

III MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya yang akan berlangsung pada bulan Januari 2024.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan- bahan penelitian yang digunakan adalah daging babi segar bagian *Musculus Longissimus dorsi* yang diambil dari Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian, cairan aquades, media NA (*Nutrient agar*), reagen eber (1 ml HCL pekat, 3 ml alkohol 96% dan 1 ml eter), bayclin, alkohol 70% dan daun mint.

3.2.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam percobaan tersebut ialah cawan petri, pisau, timbangan analitik, gunting, pinset, *erlenmeyer*, tabung reaksi, sumbat karet yang dilengkapi dengan lidi, kapas, inkubator, autoklaf, mortir dan stamper, api bunsen, gelas kaca, plastik steril, kertas label, *vortex*, *colony counter*, aluminium *foil*, beaker gelas, corong, alat sulingan minyak, gelas ukur, karet, *coolbox*, corong pemisah, kertas, kantong plastik, kompor, panci, alat tulis, kamera, rak tabung, pipet ukur, dan batang pengaduk.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Jenis Penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan menggunakan 4 kelompok perlakuan yaitu P0: sebagai kontrol, P1: perendaman daging babi dengan menggunakan ekstrak daun mint 5%, P2: perendaman daging babi dengan menggunakan ekstrak daun mint 15%, P3: perendaman daging babi dengan menggunakan ekstrak daun mint 25%, dan 6 kali ulangan (Hidayah, dkk., 2021). Ulangan sebanyak 6 kali diperoleh dari rumus Federer .

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

Keterangan : t adalah perlakuan sedangkan n adalah ulangan

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

$$(4-1)(n-1) \geq 15$$

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 15+3$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 18/3$$

$$n=6$$

3.3.2 Variabel Penelitian

Penggunaan variabel dalam percobaan ini yaitu:

- a. Variabel bebas : Ekstrak Daun Mint
- b. Variabel terikat : Awal pembusukan dan TPC
- c. Variabel kendali : Asal daging, suhu, lama dan tempat penyimpanan

3.3.3 Teknik Pengambilan Sampel

Sampel daging babi diambil dari Rumah Potong Hewan sebanyak 2 kg. Bagian yang diambil adalah bagian *Musculus Longissimus dorsi* (otot panjang dan ramping yang membentang di sepanjang punggung babi.) Sampel daging babi kemudian dimasukan ke dalam *coolbox* untuk dipindahkan menuju Laboratorium Mikrobiologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya untuk percobaan lebih lanjut.

3.3.4 Prosedur Penelitian

Peralatan disterilkan terlebih dahulu sebelum penggunaanya dengan cara dicuci menggunakan sabun antiseptik selanjutnya disemprotkan alkohol dan dikeringkan. Alat-alat yang telah kering kemudian dibungkus menggunakan kertas buram dan masukan ke dalam autoklaf dengan temperatur 121⁰C, kurang lebih selama 15 menit.

Tahap kedua, pembuatan media NA dengan cara mencampurkan 1 liter aquades + 28 gram NA dalam gelas ukur. Gelas ukur berisi larutan NA+ aquades dimasukan didalam panci berisi air kemudian dimasak diatas kompor hingga

serbuk NA larut dan homogen. Selanjutnya dibiarkan dingin dan kemudian disteril menggunakan autoklaf selama 15 menit.

3.3.4.1 Daging

Daging babi yang diambil dari RPH dan dibawa ke laboratorium Mikrobiologi Veteriner dibersihkan bagian luarnya dari darah dan kotoran lalu dipotong dengan ukuran yang sama sebanyak 24 potong kemudian dimasukkan masing-masing potongan kedalam plastik steril.

3.3.4.2 Ekstrasi Daun Mint (*Mentha arvensis*)

Prosedur mengekstrasi daun mint yaitu dengan cara bahan baku berupa daun mint disiapkan sebanyak 1 kg. setelah daun mint dipetik, batang dan bunganya dibuang dari daunnya, lalu daunnya dicuci dengan air hingga bersih, ditiriskan dan dipotong-potong kemudian diblender hingga halus. Selanjutnya ditambahkan 2 liter pelarut yang mengandung etanol 96% dalam toples, tutup dan simpan dari tempat yang terlindung dari cahaya. Diamkan selama 72 jam atau sekitar 3 hari sambil diaduk sesekali, kemudian saring. Hasil saringan dipisahkan, sedangkan ampas ditambahkan secukupnya cairan penyari. Ulangi sampai diperoleh larutan jernih. Gunakan *rotary evaporator* untuk menguapkan maserat sampai diperoleh ekstrak kental (Widyastuti, dkk., 2019).

