

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Fakultas Perikanan Universitas Dharmawangsa, Jl. K.L. Yos Sudarso No. 244 Medan.

3.2. Materi

3.2.1. Bahan

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah daging ikan patin segar, media *Plate Count Agar* (PCA), media *Buffer Pepton Water* (BPW), media *Natrium Agar* (NA), media *Eosin Methylen Blue Agar* (EMBA), media *Beird Park Agar* (BPA), telurit, kuning telur (*egg yolk*), NaCl fisiologis 0,85%, kristal violet, iodium *gram*, lugol, safranin, H₂O₂, alkohol 70%, alkohol 95%, spirtus, aquades, alumunium foil, plastik *wrap*, plastik *HDPE*, dan kapas.

3.2.2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat *Laminar Air Flow* dengan memanfaatkan lampu Ultra Violet yang ada di dalamnya dengan spesifikasi dosis 2,27 kGy. Dan Freezer box gea type sd186 sleding glass, Electronics, Others on Carousell Dengan spesifikasi : Suhu (°c) : -18 - -20, Tegangan : 220V / 1-Phase, Kapasitas (Liter) : 186, Daya : 196, Berat (Kg) : 43,

Penambahan Keranjang : 1 buah, Pendingin : R134a, Dimensi : Panjang (mm) 930 X Lebar (mm) 540 X Tinggi (mm) 850.

Alat pendukung lainnya adalah milkotester, pH meter, *conductivity* meter, labu *separating funnel*, vortex, mikroskop, spektrofotometer, inkubator, tabung ulir, tabung reaksi, botol *schott*, termometer, pipet tetes, labu erlenmeyer, gelas piala, pipet volumetrik, pipet mikro, penangas listrik (*water bath*), *autoclave*, bunsen, cawan petri, lemari es, tip, *stick hockey*, *hot plate*, *hitter*, oven, kaca objek, jarum ose, *sentrifuge*, tabung eppendorf.

3.3. Prosedur

a. Sampel Ikan

Sampel ikan uji pada penelitian menggunakan ikan patin (*Pangasius pangasius*) yang sudah siap untuk dikonsumsi oleh masyarakat. Ikan uji ini didapat dari swalayan atau supermarket yang ada di wilayah Medan yang sudah dalam bentuk kemasan dan yang sudah siap untuk dimasak (goreng). Kemudian banyaknya sampel ikan uji yang digunakan disesuaikan dengan Rancangan Percobaan pada penelitian ini yaitu menggunakan 4 perlakuan dan 3 kali ulangan jadi sampel yang dibutuhkan adalah 12 sampel daging ikan patin. Dan setiap potongan ikan sampel ini memiliki bobot seberat 20 gram yang akan ditimbang menggunakan timbangan analitik yang kemudian akan dibawa ke laboratorium Fakultas Perikanan Universitas Dharmawangsa.

b. Penyinaran dengan UV

Mekanisme rusaknya mikroorganisme oleh cahaya *UV* melibatkan gangguan DNA mikroorganisme dengan mencegah transkripsi dan replikasi DNA mikroorganisme (Guerrero-Beltran dan Barbosa-Canovas, 2004). Cahaya *UV* merusak DNA mikroorganisme dengan membentuk dimer timin (*thymine dimmers*). Dimer ini mencegah mikroorganisme dari transkripsi dan replikasi DNA yang akhirnya akan menyebabkan kematian sel (Miller *et al.*, 1999).

Adapun prosedur dari penyinaran Ultraviolet ini adalah ;

1. Sterilisasi wadah yang akan digunakan sebagai alas nya
2. Jarak sinar UV ke daging berkisar 20 cm
3. Penyusunan daging ikan patin tepat di bawah penyinaran lampu UV
4. Daging ikan patin dimasukan secara bergilir sesuai waktu yang telah ditentukan (20 menit)
5. Lama penyinaran 20 menit (600 Detik)
6. Panjang gelombang yang di gunakan 253,7 nm
7. Selama penyinaran pastikan jangan ada udara yang masuk agar tidak terkontaminsi oleh bakteri sekitar
8. Sebelum dilakukan sampel ikan uji dibungkus dengan menggunakan pelastik HDPE
9. Setiap ikan sempel diberi tanda dengan menulis jenis perlakuan nya.

