

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian Deskriptif yaitu penelitian yang bertujuan untuk mendeskripsikan atau memberikan gambaran terhadap obyek yang diteliti melalui sampel yang telah terkumpul (Sukmadinata, 2006). Pada penelitian ini peneliti memberikan gambaran tentang obyek yang diteliti yaitu Daging Ayam Potong yang disimpan pada suhu ruang ( $25^{\circ}\text{C}$ - $35^{\circ}\text{C}$ ) untuk mengetahui cemaran dari segi fisik, mikrobiologi (total mikroorganisme, Bakteri *Salmonella sp.*) dan kimia (formalin) sehingga diperoleh data hasil penelitian yang dapat diambil kesimpulan secara umum. Desain penelitian yang digunakan adalah *Quasi Experiment Design* dimana sampel yang diambil tidak secara random melainkan ditentukan oleh peneliti sendiri (Cresswel, 2008). Pada penelitian ini kelompok kontrol yaitu daging ayam potong yang disimpan pada suhu ruang ( $25^{\circ}\text{C}$ - $35^{\circ}\text{C}$ ) selama 0 jam sedangkan kelompok lain yaitu daging ayam potong yang disimpan pada suhu ruang ( $25^{\circ}\text{C}$ - $35^{\circ}\text{C}$ ) selama 3 jam dan 6 jam.

#### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari -- Maret 2020 dengan tempat penelitian:

1. Tempat penjualan daging ayam potong yaitu pasar Tambak Rejo Kota Surabaya untuk pengambilan sampel berupa daging ayam potong sebanyak 3 ekor yang diambil pada jam ke 0,3 dan 6.
2. Laboratorium Biologi Lingkungan dan Biomarker Balai Besar Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pengendalian Penyakit Kota Surabaya untuk analisis total cemaran mikroorganisme dan adanya *Salmonella sp.*
3. Laboratorium Kimia Padat/Cair Balai Besar Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pengendalian Penyakit Kota Surabaya untuk analisis adanya formalin.

### 3.3 Bahan dan Alat

#### 3.3.1 Bahan

- a. Media yang digunakan pada uji *Salmonella* sp yaitu *Buffer Pepton Water (BPW)*, *Selenite Cystine Broth (SCA)*, *Salmonella Shigella Agar (SSA)*
- b. Media yang digunakan pada pewarnaan gram yaitu larutan pewarnaan gram ungu *Crystal violet*, *Lugol/iodine*, *Alkohol 96%*, *Safranin*, *Aquadesrt* , *Minyak emersi*.
- c. Media yang digunakan pada uji Biokimia yaitu *Triple Sugar Iron Agar (TSIA)*, *Media Agar NA Miring*.
- d. Media yang digunakan pada uji ALT yaitu media *Plate Count Agar(PCA)*, *Aquadest*, *Aquadest steril*
- e. Bahan untuk uji formalin yaitu larutan asam fosfat 85%, *Pereaksi Schiff*, *Larutan asam sulfat 96%*, *Aquadest*.

#### 3.3.2 Alat

- a. Alat yang digunakan pada uji *Salmonella* sp yaitu *coolbox*, wadah steril, mortar dan alu, timbangan, erlenmeyer, laminar air flow (LAF), incubator, autoklaf, lemari pendingin, ose bulat, cawan petri, gelas arloji, batang pengaduk, gelas ukur, bunsen, korek api.
- b. Alat yang digunakan pada untuk pewarnaan gram yaitu *object glass*, *cover glass*, mikroskop, Bunsen, korek api, pipet tetes, rak pewarnaan.
- c. Alat yang digunakan untuk uji biokimia yaitu tabung reaksi, rak tabung reaksi, tabung durham, laminar air flow (LAF), incubator, bunsen, korek api, ose bulat, pipet tetes, pipet ukur, bola hisap.
- d. Alat yang digunakan untuk uji ALT yaitu tabung reaksi, rak tabung reaksi, bunsen, stomacher, mikropipet, cawan petri, laminar air flow (LAF), incubator, colony counter.
- e. Alat yang digunakan untuk uji formalin yaitu neraca analitik, seperangkat alat destilasi, gelas beker, labu alas bulat, tabung reaksi, thermometer, pipet tetes.