3.3.4.3. Pengenceran Larutan

Pengenceran ekstrak daun mint dilakukan dengan menggunakan rumus molaritas yaitu $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$ dimana N sebagai konsentrasi larutan dan V

sebagai volume larutan (Hidayah,dkk ., 2021). Maka pengenceran ekstrak daun mint 5%, 15%, dan 25% diperoleh dengan cara sebagai berikut:

a. Pengenceran 5%

$$N1 \cdot V1 = N2 \cdot V2$$

$$100\% \cdot V1 = 5\% \cdot 100$$

$$V1 = 500\% / 100\%$$

$V1 = 5$ ml (sehingga diperlukan 5 ml ekstrak daun mint, 95 ml aquades).

b. Pengenceran 15%

$$N1 \cdot V1 = N2 \cdot V2$$

$$100\% \cdot V1 = 15\% \cdot 100$$

$$V1 = 1500\% / 100\%$$

$V1 = 15$ ml (sehingga diperlukan 15 ml ekstrak daun mint, 85 ml aquades).

c. Pengenceran 25%

$$N1 \cdot V1 = N2 \cdot V2$$

$$100\% \cdot V1 = 25\% \cdot 100$$

$$V1 = 2500\% / 100\%$$

$V1 = 25$ ml (sehingga diperlukan 25 ml ekstrak daun mint, 75 ml aquades).

3.3.4.4 Prosedur Perendaman Daging Babi

Perendaman sampel dilakukan dengan cara sampel daging dimasukan pada ekstrak daun mint dalam plastik steril yang tertutup rapat dengan konsentrasi 5%, 15%, dan 25%. Perendaman daging dilakukan selama 30 menit (Yanestria, dkk.,2020). Setelah 30 menit daging ditiriskan dan dibungkus dalam wadah dan disimpan di inkubator dengan suhu 37⁰C selama 24 jam kemudian amati sesuai parameter pengujian awal pembusukan (uji eber) dan uji TPC.

3.3.4.5 Pemeriksaan Awal Pembusukan Daging (Uji Eber)

Awal pembusukan pada sampel P0 (tanpa perlakuan), P1(ekstrak daun mint 5 %), P2(ekstrak daun mint 15%), P3 (ekstrak daun mint 25%) akan diperiksa setelah 24 jam.

1. Prinsip

Awal proses pembusukan, reaksi antara larutan eber dan daging babi akan membentuk senyawa NH₄Cl yang terlihat seperti awan putih.

2. Prosedur Kerja

Masukan reagen eber ke dalam tabung reaksi. Reagen eber terdiri dari (1 ml HCL pekat, 3 ml alkohol 96% dan 1 ml eter). Selanjutnya tusukan daging pada batang pengait dari sumber karet yang sudah disterilkan dan masukan daging tersebut dalam tabung reaksi yang sudah dituangi reagen eber. Kemudian tutup atas tabung agar tidak terjadi penguapan reagen eber. Selanjutnya amati segera disekitar daging reaksi dalam tabung reaksi. Reaksi positif ditandai dengan

terbentuknya gas berwarna putih didekat daging dan apabila gas putih tidak terwujud, maka reaksinya negatif (Dengen, 2015)

3.3.4.6 Pemeriksaan Total Koloni Bakteri (TPC)

Sampel yang telah didiamkan selama 24 jam diuji total koloni bakteri pada P0 (tanpa perlakuan), P1(ekstrak daun mint 5 %),P2(ekstrak daun mint 15%), P3 (ekstrak daun mint 25%).

1. Pengenceran sampel

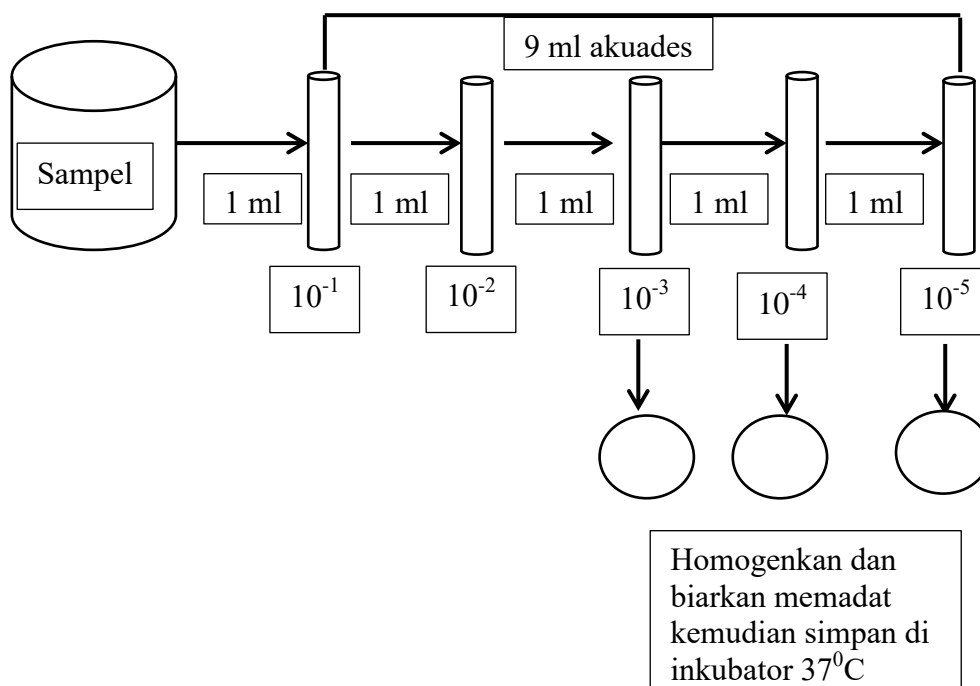
Setelah semua alat diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, lanjutkan prosedur pengenceran. Siapkan tabung reaksi sebanyak 5 buah, susun berderet dan ditandai dengan kertas label no 1-5. Sampel daging babi dipotong dan ditimbang sebanyak 1 gram. Gunakan mortir untuk menggerus sampel daging dan encerkan dengan *aquades* steril 1 cc, kemudian menggunakan spuit 1 cc diambil suspensi dan dimasukkan kedalam tabung no 1(pengenceran 10^{-1}). Gunakan pipet steril untuk mengambil 1 ml air gerusan daging dimasukkan dalam tabung reaksi no.2 yang telah terisi 9 ml cairan *aquades* steril (pengenceran 10^{-2}). Larutan dari pengenceran pertama diambil 1 ml dengan menggunakan pipet lalu masukan pada tabung reaksi berikutnya dan homogenkan (pengenceran 10^{-3}). Begitu pula dengan tabung reaksi no. 4 sehingga didapatkan pengenceran 10^{-4} . lakukan hal yang sama sehingga didapatkan pengenceran 10^{-5} (Lestari ,dkk .,2019).