c. Pembekuan

Pembekuan atau freezing ialah penyimpanan di bawah titik beku, jadi bahan disimpan dalam keadaan beku. Pembekuan yang baik dapat dilakukan pada suhu kira-kira -17°C atau lebih rendah lagi. Pada suhu ini pertumbuhan bakteri sama sekali berhenti. Pembekuan yang baik biasanya dilakukan pada suhu antara -12°C sampai -24°C . Dengan pembekuan, bahan akan tahan sampai beberapa bulan, bahkan kadang-kadang beberapa tahun. Atau dengan kata lain pembekuan adalah proses penurunan suhu bahan pangan sampai bahan pangan membeku, yaitu jika suhu pada bagian dalamnya paling tinggi sekitar -18°C , meskipun umumnya produk beku mempunyai suhu lebih rendah dari ini. Pada kondisi suhu beku ini bahan pangan menjadi awet karena mikroba tidak dapat tumbuh dan enzim tidak aktif. Bahan pangan seperti daging dapat disimpan antara 12 sampai 18 bulan, ikan dapat disimpan selama 8 sampai 12 bulan (Munzir, 2009). Adapun prosedur pembekuan dalam penelitian ini adalah;

1. penyetelan suhu freezer oleh operator terlebih dahulu
2. Sampel ikan uji yang telah diiradiasi dengan Ultraviolet kemudian dipindahkan ke freezer dengan suhu yang telah ditentukan yaitu -5°C , -10°C dan -15°C
3. Setiap perlakuan disimpan selama 5 hari
4. Penyimpanan daging ikan tidak terkontaminasi dengan bahan lain
5. Usahakan suhu dalam freezer tetap normal
6. Ikan uji yang akan dibekukan diberi pelastik HDPE
7. Setiap ikan sampel diberi tanda dengan menulis jenis perlakuan nya.

d. Persiapan Rangkaian Peralatan *UV* dan *Penyimpanan Suhu Beku*

Tipe *UV* yang digunakan dalam penelitian ini adalah *UV* tipe C dengan spektrum panjang gelombang elektromagnetik 253,7 nm. *Ultraviolet* yang digunakan sebanyak 1 buah dengan spesifikasi dosis 2,27 kGy. Dengan memanfaatkan alat laminar *Air flow* yang tersedia lampu Ultra Violet nya . Alat kulkas atau Freezer box gea type sd186 sleding glass, Electronics, Others on Carousell dengan spesifikasi : Suhu ($^{\circ}\text{C}$) : -18 - -20, Tegangan : 220V / 1-Phase, Kapasitas (Liter) : 186, Daya : 196, Berat (Kg) : 43, Penambahan Keranjang : 1 buah, Pendingin : R134a, Dimensi : Panjang (mm) 930 X Lebar (mm) 540 X Tinggi (mm) 850. Dengan perlakuan yang berbeda yaitu -5°C , -10°C , dan -15°C penyetelan suhu dilakukan dengan cara manual.

e. Tahapan Pengujian

Penelitian ini terbagi atas penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Penelitian pendahuluan meliputi Penyinaran iradiasi Ultra Violet dengan panjang gelombang 253,7 nm. Hasil terbaik dari perlakuan ini akan diambil sebagai metode yang akan dilanjutkan dengan suhu beku pada suhu -15°C . Penelitian pendahuluan dilanjutkan dengan penentuan jumlah frekuensi tegangan listrik yang akan diambil sebagai frekuensi yang digunakan pada penelitian utama.