### **3.4 Populasi dan Sampel**

#### **3.4.1 Populasi**

Populasi dalam penelitian ini adalah daging ayam potong yang dijual oleh pedagang di pasar tradisional Kota Surabaya.

#### **3.4.2 Sampel**

Sampel dalam penelitian ini adalah daging ayam potong yang dijual di pasar tradisional Kota Surabaya yaitu pasar Tambak Rejo dengan jumlah pembelian ayam yaitu 3 ekor dengan 3 perlakuan lama penyimpanan pada suhu ruang (25-35°C). Daging ayam yang baru disembelih dan belum mengalami penyimpanan pada suhu ruang diberi kode R0, daging ayam yang telah disembelih dan dijajakan secara terbuka di meja penjualan pada suhu ruang (25-35°C) selama 3 jam diberi kode R3, sedangkan untuk daging ayam yang telah disembelih dan dijajakan secara terbuka di meja penjualan pada suhu ruang (25-35°C) selama 6 jam diberi kode R6.

#### **3.4.3 Kriteria Sampel**

Kriteria sampel yang diambil yaitu:

Pengambilan sampel di pasar tradisional dilakukan dengan mendatangi pedagang yang hanya menjual ayam potong dengan jumlah daging ayam yang dijual >10 ekor dengan waktu penjualannya > 6 jam, pemilihan sampel dengan mengambil sampel daging ayam yang tidak dihangapi alat, berwarna putih, mengkilap (Asfawi, 2012).

### **3.5 Variabel Penelitian**

Variabel merupakan ukuran atau ciri yang dimiliki oleh anggota-anggota suatu kelompok yang berbeda dengan dimiliki oleh kelompok lain. (Noroadmodjo, 2002).

#### **1. Variabel Bebas (*Independent variabel*)**

Variabel bebas yaitu variabel yang dimanipulasi oleh peneliti untuk menciptakan suatu dampak pada variabel terikat (*Dependent variable*) (Setiadi, 2013).

Variabel bebas pada penelitian ini adalah lama penyimpanan daging ayam pada suhu ruang (25-35°C).

## 2. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas (Setiadi, 2013).

Variabel terikat pada penelitian ini adalah cemaran total mikroorganisme, *Salmonella* sp. dan formalin pada daging ayam.

### 3.6 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional penelitian menurut Sugiyono (2015) adalah suatu atribut atau sifat atau nilai dari objek atau kegiatan yang memiliki variasi tertentu yang telah ditetapkan oleh peneliti atau dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya. Dari penelitian yang dilakukan dapat dirumuskan definisi operasionalnya sebagai berikut:

Tabel 2. Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Lama Penyimpanan Daging Ayam	Melakukan penyimpanan daging ayam dengan perlakuan langsung diperiksa (0 jam) dan penyimpanan daging ayam pada suhu ruang (25-35°C) selama 3 jam dan 6 jam.	-	-	Ordinal
Fisik Daging Ayam	Mengamati fisik daging ayam meliputi warna, bau dan tekstur melalui lama penyimpanan pada suhu ruang (25-35°C) selama 0 jam, 3 jam dan 6 jam.	Pengamatan fisik daging ayam utuh sesuai indikator SNI (2010).	Dikatakan aman jika sesuai dengan indikator yang telah ditetapkan SNI (2010) yaitu: Warna untuk daging & kulit yaitu putih kekuningan.	Ordinal
Total Mikroorganisme pada daging ayam	Menghitung total mikroorganismse ( bakteri, kapang, khamir) yang terdapat pada daging ayam yang disimpan pada suhu ruang (25-	Uji total mikroorganismse menggunakan metode hitung cawan	Dikatakan aman jika Total mikroorganismse ( maks $1 \times 10^6$ CFU/g). Dikatakan tidak aman jika Total Mikroorganismse melebihi $>1 \times 10^6$ CFU/g.	Rasio

