

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan penelitian

Dalam penelitian ini digunakan jenis penelitian *True Experimental* (eksperimen murni). Rancangan penelitian ini adalah rancangan percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 kelompok perlakuan.

Perbandingan konsentrasi bawang putih dan kunyit (%b/b) yaitu :

Bawang putih (%)	: 0	10	7	5	3	0
Kunyit (%)	: 0	0	3	5	7	10

Jumlah kunyit dan bawang putih yang digunakan dalam perlakuan disesuaikan dengan kebutuhan kunyit dan bawang putih dalam bumbu kuning untuk 100 gram ayam. Dipilih enam konsentrasi tersebut karena pada penelitian sebelumnya bubur kunyit dengan konsentrasi 10% efektif menghambat pertumbuhan mikroba pada hari ke-1 penyimpanan dilihat dari total mikroba dibandingkan dengan kelompok kontrol (Purwani, 2008).

4.2 Sampel

Pada penelitian ini daging ayam yang digunakan dalam penelitian adalah daging ayam bagian dada yang diperoleh dari Rumah Pemotongan Ayam “Sentral Pangan” di Pasar Oro-Oro Dowo, Malang. Rempah Bawang putih dan Kunyit diperoleh dari pedagang rempah di Pasar Merjosari, Malang.

4.2.1 Perhitungan Sampel

Dasar dari perhitungan pengulangan sampel penelitian adalah dengan rumus:

$$P(n-1) \geq 16$$

Keterangan : p = jumlah perlakuan (6 konsentrasi)

n = jumlah ulangan yang diperlukan

$$P(n-1) \geq 16$$

$$6(n-1) \geq 16$$

$$6n-6 \geq 16$$

$$6n \geq 22$$

$$n \geq 3,7$$

berdasarkan perhitungan di atas, pengulangan yang dilakukan paling sedikit 4 kali. Dalam penelitian ini dilakukan 2 kali pengulangan dengan setiap ulangan dilakukan secara duplo.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi kunyit (*curcuma domestica*) dan bawang putih (*allium sativum*) dalam berbagai kelompok perlakuan.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *salmonella sp* dalam daging ayam.

4.3.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah suhu penyimpanan daging ayam yaitu di suhu ruang/suhu kamar (25°C).

4.4 Lokasi dan Waktu penelitian

Penelitian ini terdiri dari penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Penelitian pendahuluan dilaksanakan di Laboratorium Penyelenggaraan Makanan Jurusan Gizi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sedangkan penelitian utama dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian pendahuluan dan penelitian utama dilaksanakan pada bulan Maret 2013.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Alat

4.5.1.1 Alat pembuatan bumbu kunyit dan bawang putih

- Baskom
- Blender
- Pisau
- Gelas ukur
- Timbangan analitik
- Sendok makan

4.5.1.2 Alat penyimpanan daging

- Plastik HDPE
- Baskom/ mangkok plastik

4.5.1.3 Alat uji *Salmonella sp*

Menurut SNI 2008, peralatan untuk pengujian *Salmonella sp* yaitu :

- Cawan petri
- Tabung reaksi

- Rak tabung reaksi
- Pipet
- Botol media
- Gunting
- Pinset
- Jarum inokulasi (ose)
- *Stomacher*
- Pembakar Bunsen
- timbangan
- *magnetic stirrer*
- pengocok tabung (vortex)
- incubator
- penangas air
- autoklaf
- lemari steril
- lemari pendingin
- freezer

4.5.2 Bahan

4.5.2.1 Bahan pembuatan bubur kunyit dan bawang putih

- Kunyit
- Bawang putih
- Kertas label

4.5.2.2 Bahan isolasi *Salmonella sp*

- Media SSA (*Salmonella Shigela Agar*)

4.5.2.3 Bahan identifikasi *Salmonella sp*

- *Reagen Kovacs*
- *Urea broth*
- *Tryptose Broth*
- *Simmons Citrate Agar (SCA)*
- *Methyl Red*
- *MR-VP (Methyl Red-VogesProskauer)*