3.4. Penelitian Pendahuluan

3.4.1. Penentuan Optimasi *UV*

Penelitian ini bertujuan untuk menekan jumlah mikroorganisme dalam daging ikan patin . Daging ikan patin segar disinari dengan ultra Violet dengan jarak 20 cm dengan 1 taraf perlakuan *UV*. Hasil dari perlakuan ini diambil untuk kemudian diuji

karakteristik fisik dan kimianya, serta reduksi mikroba. Karakteristik fisik dan kimia diukur dengan milkotester, pH Meter, *conductivity meter*, dan *viscometer*, sedangkan tingkat reduksi mikroba diukur dengan menghitung jumlah

3.4.2. Penentuan Suhu Beku

Hasil terbaik dari perlakuan *UV* diambil sebagai metode yang dilanjutkan dengan aplikasi *Suhu Beku*. Ikan patin segar dimasukkan dalam freezer dengan suhu yang berbeda yaitu berbeda -5°C , -10°C , dan -15°C . Masing masing hasil dari perlakuan ini diambil untuk kemudian diuji karakteristik fisik dan kimianya, serta dilihat tingkat reduksi mikroba. Karakteristik fisik dan kimia diukur dengan milkotester, pH Meter, *conductivity meter* dan *viscometer*, sedangkan tingkat reduksi mikroba diukur dengan menghitung jumlah lempeng total mikroba (*Total Plate Count*).

3.4.3. Uji Bakteri

a. Sterilisasi

Sterilisasi ini dilakukan sebelum dilakukannya penelitian, mulai dari ultraviolet dan suhu beku, begitu juga semua alat untuk pengecekan atau uji bakteri pada daging ikan patin yang telah di beri perlakuan, semua alat penelitian ini di sterilisasi dengan menggunakan *autoclav*. Siapkan aquades untuk mengisi autoklaf sampai batas volume yang ditentukan.

1. Masukkan semua alat gelas atau bahan lain yang pernah kontak dengan mikroba ke dalam autoklaf.
2. Pasang kunci pengaman autoklaf, tutup lubang pengeluaran uap, kemudian

- autoklaf dinyalakan pada suhu 121°C . waktu destruksi dihitung seama 30 menit setelah suhu yang diinginkan tercapai.
3. Matikan alat, keluarkan uapnya sampai tekanan dalam alat = 0, barulah alat gelas bisa dikeluarkan dari dalam autoklaf.
 4. Semua alat harus langsung dicuci dengan air sabun untuk menghindari perkembangan populasi mikroba yang baru.
 5. Alat gelas dikeringkan dengan cara ditiriskan(tidak boleh dengan lap), kemudian dapat dapat dibungkus sesuai dengan ketentuan yang berlaku bila akan disterilisasi lagi.

b. Inokulasi

Penanaman bakteri atau biasa disebut juga inokulasi. Inokulasi adalah pekerjaan memindahkan bakteri dari medium yang lama ke medium yang baru dengan tingkat ketelitian yang sangat tinggi. Untuk melakukan penanaman bakteri (inokulasi) terlebih dahulu diusakan agar semua alat yang ada dalam hubungannya dengan medium agar tetap steril, hal ini agar menghindari terjadinya kontaminasi (Dwijoseputro, 1998). Ada beberapa tahap yang harus dilakukan sebelum melakukan teknik penanaman bakteri (inokulasi) yaitu :

1. Menyiapkan ruangan Ruang tempat penanaman bakteri harus bersih dan keadannya harus steril agar tidak terjadi kesalahan dalam pengamatan atau percobaaan .dalam labotarium pembuatan serum vaksin dan sebagainya. Inokulasi dapat dilakukan dalam sebuah kotak kaca (encast) udara yang lewat dalam kotak tersebut

dilewatkan saringan melalui suatu jalan agar tekena sinar ultraviolet (Pelczar, 1986).

2. Pemindahan dengan dengan pipet Cara ini dilakukan dalam penyelidikan air minum atau pada penyelidikan untuk diambil 1 ml contoh yang akan diencerkan oleh air sebanyak 99 ml murni (Pelczar, 1986).
3. Pemindahan dengan kawat inokulasi Ujung kawat inokulasi sebaliknya dari platina atau nikel .ujungnya boleh lurus juga boleh berupa kolongan yang diametrnya 1-3mm. Dalam melakukan penanaman bakteri kawat ini terlebih dahulu dipijarkan sedangkan sisanya tungkai cukup dilewatkan nyala api saja setelah dingin kembali kawat itu disentuhkan lagi dalam nyala (Pelczar, 1986).