	35°C) selama 0 jam, 3 jam dan 6 jam.			
Adanya Salmonella sp. pada daging ayam	Mengidentifikasi adanya Salmonella sp. pada daging ayam yang disimpan pada suhu ruang (25-35°C) selama 0 jam, 3 jam dan 6 jam.	Isolasi dan Identifikasi Salmonella sp menggunakan: 1. Media SSA 2. Pewarnaan gram 3. Uji biokimia (Uji TSIA, NA Miring)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dikatakan aman jika tidak ditemukan Salmonella sp. pada daging ayam.</li> <li>• Dikatakan tidak aman jika ditemukan Salmonella sp. pada daging ayam.</li> </ul>	Nominal
Adanya Formalin	Mengidentifikasi adanya formalin pada daging ayam yang disimpan pada suhu ruang (25-35°C) selama 0 jam, 3 jam dan 6 jam.	Uji Kualitatif formalin dengan metode destilasi	Dikatakan aman jika sesuai dengan Permenkes Republik Indonesia No. 1168/Menkes/PER/X/1999 yaitu tidak ditemukan formalin pada daging ayam yang ditandai dengan tidak terjadi perubahan warna menjadi ungu.	Nominal

### 3.7 Metode Penelitian (Prosedur Penelitian)

#### 3.7.1 Cara Pengambilan Sampel

Menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan seperti wadah sampel steril yang cukup untuk memuat daging ayam utuh, coolbox, label dan sarung tangan. Selanjutnya membeli sampel daging ayam lalu diletakkan ke dalam wadah steril dimasukkan ke dalam coolbox dan diberi label kemudian segera bawa ke laboratorium untuk dilakukan analisis.

#### 3.7.2 Uji Mikrobiologi

Sebelum melakukan uji mikrobiologi dilakukann pengujian fisik dengan cara pengamatan secara fisik terhadap daging ayam sesuai dengan syarat yang tertera pada SNI 2010 yaitu pengamatan pada daging, kulit, aroma dan tekstur.

##### a. Total Mikroorganisme

Untuk menghitung total cemaran mikroorganisme dalam daging ayam dilakukan pengujian menggunakan metode hitung cawan yaitu

menumbuhkan sel-sel mikroba yang masih hidup pada suatu atau beberapa media sehingga sel tersebut berkembang biak dan membentuk koloni-koloni yang dapat dilihat langsung dengan mata telanjang tanpa mikroskop, dan koloni dapat dihitung menggunakan colony counter (Yunita, Merisa dkk, 2015).

b. *Salmonella* sp.

Untuk identifikasi *Salmonella* sp. pada daging ayam terlebih dahulu dilakukan tahap *pra-enrichment* menggunakan Buffer Pepton Water (BPW) yang bertujuan untuk homogenisasi dan memperbanyak bakteri. Selanjutnya, dilakukan tahap *enrichment* menggunakan Selenite Cystine Broth yang bertujuan untuk penyuburan/memperkaya *Salmonella* sp lalu dilanjutkan ke tahap isolasi menggunakan media selektif SSA (*Salmonella Shigella* Agar) yang berfungsi untuk mengisolasi *Salmonella* dan menyeleksi pertumbuhan yang diperlukan dari campuran mikroba-mikroba lain yang terdapat dalam bahan yang akan diperiksa. Kemudian dilanjutkan dengan uji biokimia untuk mengkonfirmasi dugaan bakteri *Salmonella* sp. menggunakan uji TSIA, Na miring untuk mengidentifikasi bakteri hasil isolasi melalui sifat fisiologinya dan pewarnaan gram untuk melihat morfologi bakteri dan membedakan sifat bakteri gram positif dan gram negatif.

### 3.7.3 Uji Kualitatif Formalin

Untuk uji kualitatif formalin pada daging ayam dilakukan pengujian menggunakan metode destilasi yang bertujuan untuk menguapkan senyawa formalin yang terdapat dalam daging ayam.

