	07.00

Dalam pengambilan sampel, sampel daging ayam yang diperoleh langsung dari tangan penjual tersebut kemudian dimasukkan ke dalam plastik sampel, diberi label (keterangan lokasi) dan langsung dimasukkan ke dalam *cooling box* yang sudah terisi oleh *ice pack* untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Sampel yang diperoleh segera mungkin dibawa ke laboratorium untuk mengetahui nilai pH pada daging ayam, cemaran bakteri pada daging ayam untuk dilakukan analisis lanjutan perhitungan total bakteri dengan metode TPC, kemudian hasilnya dibandingkan dengan persyaratan mutu Batas Maksimum Cemaran Mikroba(BMCM) pada daging ayam yang sudah ditetapkan. Melakukan analisis proksimat daging untuk mengetahui kandungan gizi yang terdapat pada daging ayam meliputi kadar protein pada setiap perlakuan lama waktu pemaparan.

3.2.3. Analisis Sampel

Analisis sampel dilakukan setiap pengambilan sampel daging. Analisis sampel dilakukan untuk mengetahui total bakteri, pH dan kandungan protein pada daging ayam potong di pasar tradisional Kabupaten Semarang.

3.2.3.1. Analisis total bakteri, perhitungan total bakteri dengan metode TPC dimaksudkan untuk menunjukkan jumlah totalbakteri dengan cara menghitung koloni bakteri yang ditumbuhkan pada media agar. Perhitungan kandungan total

bakteri secara tidak langsung dengan metode cawan tuang. Metode yang dilakukan dalam analisis total bakteri yaitu pertama pembuatan media yang digunakan adalah larutan aquades steril dan medium NA. Melakukan sterilisasi medium dan alat yang akan digunakan yaitu tabung reaksi, cawan petri, pipet, erlenmeyer dan gelas ukur dengan menggunakan autoklaf dengan temperatur 121°C selama $\pm 15 - 30$ menit dengan tekanan 2 atm. Medium dan alat-alat yang sudah disterilisasi dikeluarkan dari autoklaf dimasukkan kedalam inkubator pada temperatur $45-50^{\circ}\text{C}$ sampai saat digunakan. Setelah medium sudah dingin, tuangkan medium ke dalam cawan petri dan medium siap digunakan sebagai media tanam. Kemudian, sampel ditimbang sebanyak 5 g daging ayam kemudian dimasukkan ke dalam alat penumbuk yang telah steril dan daging ditumbuk hingga hancur. Setelah hancur dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 9 ml aquadest steril kemudian di homogenkan, sehingga diperoleh ekstrak daging sebagai bahan inokulasi. Pengenceran dilakukan untuk mempermudah dalam perhitungan koloni.

Pengenceran dilakukan dengan ekstrak daging sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi larutan 9 ml aquades steril, lalu dihomegenisasi (pengenceran 10^{-2}). Ekstrak daging dengan pengenceran 10^{-2} dimasukkan ke dalam 9 ml larutan aquades steril sehingga terbentuk ekstrak daging dengan pengenceran 10^{-3} . Kemudian pengenceran dilanjutkan dengan cara yang sama sehingga diperoleh ekstrak daging dengan pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} . Dari pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} sebanyak 1 ml dipipet ke dalam cawan petri menggunakan pipet 1 ml. Dalam menuangkan kedalam cawan petri tidak boleh

lebih dari 30 menit. Setelah penuangan cawan digerakkan diatas meja secara hati-hati untuk menyebarkan sel bakteri secara merata, yaitu dengan gerakan angka delapan. Setelah memadat, cawan-cawan dapat diinkubasi di dalam inkubator dengan posisi terbalik dilakukan selama 24 jam pada temperatur 37⁰C. Setelah akhir masa inkubasi, koloni yang terbentuk dihitung dapat dilihat pada Lampiran 8. Perhitungan koloni dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Total Bakteri (cfu/g)} = \frac{\text{Jumlah Koloni Bakteri} \times 1}{\text{Pengenceran}} \dots\dots\dots (1)$$

Perhitungan koloni dihitung setiap pengenceran dengan jumlah koloni 30 sampai dengan 300 (Bintoro *et al.*, 2006).