c. Inkubasi

Inkubasi merupakan suatu teknik perlakuan bagi mikroorganisme yang telah diinokulasikan pada media (padat atau cair), kemudian disimpan pada suhu tertentu untuk dapat melihat pertumbuhannya. Bila suhu inkubasi tidak sesuai dengan yang diperlukan, biasanya mikroorganisme tidak dapat tumbuh dengan baik. Media inkubasi digolongkan menjadi 2 jenis :

1. Pada lemari biasa atau suhu kamar,
2. Pada inkubator yang suhunya dapat di tentukan

Proses ini bertujuan agar kita dapat melihat pertumbuhan atau perkembangbiakan pada mikroorganisme.

d. Perhitungan Jumlah Bakteri

Penyebaran mikroorganisme yang tumbuh pada bahan hasil pertanian pada hasil olahnya pada umumnya terdiri dari bakteri, jamur/kapang, virus dan disamping itu terdapat juga binatang satu sel. Pertumbuhan dan perkembangan mikroorganisme dalam bahan (makanan), akan menyebabkan perubahan-perubahan tertentu yaitu : perubahan yang bersifat fisik dan dan kimiawi, sebagai contoh yaitu: konsistensi bahan menjadi lunak, timbul gas atau aroma tertentu dan zat racun yang membahayakan. Jumlah penyebaran bakteri/mikroorganisme pada bahan (makanan) yang sedang mengalami pembusukan sangat bervariasi jumlahnya dan tidak sama jenis spesiesnya serta tergantung pada varietas, habitat, susunan kimia, cara penanganan, suhu penyimpanan, dan lain-lain.

Pertumbuhan mikroorganisme yang membentuk koloni dapat dianggap bahwa setiap koloni yang tumbuh berasal dari satu sel, maka dengan menghitung jumlah koloni dapat diketahui penyebaran bakteri yang ada pada bahan. Jumlah mikroba pada suatu bahan dapat dihitung dengan berbagai macam cara, tergantung pada bahan dan jenis mikrobanya.

Ada 2 macam cara perhitungan jumlah mikroba/bakteri, yaitu perhitungan secara langsung (direct method) dan tidak langsung (indirect method).

1. Perhitungan Jumlah Mikroba Secara Langsung.

Cara ini dipakai untuk menentukan jumlah mikroba dihitung secara keseluruhan, baik yang mati atau yang hidup.

2. Menggunakan Kamar Hitung (Counting Chamber)

Perhitungan ini dapat menggunakan hemositometer. Peteroff Hauser Bacteria Counter atau alat-alat lain yang sejenis. Dasar perhitungannya ialah dengan menempatkan satu tetes suspensi bahan atau biakan mikroba pada alat tersebut ditutup dengan gelas penutup kemudian diamati dengan mikroskop yang perbesarannya tergantung pada besar kecilnya mikroba. Dengan menentukan jumlah sel rata-rata tiap petak (ruangan) yang telah diketahui volumenya, dari alat tersebut dapat ditentukan jumlah sel mikroba tiap cc.

Prinsip dari perhitungan Petroff-Hauser yaitu melakukan perhitungan dengan pertolongan kotak-kotak skala, di mana dalam setiap ukuran skala seluas 1 mm² terdapat 25 buah kotak besar dengan luas 0,04 mm², dan setiap kotak besar terdiri dari 16 kotak kecil. Alat haemocytometer digunakan di bawah mikroskop, sisinya mempunyai ukuran 0,05 mm. Sedangkan satu kotak sedang berukuran nilai 0,2 mm. Dan tebalnya adalah 0,1 mm. Jumlah sel per mL sampel dapat dihitung sebagai berikut:

1. Jumlah sel dalam 25 kotak besar = Jumlah sel per kotak besar \times 25 kotak
2. Jumlah sel per mm³ sampel = Jumlah sel dalam 25 kotak besar \times (1/0,02)
3. Jumlah sel per ml sampel = Jumlah sel per mm³ sampel \times 10³
4. Jumlah sel per kotak besar \times 25 kotak \times (1/0,02) \times 10³
5. Jumlah sel per ml sampel = Jumlah sel per kotak besar \times 25 kotak \times 50 \times 10³

Misalnya : didapatkan jumlah mikroba yang mau dihitung 12 sel mikroba, maka jumlah sel per ml sampel adalah: $12 \times 1,25 \times 10^6 = 1,5 \times 10^7$.