4.6 Definisi Operasional

- a. Konsentrasi kunyit adalah bubuk kunyit yang dihasilkan dari proses penghalusan 25 gram kunyit dan 20 ml air dengan menggunakan blender. Kunyit diperoleh dari pasar merjosari malang.
- b. Konsentrasi bawang putih adalah bubuk bawang putih yang dihasilkan dari proses penghalusan 25 gram bawang putih dan 20 ml air dengan menggunakan blender. Bawang putih diperoleh dari pasar merjosari malang.
- c. Daging ayam adalah daging ayam bagian dada dari ayam broiler 2 jam setelah pemotongan (proses pelayuan belum selesai) yang diperoleh dari Rumah Pemotongan Ayam di Pasar Oro-oro dowo.
- d. Jumlah Mikroba adalah banyaknya mikroba *Salmonella sp.* yang terdapat pada daging ayam yang telah mengalami perlakuan penelitian dan telah dikultur pada media SSA (*Salmonella Shigella Agar*) kemudian diamati pada jam ke-0, 4, 8 dan 24.

4.7 Prosedur Penelitian

Daging ayam broiler yang didapatkan dari Rumah Pemotongan Ayam di Pasar Oro-oro dowo dibagi sebesar masing-masing ± 80 gram setiap perlakuan. Kemudian sampel ditambahkan bumbu rempah-rempah sesuai dengan perlakuan.

Pembagian sampel dalam berbagai perlakuan sebagai berikut :

P_0 = tanpa pemberian kunyit dan bawang putih

P_1 = pemberian bawang putih 10%

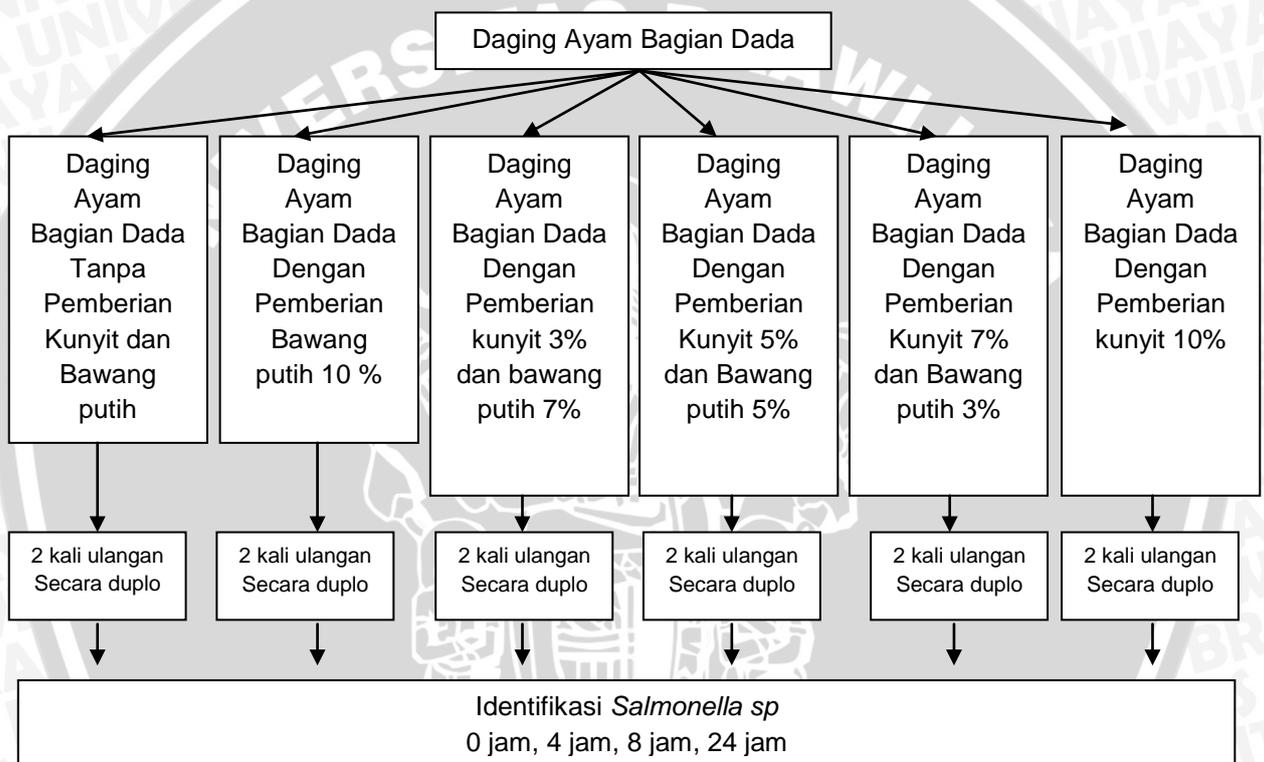
P_2 = pemberian bawang putih 7% dan kunyit 3%