## 3.8 Metode Analisis

### 3.8.1 Uji Fisik (SNI, 2010)

Hasil yang diperoleh pada saat pengamatan dibandingkan kembali sesuai syarat daging broiler yang baik menurut (SNI 01 -4258-2010), yaitu:

- a. Warna putih kekuningan cerah (tidak gelap, tidak pucat, tidak kebiruan, tidak terlalu merah).
- b. Warna kulit ayam putih kekuningan, cerah, mengkilat dan bersih. Bila

disentuh, daging terasa lembab dan tidak lengket (tidak kering).

Bau spesifik daging (tidak ada bau menyengat, tidak berbau amis, tidak berbau busuk).

- c. Konsistensi otot dada dan paha kenyal, elastis (tidak lembek). Bagian dalam karkas dan serabut otot berwarna putih agak pucat, pembuluh darah leher dan sayap kosong (tidak ada sisa – sisa darah).

### **3.8.2 Uji Mikrobiologi(Prosedur Kerja Laboratorium Biologi BBTKLPP Surabaya Edisi 6, 2019)**

#### **a. Total Mikroorganisme**

Analisis total mikroorganisme dilakukan dengan menimbang 25 gram sampel secara aseptis dan dimasukkan kedalam wadahsteril dan ditambahkan dengan 225 ml Aquades Steril kemudian di stomacher selama 2 menit. Selanjutnya tuangkan Aquades Steril sebanyak 9 ml kedalam tabung reaksi steril dan kemudian ditambahkan 1 ml suspensi pengenceran  $10^{-1}$  dengan pipet steril ke dalam larutan 9 ml Aquades Steril untuk mendapatkan pengenceran  $10^{-2}$ . Lakukan pengenceran  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  dan  $10^{-6}$  dengan cara yang sama. Kemudian 1 ml suspensi dari setiap pengenceran dimasukkan ke dalam cawan petri steril. Tuangkan media PCA yang sudah di dinginkan hingga suhu  $45^{\circ}\text{C}$  kedalam cawan petri yang telah berisi suspensi dan digerakkan secara hati-hati untuk menyebarkan sel-sel mikroba secara merata, yaitu dengan gerakan seperti angka delapan. Setelah agar membeku, cawan diinkubasi dengan posisi terbalik pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama  $24\pm 2$  jam. Setelah di inkubasi dihitung jumlah koloni yang tumbuh.

Cara perhitungan Angka Lempeng Total yaitu mula-mula hitung semua koloni yang tumbuh dalam setiap cawan petri yang berisi 25-250 koloni dengan menggunakan *colony counter*. Perhitungan dilakukan sesuai dengan aturan menurut APHA 2002 (Lukman *et al*, 2009). Hitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Jumlah mikroba} = \text{Jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{Tingkat Pengenceran}}$$

b. *Salmonella* sp.

1. Preparasi sampel dan *pre-enrichment*

Sampel yang didalam plastic klip ditimbang sebanyak 25 gram secara aseptik kemudian masukkan kedalam wadah steril. Tambahkan dengan larutan *Buffer Pepton Water* (BPW) sebanyak 225 ml kedalam wadah steril yang berisi sampel. Kemudian dihomogenkan hingga larutannya menjadi homogeny satu sama lain lalu pindahkan suspense ke labu erlenmeyer. Setelah itu diinkubasikan pada temperature 35,5<sup>0</sup>C selama 24 jam ± 2 jam.

2. Tahap *Enrichment* *Salmonella* sp.

Tahap ini dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 1 ml suspensi dari tahap *Pre-enrichment* dan diinokulasikan ke dalam 9 ml media *Selenite Cystine Broth* (SCB), kemudian diinkubasi pada suhu 35,5<sup>0</sup>C selama 24 jam ± 2 jam.

3. Isolasi

Isolasi dilakukan dengan menggoreskan 1 ose media *Selenite Cystine Broth* (SCB) pada media padat *Salmonella Shigella Agar* (SSA), kemudian diinkubasi pada suhu 35,5<sup>0</sup>C selama 24 jam ± 2 jam. Setelah itu amati koloni *Salmonella* sp. yang tumbuh pada media SSA. Koloni yang terbentuk pada media SSA adalah berbentuk kecil, bulat, warna keruh atau tidak berwarna dengan bintik hitam ditengah. Kemudian koloni yang positif diambil untuk dilanjutkan dilanjutkan ke uji biokimia dan pewarnaan Gram.