Hemasiometer adalah metode perhitungan secara mikroskopis. Ruang hitung terdiri dari 9 kotak besar dengan luas 1 mm². Satu kotak besar di tengah, dibagi menjadi 25 kotak sedang dengan panjang 0,05 mm. Satu kotak sedang dibagi lagi menjadi 16 kotak kecil. Dengan demikian satu kotak besar tersebut berisi 400 kotak kecil. Tebal dari ruang hitung ini adalah 0,1 mm. Sel bakteri yang tersuspensi akan memenuhi volume ruang hitung tersebut sehingga jumlah bakteri per satuan volume dapat diketahui.

3.4.4. Diagram Alir penelitian



Observasi

Observasi adalah suatu studi yang disengaja dan sistematis tentang keadaan fenomena sosial dan gejala-gejala psikis dengan jalan mengamati dan mencatat.

3.5. Metode dan Analisis Data

Penelitian dilaksanakan dengan menggunakan metode Survei Eksperimental. Menurut Nazir (1988), yang dimaksud dengan metode survei adalah penyelidikan yang dilakukan untuk mencari dan memperoleh fakta-fakta dari gejala-gejala yang ada dan mencari keterangan-keterangan secara faktual, baik tentang institusi sosial, ekonomi maupun politik dari suatu kelompok ataupun daerah.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental laboratorium. Dengan menggunakan teknik pengumpulan data yang dilakukan secara langsung terhadap gejala subjek yang diteliti dalam situasi sebenarnya maupun dalam situasi buatan dalam bentuk kegiatan percobaan (Surachmad,1994).

3.5.1. Teknik Pengumpulan Data

Mardalis (2003), mengemukakan bahwa teknik pengumpulan data dapat dilakukan dengan cara :

a. Wawancara

Wawancara adalah teknik mengumpulkan data yang digunakan peneliti untuk mendapatkan keterangan-keterangan lisan melalui cakap-cakap dan berhadapan muka dengan orang yang dapat memberikan keterangan kepada peneliti, wawancara ini dapat dipakai untuk melengkapi data yang diperoleh melalui observasi.

b. Kuisisioner

Kuisisioner atau angket adalah teknik pengumpulan data melalui formulir-formulir yang berisi pertanyaan-pertanyaan yang diajukan secara tertulis pada

seorang atau sekumpulan orang untuk mendapatkan jawaban atau tanggapan dan informasi yang diperlukan.

3.5.2. Jenis Data

Nazir (1988), menjelaskan bahwa data yang diperoleh digolongkan menjadi dua yaitu :

a. Data Primer

Merupakan data yang diperoleh secara langsung dari tempat praktek, baik yang digunakan melalui wawancara langsung pada responden, observasi dan dengan alat-alat lain.

b. Data Sekunder

Merupakan data atau informasi yang diperoleh secara tidak langsung dari sumbernya, baik dari unit usaha maupun dari sumber literatur lainnya. Data primer maupun data sekunder dapat berupa data kualitatif maupun data kuantitatif.

3.5.3. Teknik Pengolahan dan Analisis Data

Menurut Narbuko dan Ahmadi (2001), setelah data primer dan data sekunder terkumpul dilakukan pengolahan data melalui :Pengeditan Data teknis dianalisa dengan menggunakan analisa deskriptif yaitu menyajikan data sesuai dengan informasi yang diperoleh di lapangan. Setelah data yang dikumpulkan diedit, dikode dan ditabulasi kemudian dianalisis. Analisis data yang digunakan yaitu analisa deskriptif atau menyajikan data sesuai dengan keadaan sebenarnya guna mempermudah pengambilan keputusan. Misalnya data hasil Penelitian berupa catatan tentang prosedur pengujian yang ada di lapangan.