P₃ = pemberian bawang putih 5% dan kunyit 5%

P₄ = pemberian bawang putih 3% dan kunyit 7%

P₅ = pemberian kunyit 10%

Seluruh sampel yang telah diberi perlakuan diletakkan di suhu ruang dan diuji *Salmonella sp* pada 0 jam, 4 jam, 8 jam dan 24 jam. Diagram Alir penelitian dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Diagram Alir Penelitian

4.7.1 Prosedur Pembuatan Bubur Kunyit dan Bawang putih

4.7.1.1 Pembuatan Bubur Kunyit

- a. Menyiapkan bahan dan alat pembuatan bubur rimpang kunyit, seperti: blender, pisau, timbangan dan rimpang kunyit.

- b. Untuk 100 gram ayam, dibutuhkan total 10 gram bumbu. Sehingga total untuk seluruh perlakuan yang menggunakan kunyit dibutuhkan 25 gram rimpang kunyit.
- c. Rimpang kunyit dikupas, dicuci dengan air mengalir kemudian dipotong kecil-kecil dan dihaluskan dengan cara di blender dan ditambahkan air sebanyak 5 ml di setiap pembuatan konsentrasi.
- d. Bubur kunyit dibagi sesuai dengan konsentrasi perlakuan.

4.7.1.2 Pembuatan Bubur Bawang putih

- a. Mempersiapkan bahan dan alat pembuatan bubur bawang putih, seperti: blender, pisau, timbangan dan bawang putih.
- b. Untuk 100 gram ayam, dibutuhkan total 10 gram bumbu. Sehingga untuk seluruh perlakuan yang menggunakan bawang putih digunakan 25 gram bawang putih.
- c. Umbi bawang putih dikupas, dicuci dengan air mengalir kemudian dipotong kecil-kecil dan dihaluskan dengan cara di blender dan ditambahkan 5 ml air di setiap pembuatan konsentrasi.
- d. Bubur bawang putih dibagi sesuai dengan konsentrasi perlakuan.

4.7.2 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat yang akan digunakan sebelum semua peralatan digunakan yaitu dengan cara membungkus semua peralatan menggunakan kertas, kemudian dimasukkan kedalam plastik, seperti cawan petri, tabung reaksi, lalu dimasukkan ke dalam autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psc (per

square inci) selama kurang lebih 15 menit. Untuk alat yang tidak tahan panas tinggi disterilisasi dengan zat kimia berupa alkohol 70% (Utami, 2004).

4.7.3 Prosedur Analisa *Salmonella sp* (SNI 2897 : 2008)

Prinsip : Sampel daging ayam ditumbuhkan pada media agar, maka apabila sampel tersebut mengandung mikroorganisme akan tumbuh koloni yang dapat dihitung.

4.7.3.1 Preparasi Sampel

- a. Timbang contoh padat sebanyak 1 gr secara aseptik, haluskan kemudian masukkan dalam wadah steril.
- b. Tambahkan 10 ml larutan *NaCl* 0,9 % steril ke dalam kantong steril yang berisi contoh, homogenkan dengan *vortex* selama 1 menit sampai dengan 2 menit. Ini merupakan larutan dengan pengenceran 10^{-1} .

4.7.3.2 Cara Pengujian

- a. Pindahkan 1 ml suspensi pengenceran 10^{-1} tersebut dengan pipet steril ke dalam larutan 9 ml *NaCl* untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} .
- b. Buat pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} dan 10^{-5} dengan cara yang sama seperti butir a sesuai kebutuhan.
- c. Setiap pengenceran tersebut ditanam dalam media agar SSA (*Salmonella Shigella Agar*) yang berwarna merah dengan cara goresan dan diratakan (*streaking*).

- d. Inkubasikan pada temperatur 37°C selama 24 jam sampai dengan 48 jam dengan meletakkan cawan pada posisi terbalik.
- e. Koloni *salmonella* dalam cawan SSA berbentuk bulat dengan inti berwarna hitam.
- f. Lakukan identifikasi dengan mengambil koloni dari media SSA (*Salmonella Shigella Agar*). Inokulasikan ke *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) dengan cara menusuk ke dasar media agar selanjutnya digores pada media agar miring.
- g. Inkubasikan pada temperatur 35°C selama 24 jam ± 2 jam. Amati koloni spesifik *Salmonella* dengan hasil reaksi seperti tercantum pada tabel 4.1

Tabel 4.1. Hasil Uji *Salmonella* pada TSIA

Media	Bagian Miring (<i>Slant</i>)	Bagian Dasar (<i>Butt</i>)	H ₂ S	Gas
TSIA	Alkalin / K (merah)	Asam / A (kuning)	Positif (hitam)	Negatif/ positif

Sumber : SNI 2897:2008

4.7.3.3 Uji Identifikasi *Salmonella sp*

Uji identifikasi *salmonella sp* menggunakan uji urease dilanjutkan uji biokimia dengan uji IMViC (Indole, Methyl Red, Voges-Proskauer, Citrate).

4.7.3.3.1 Uji urease

- a. Inokulasikan koloni dari positif *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) dengan ose ke *Urea Broth*.
- b. Inkubasikan pada temperatur 35°C selama 24 jam ± 2 jam.

- c. Hasil uji spesifik *Salmonella* adalah negative uji urease.

4.7.3.3.2 Uji indole

- a. Inokulasikan koloni dari media *Triple Sugar Iron Agar (TSIA)* pada *Tryptose Broth* dan inkubasikan pada temperatur 35°C selama 24 jam ± 2 jam.
- b. Tambahkan 0,2 ml sampai dengan 0,3 ml *Reagen Kovacs*.
- c. Hasil uji positif ditandai dengan adanya cincin merah di permukaan media.
- d. Hasil uji negatif ditandai dengan terbentuknya cincin kuning.
- e. Hasil uji spesifik *Salmonella* adalah negative uji indole.

4.7.3.3.3 Uji citrate

- a. Inokulasikan koloni *Triple Sugar Iron Agar (TSIA)* ke dalam *Simmons Citrate Agar (SCA)* dengan ose.
- b. Inkubasikan pada temperatur 35°C selama 96 jam ± 2 jam.
- c. Hasil uji positif ditandai adanya pertumbuhan koloni yang diikuti perubahan warna dari hijau menjadi biru.
- d. Hasil uji negatif ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni atau tumbuh sangat sedikit dan tidak terjadi perubahan warna.
- e. Umumnya *Salmonella* memberikan hasil positif pada uji citrate.

4.7.3.3.4 Uji Voges-Proskauer (VP)

- a. Dari media *Triple Sugar Iron Agar (TSIA)* yang mencari *Salmonella* diambil biakan dengan ose lalu diinokulasi ke tabung yang berisi

10 ml media MR-VP dan diinkubasi pada temperatur 35°C selama 48 jam ± 2 jam.

- b. Dipindahkan 5 ml media MR-VP ke tabung reaksi dan ditambahkan 0,6 ml larutan α -naphthol dan 0,2 ml KOH 40% kemudian digoyang-goyang sampai tercampur dan didiamkan.
- c. Untuk mempercepat reaksi ditambahkan kristal kreatin. Hasil dibaca setelah 4 jam.
- d. Hasil uji positif apabila terjadi perubahan warna pink sampai merah delima.
- e. Umumnya *Salmonella* memberikan hasil negatif untuk uji VP (tidak terjadi perubahan warna pada media).

4.7.3.3.5 Uji *Methyl Red* (MR)

- a. Sebanyak 5 ml media MR-VP yang telah diinokulasi dengan biakan dari media *Triple Sugar Iron Agar (TSIA)* yang menciri *Salmonella* diinkubasikan kembali pada temperatur 35°C selama 48 jam ± 2 jam.
- b. Ditambahkan 5-6 tetes indikator *Methyl Red* pada tabung.
- c. Hasil uji positif ditandai dengan adanya difusi warna merah ke dalam media.
- d. Hasil uji negatif ditandai dengan terjadinya warna kuning pada media. Umumnya *Salmonella* memberikan hasil positif untuk uji *Methyl Red*.

4.7.3.4 Interpretasi hasil

Interpretasi hasil uji biokimia *salmonella sp* dapat dilihat pada tabel 4.2 sedangkan criteria penentuan non *salmonella sp* dapat dilihat pada tabel 4.3

Tabel 4.2 Reaksi Biokimia *Salmonella sp*

No.	Pengujian	Hasil Reaksi		Reaksi <i>Salmonella sp</i>
		Positif	Negatif	
1	Glukosa (TSI)	Sepanjang bekas tusukan berwarna kuning	Sepanjang bekas tusukan berwarna merah	Positif
2	H ₂ S (TSI)	Hitam	Tidak hitam	Positif
3	Urease	Warna ungu sampai merah	Tidak ada perubahan warna	Negatif
4	Uji Indol	Permukaan berwarna merah	Permukaan berwarna kuning	Negatif
5	Uji Voges Proskauer (VP)	Merah muda sampai merah	Tidak ada perubahan warna	Negatif
6	Uji Methyl Red (MR)	Warna merah menyebar	Warna kuning menyebar	Positif
7	Simmons Citrate	Ada pertumbuhan, warna biru	Tidak ada pertumbuhan dan perubahan warna	Variabel

Sumber : SNI (2008)

Tabel 4.3 Kriteria penentuan non *Salmonella sp*

No.	Pengujian	Hasil (non <i>Salmonella</i>)
1	Urease	Positif (warna ungu sampai merah)
2	Uji Indol dan Polyvalent Flagellar (H)	Positif (warna merah pada permukaan) Negatif (tidak ada penggumpalan)
3	Uji VP Uji MR	Positif (merah muda sampai merah) Negatif (warna kuning menyebar)

Sumber : SNI (2008)

4.7.3.5 Perhitungan Koloni

Perhitungan koloni dilakukan dengan berbagai ketentuan BAM (2001), antara lain :

- Cawan yang normal berisi 25 – 250 koloni. Semua koloni dihitung termasuk titik yang berukuran kecil. Pengenceran dan jumlah koloni semua dicatat untuk setiap cawan.
- Cawan yang berisi lebih dari 250 koloni dicatat sebagai TBUD (Terlalu Banyak Untuk Dihitung). Jika tidak ada koloni yang tumbuh maka ditulis kurang dari 1 kali pengenceran terendah.
- Rumus perhitungan yang digunakan adalah :

$$N = \frac{\Sigma C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)] \times (D)}$$

Dimana : N = jumlah koloni per ml/ per gram produk

ΣC = jumlah seluruh koloni yang dihitung

n_1 = jumlah cawan pada pengenceran pertama

n_2 = jumlah cawan pada pengenceran kedua

D = pengenceran pertama yang dihitung

4.8 Analisa Data

Data jumlah mikroba *Salmonella sp* dari berbagai perlakuan dianalisis dengan menggunakan uji *Kruskal-Walis* untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi kunyit dan bawang putih terhadap jumlah *Salmonella sp*. Jika $P < 0,05$ maka uji dilanjutkan dengan uji *post-hoc* yaitu uji *Mann Whitney*. Sedangkan untuk mengetahui perbedaan pemberian kunyit dan

bawang putih terhadap jumlah mikroba *Salmonella sp* berdasarkan lama penyimpanan dilakukan uji friedman. Jika $P < 0,05$ maka uji dilanjutkan dengan uji wilcoxon. Teknis pengolahan data dianalisis secara komputerisasi menggunakan *Software Statistical Program and for Social Science 17* (SPSS 17).