3.2.3.2. Analisis pengujian pH, pengukuran pH daging menggunakan alat pH meter dengan cara menusukkan elektrodanya pada salah satu bagian daging kemudian hasilnya akan tertera langsung pada alat tersebut (Suradi, 2012). Hasil pada pH meter akan tertera setelah beberapa menit dapat dilihat pada Lampiran 8.

3.2.3.4 . Analisis kandungan protein, analisis kandungan protein menggunakan metode mikro Kjeldahl. Sampel daging ayam di haluskan terlebih dahulu, kemudian setelah halus sampel ditimbang sebanyak 0,05 g bahan basah, dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl dan ditambahkan dengan selenium sebanyak 0,5 g dan H₂SO₄ sebanyak 2 ml kemudian terjadi destruksi protein menjadi unsur-unsur penyusunnya dan dilakukan pemanasan di ruang asam sampai proses destruksi berakhir dengan ditandai berubahnya warna menjadi jernih dan tidak berwarna, lalu didinginkan terlebih dahulu. Setelah dingin labu *Kjeldahl* dicuci dengan aquadest. Sampel didestilasi menggunakan NaOH dan indikator PP

sampai alkalis, destilat ditampung dalam erlenmeyer yang berisi 5 ml larutan asam borat dan indikator metil merah. Destilat yang diperoleh dititrasi menggunakan HCl 0,02 N hingga terbentuk warna ungu muda terbentuk dapat dilihat pada Lampiran 8. Setelah mendapatkan N protein dilakukan perhitungan kadar protein dengan menggunakan rumus perhitungan kadar protein adalah sebagai berikut (Hermiastuti, 2013) :

$$\%N = \frac{(\text{ml HCl bahan} - \text{blanko}) \times N.HCl \times 14,007}{\text{gram sampel (mg)}} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

$$\%N = \%N \times \text{faktor koreksi (6,25)}$$

3.3. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) dengan 3 perlakuan dan 3 kelompok. Perlakuan terdiri dari lama pemaparan 2 jam, 4 jam dan 6 jam dengan 3 kelompok pasar yaitu A, B dan C dan 2 pasar tradisional sebagai ulangan. Data yang terkumpul dianalisis dengan *Analysis of Variance* (Anova).

Model matematika rancangan tersebut menurut Mas (2009) dituliskan pada rumus nomor 3.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} \dots\dots\dots (3)$$

Keterangan :

- Y_{ij}: Total bakteri, pH dan kandungan protein daging ayam ke-j yang mendapat perlakuan lama waktu pemaparan ke- i.
- μ: Nilai rata-rata dari total bakteri, perubahan pH dan kandungan protein daging ayam di pasar tradisional kabupaten Semarang.
- τ_i: Pengaruh lama waktu pemaparan daging ke-i (i = 2,4,6 jam)
- β_j: Pengaruh kelompok pasar tradisional ke-i

ϵ_{ij} : Pengaruh galat percobaan pada materi percobaan ke-j yang mendapat perlakuan ke-i.

Setelah dilakukan perhitungan analisis statistik menggunakan ragam rancangan acak kelompok dilakukan Uji F sebagai berikut :

$F_{hit} < F_{tabel}$ maka tidak ada pengaruh perlakuan lama waktu pemaparan daging ayam terhadap total bakteri, pH dan kandungan protein daging ayam.

$F_{hit} \geq F_{tabel}$ terdapat pengaruh perlakuan lama waktu pemaparan daging ayam terhadap total bakteri, pH dan kandungan protein daging ayam.

Hipotesis statistik yang digunakan pada penelitian ini adalah :

$H_0 : \tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = 0$, tidak ada pengaruh perlakuan lama waktu pemaparan daging ayam terhadap total bakteri, pH dan kandungan protein daging ayam.

$H_1 : \tau_1 \neq \tau_2 \neq \tau_3 \neq 0$, minimal ada satu perlakuan lama waktu pemaparan daging ayam terhadap total bakteri, pH dan kandungan protein daging ayam.