4. Uji Biokimia

a. UJI TSIA

Koloni diambil dari media SSA yang diduga positif (+) tersebut kemudian diinokulasikan ke TSIA dengan cara menusuk sampai sepertiga dasar tabung kemudian diangkat dan digores secara zig zag pada media agar

miring kemudian inkubasikan pada suhu 35,5°C selama 24 jam. Hasil uji positif Salmonella berupa pada dasar agar berwarna kuning, pada agar miring berwarna merah, terdapat H<sub>2</sub>S berwarna hitam serta bisa terdapat gas ataupun tidak.

b. Na Miring

Koloni diambil dari media SSA yang diduga positif (+) tersebut kemudian diinokulasikan ke TSIA dengan cara menusuk sampai sepertiga dasar tabung kemudian diangkat dan digores secara zig zag pada media agar miring kemudian inkubasikan pada suhu 35,5°C selama 24 jam. Hasil uji dilanjutkan untuk pewarnaan gram.

c. Pewarnaan gram (Darmawan, 2017)

Objek glass ditetaskan *aquades* atau NaCl 1 tetes, kemudian koloni bakteri pada media SSA diletakkan pada kaca objek dan difiksasi di atas bunsen. Preparat yang telah difiksasi kemudian ditetesi dengan *crystal violet* lalu didiamkan selama 1 – 2 menit. Sisa zat warna dibuang, kemudian dibilas dengan air mengalir. Seluruh preparat ditetesi dengan larutan *lugol* dan biarkan selama 30 detik. Buang larutan *lugol* dan bilas dengan air mengalir. Preparat dilunturkan dengan alkohol 96 % sampai semua zat warna luntur, dan segera cuci dengan air mengalir. Teteskan dengan zat warna *safranin*, biarkan selama 2 menit lalu bilas dengan air mengalir kemudian dibiarkan kering, amati di bawah mikroskop dengan pembesaran objektif 100x memakai emersi. Hasil pewarnaan bakteri Gram positif adalah ungu, dan pewarnaan bakteri Gram negatif adalah merah. Untuk bakteri Salmonella yang merupakan bakteri Gram negatif akan menunjukkan warna merah saat diamati di bawah mikroskop.

### **3.8.3 Uji Kualitatif Formalin (Sudjarwo dkk, 2012)**

Menimbang masing-masing sampel daging ayam sebanyak 10gram dengan menggunakan neraca analitik kemudian dipotong-potong lalu dimasukkan ke dalam labu destilat, ditambahkan 50 ml aquades, kemudian diasamkan dengan 1 ml asam fosfat 85%. Labu destilat dihubungkan dengan pendingin dan didestilasi dengan destilator menggunakan suhu 90<sup>0</sup>C.. Hasil destilat ditampung dalam labu ukur 50 ml. uji kualitatif dilakukan dengan menggunakan uji warna pereaksi Schiff. Diambil 1 ml hasil destilat dalam tabung reaksi, ditambahkan 1 ml asam sulfat 96% 1:1 lewat dinding, kemudian ditambahkan 1 ml pereaksi Schiff, jika terbentuk warna merah keunguan hal ini berarti positif mengandung formalin.

## **3.9 Pengolahan, Penyajian dan Analisis Data**

### **3.9.1 Pengujian Fisik**

Data karakteristik mutu fisik daging ayam dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel.

### **3.9.2 Pengujian Angka Lempeng Total**

Data uji angka lempeng total daging ayam dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel spss terhadap pengaruh lama penyimpanan

### **3.9.3 Pengujian Salmonella sp.**

Data uji Salmonella sp. pada daging ayam dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel.

### **3.9.4 Pengujian Formalin**

Data hasil pengujian formalin pada daging ayam dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel.