

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Adapun Jenis penelitian ini merupakan penelitian kualitatif dengan pendekatan experimental laboratorium, yang bertujuan untuk mengetahui kadar protein dan Angka lempeng total (*ALT*) bakteri pada bakasang ikan tongkol (*Euthynnus affinis*) dan ikan cakalang (*Katsuwonus pelamis*).

B. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 29 Agustus – 29 September 2022. Pengambilan sampel jeroan ikan berlokasi di pasar Mardika Ambon. Proses pembuatan dan fermentasi bakasang berlokasi di Gadihu Indah RT. 002/ RW 13 dan uji kandungan protein dan ALT bakteri pada bakasang dilaksanakan di Laboratorium MIPA IAIN Ambon.

C. Objek Penelitian

Objek dalam penelitian ini adalah kadar protein dan Angka Lempeng Total (*ALT*) bakteri pada produk bakasang ikan tongkol (*Euthynnus affinis*) dan ikan cakalang (*Katsuwonus pelamis*).

D. Alat dan Bahan

Tabel 3.1.
Alat dan Bahan

No	Nama	Kegunaan
1	<u>Alat:</u> Timbangan analitik	untuk menimbang bahan yang akan digunakan

2	Labu <i>Kjeldahl</i>	digunakan pada proses destruksi protein atau analisa protein dengan menggunakan metode Kjeldahl
3	Erlenmeyer	untuk meletakkan larutan atau untuk meletakkan bahan yang akan dicampurkan dalam bentuk cair
4	Autoclave	untuk mensterilisasi bahan, alat, instrumen atau media yang akan digunakan
5	Tabung reaksi	untuk meletakkan sampel atau larutan
6	Rak tabung reaksi	untuk meletakkan tabung reaksi
7	Spatula	untuk mengaduk larutan
8	Cawan petri	sebagai wadah tumbuh mikroba
9	Laminar Air Flow	untuk mensterilkan wilayah kerja
	<u>Bahan:</u>	
10	Bakasang	sampel dalam penelitian
11	Aluminium foil	untuk menutup bagian mulut alat-alat yang berupa kaca, untuk membungkus sampel bahan.
12	Aquades	untuk pelarut media
13	H ₂ SO ₄	untuk membuat amonium Hidroksida
14	larutan H ₃ BO ₃	untuk menangkap NH ₃ sebagai Destilat berupa gas
15	Media NA	sebagai media tumbuh mikroba

E. Prosedur Kerja

1. Pembuatan Bakasang

- a. Ikan cakalang dan tongkol segar diambil isi perutnya atau jeroannya dan langsung dicuci bersih.
- b. Jeroan yang sudah bersih dicincang halus, sesudah itu diberi garam dan difermentasi selama 7 hari pada suhu kamar.
- c. Setelah 7 hari, jeroan tersebut dimasak selama \pm 30 menit (dalam keadaan mendidih).

- d. Hasil pemasakan kemudian didinginkan dan disaring (diambil filtrat atau larutan yang berwarna cokelatnya)
- e. Lakukan uji protein untuk analisis kandungan protein bakasang ikan cakalang dan tongkol.

2. Uji Kadar Protein

Prinsip analisis protein adalah pengukuran kadar nitrogen (N) dari sampel dengan menggunakan Metode *Kjeldahl*. Tahap destruksi, tahap destilasi, dan tahap titrasi adalah tiga tahap kerja metode *Kjeldahl*. H_2SO_4 pekat ditambahkan selama tahap destruksi. Selenium, $CuSO_4$, dan K_2SO_4 ditambahkan sebagai katalis untuk mempercepat proses destruksi. Titik didih asam sulfat akan naik ketika katalis ditambahkan, mempercepat destruksi. Protein dipecah menjadi elemen C, H, dan O pada saat ini. Protein kemudian akan dioksidasi untuk menghilangkan hanya nitrogen, yang akan bereaksi dengan H_2SO_4 untuk membuat amonium hidroksida (NH_4OH) dengan $NaOH$ hingga menjadi basa dan dipanaskan. Amonium sulfat dipecah menjadi amonia (NH_3) selama tahap distilasi dengan memanaskannya dan menambahkan $NaOH$ hingga menjadi basa. Larutan asam standar kemudian akan menangkap amonia yang dilepaskan. Asam klorida adalah asam yang paling umum yang dapat digunakan. Jingga metil diberikan untuk meningkatkan kontak antara asam amonia. Kemudian titrasi menggunakan $NaOH$ 0,1 N. Titik akhir titrasi dipisahkan dengan pengaturan warna susunan dari jernih menjadi merah.

Cara *Kjeldahl* digunakan untuk menganalisis kadar protein kasar dalam bahan makanan secara tidak langsung dengan mengalikan hasil analisis tersebut dengan angka konversi 6,25 diperoleh nilai protein dalam bahan makanan. Prosedur kerjanya adalah sebagai berikut:¹

- a. Sampel ditimbang sebanyak 1 gr dan dimasukkan ke dalam labu *Kjeldahl*.
- b. Sebanyak 1.9 g K_2SO_4 dan 2 ml H_2SO_4 ditambahkan ke dalam labu *Kjeldahl*
- c. Sampel dididihkan selama 1.5 jam sampai cairan menjadi jernih dan didinginkan.
- d. Air sebanyak 10 ml ditambahkan dalam labu *Kjeldahl* (*homogenkan*)
- e. Masukkan dalam labu *destilasi*
- f. Bilas labu *Kjeldahl* dengan *aquadest* 2-3 x sebanyak 5 ml
- g. Air cucian dipindahkan ke dalam labu *destilasi*.
- h. Tambahkan 10 ml NaOH – $Na_2S_2O_3$ dalam labu destilasi (tutup mulut labu *destilasi* dengan aluminium foil)
- i. Erlenmeyer untuk menampung destilasi diisi dengan 5 ml H_3BO_3 , 1 tetes metilen biru dan 1 tetes metilen merah
- j. Kemudian dilakukan destilasi sampai tertampung \pm 15 ml
- k. Isi labu Erlenmeyer kemudian dititrasi dengan HCl 0,02 N hingga terjadi perubahan warna dari biru menjadi abu-abu, kadar protein di hitung dengan rumus

¹Farida. 2013.

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{(\text{ml HCl} - \text{ml blanko}) \times \text{N HCl} \times 14.007 \times 6.25}{\text{mg sampel}} \times 100\%$$

3. Uji ALT

a. Pengujian ALT

- 1) Timbang bakasang secara aseptis sebanyak 25 gr, kemudian masukkan dalam wadah atau plastik steril.
- 2) Tambahkan 225 ml larutan aquades, homogenkan selama dua menit. Homogenat ini merupakan larutan pengenceran 10^{-1} . Dengan menggunakan pipet steril, ambil 1 ml homogenat di atas dan masukkan kedalam 9 ml larutan aquades untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} . Siapkan pengenceran selanjutnya (10^{-3}) dengan mengambil 1 ml contoh dari pengenceran 10^{-2} ke dalam 9 ml larutan aquades. Pada setiap pengenceran dilakukan pengocokan minimal 20x. Selanjutnya lakukan hal yang sama untuk pengenceran 10^{-4} , dan 10^{-5} .
- 3) Pipet 1 ml dari setiap pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , dan seterusnya ke dalam cawan petri steril. Lakukan secara duplo untuk setiap pengenceran.
- 4) Tambahkan 12 – 15 ml Nutrient Agar (NA) yang sudah didinginkan dalam Laminar air flow hingga mencapai suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ke dalam masing-masing cawan yang sudah berisi bakasang. Supaya bakasang dan media tercampur sempurna lakukan pemutaran cawan ke depan ke belakang dan ke kiri ke kanan.

- 5) Setelah agar menjadi padat, untuk penentuan mikroorganisme aerob inkubasi cawan-cawan tersebut dalam posisi terbalik dalam inkubator selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
 - 6) Diamati dan dihitung jumlah koloni yang tumbuh.
- b. Cara menganalisis hasil pengujian sesuai dengan PPOMN (2006) yaitu:²
- 1) Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25-250 setiap cawan. Dihitung semua koloni dalam cawan petri dengan menggunakan alat penghitung koloni (*colony counter*). Dihitung rata-rata jumlah koloni dan dikalikan dengan faktor pengenceran dan dinyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per mL atau gram.
 - 2) Jika salah satu dari dua cawan terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 atau lebih besar dari 250, dihitung rata-rata jumlah koloni, dikalikan dengan faktor pengencer dan dinyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram.
 - 3) Jika hasil dari 2 pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25- 250 koloni, dihitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran seperti pada poin a dan b diatas dan dihitung jumlah koloni dari kedua pengenceran tersebut. Jika jumlah yang tertinggi lebih besar 2 kali jumlah yang terkecil, dinyatakan jumlah yang terkecil sebagai jumlah bakteri per gram.

² Meylisa Mutiara Dewi. “ Uji Angka Kapang/Khamir (AKK) dan Angka Lempeng Total (ALT) Pada Jamu Gendong Temulawak Di Pasar Tarumanegara Magelang” . *Skripsi Tidak Dipublikasi*. Yogyakarta: Universitas Sanata Dharma. hlm. 35 – 37.

- 4) Jika rata-rata jumlah koloni masing-masing petri tidak terletak antara 25- 250 koloni, dihitung jumlah koloni seperti pada poin a dan b diatas dan dinyatakan sebagai jumlah bakteri per gram.
- 5) Jumlah koloni dari semua pengenceran lebih dari 250 koloni, maka setiap dua cawan petri dengan pengenceran tertinggi dibagi dalam 2, 4, atau 8 sektor. Dihitung jumlah koloni dalam satu bagian atau lebih. Untuk mendapatkan jumlah koloni dalam satu cawan petri, dihitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pembagi dan pengenceran. Dinyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan per gram.
- 6) Jika dalam 1/8 bagian cawan petri terdapat lebih dari 200 koloni, maka jumlah koloni yang didapat = 8×200 (1600). Dikalikan dengan faktor pengenceran dan dinyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri perkiraan permililiter atau gram lebih besar dari jumlah yang didapat ($>1600 \times$ faktor pengenceran).
- 7) Jika tidak ada koloni yang tumbuh dalam cawan petri, nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari satu dikalikan dengan faktor pengenceran yang terendah (<10).
- 8) Menghitung koloni perambat (spreader). Kalau terjadi hanya 1 perambatan maka koloni dianggap 1. Tetapi bila 1 atau lebih rantai terbentuk dan yang berasal dari sumber yang terpisah- pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai 1 koloni.
- 9) Cara menghitung dan membulatkan angka. Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, angka

yang pertama dan kedua (dimulai dari kiri), sedangkan angka yang ketiga diganti dengan 0 apabila kurang dari 5 dan apabila 5 atau lebih dijadikan 1 yang ditambahkan pada angka yang kedua.

F. Teknik Analisis Data

Teknik analisis data dalam penelitian ini menggunakan analisis deskriptif dalam bentuk tabel untuk mendeskripsikan hasil kadar protein dan nilai ALT bakasang ikan tongkol dan bakasang ikan cakalang. Untuk menghitung kadar protein dan nilai ALT pada bakasang digunakan rumus sebagai berikut:

1. Nilai ALT

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