2. Penanaman dan Perhitungan Bakteri

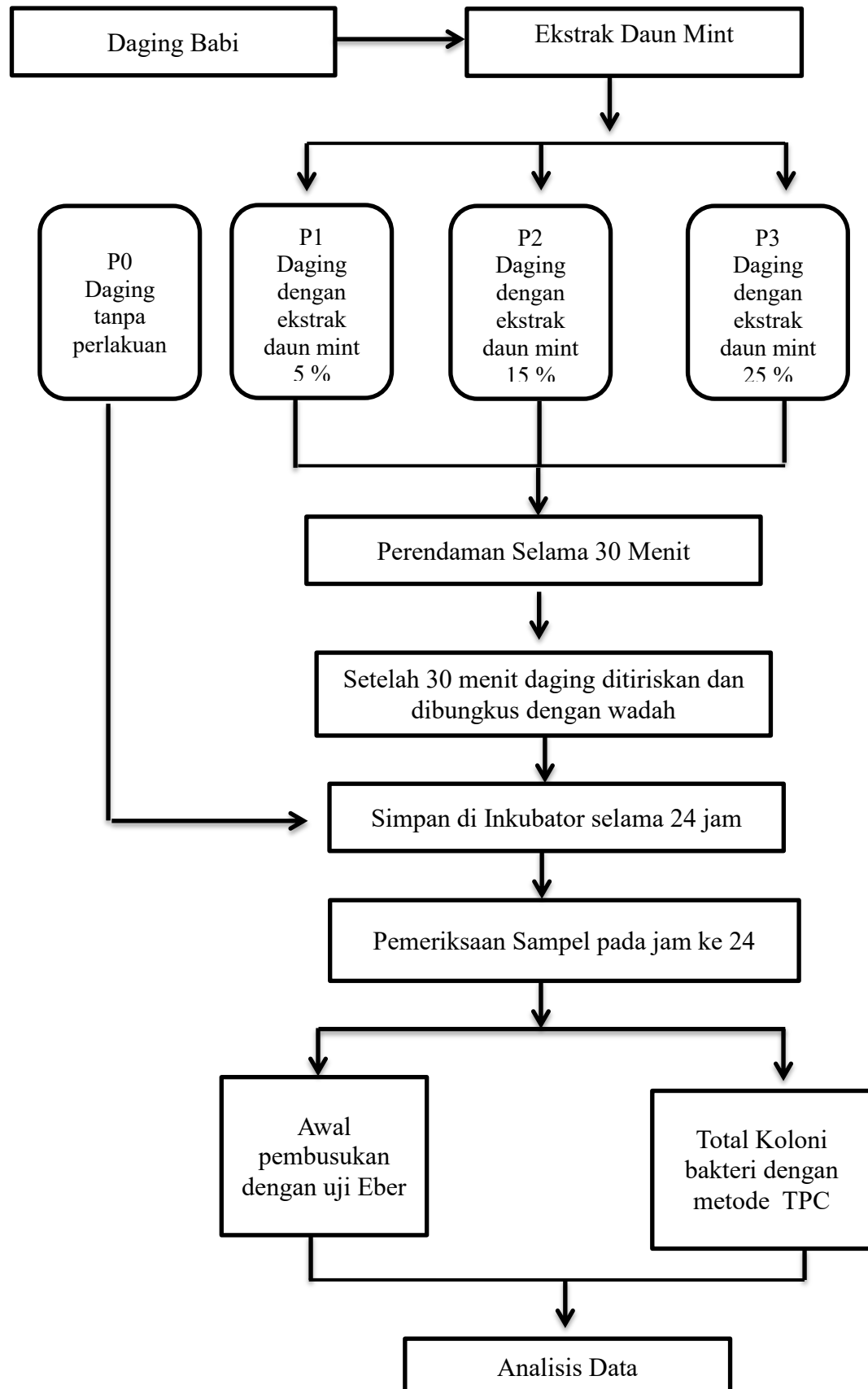
Suspensi sampel ditanam dibawah nutrient agar dengan metode tuang (pour plate), fiksasi cawan petri terlebih dahulu kemudian suspensi dari tabung reaksi (tabung reaksi no.3, no.4 dan no.5) sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam cawan petri. Media nutrient agar yang telah didinginkan sampai suhu 45°C - 50°C dituangkan kira-kira 20 ml. Usahakan cawan petri tidak dibuka lebar agar terhindar dari pencemaran. Gerakan cawan petri memutar secara horizontal, agar media tersebar rata, biarkan hingga media padat. Selama 24 jam pada suhu 37°C cawan petri diinkubasi dengan cara dibalik posisinya. Amati pertumbuhan kuman yang berbentuk koloni dengan jumlahnya 30-300 koloni, lalu dihitung dengan faktor pengenceran (Lada, 2017).

$$\text{Jumlah bakteri} = \text{jumlah koloni} \times 1 / \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan : Syaratnya jumlah koloni yang bisa dihitung ialah antara 30-300.



3.4 Kerangka Operasional



3.5 Analisis Data

Data hasil penelitian dari Uji awal kebusukan merupakan data kualitatif yang akan diolah secara deskriptif, kemudian data Uji Total Koloni Bakteri (TPC) akan diolah dengan menggunakan uji *Analysis of Variance* (ANOVA).