

## **BAB 3**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini bersifat deskriptif yaitu menggambarkan adanya kandungan bakteri *Salmonella sp* pada bakso yang dijual di jalan Mulyosari Surabaya.

#### **3.2 Populasi, Sampel dan Sampling Penelitian**

##### **3.2.1 Populasi penelitian**

Populasi dari penelitian ini adalah 18 bakso dari 9 penjual bakso di jalan Mulyosari Surabaya.

##### **3.2.2 Sampel penelitian**

Sampel yang digunakan adalah bakso yang di jual pedagang di jalan Mulyosari Surabaya, sebanyak 18 dari 9 pedagang yang diambil 2 sampel yang dari setiap penjual bakso di jalan Mulyosari.

#### **3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### **3.3.1 Lokasi Penelitian**

Lokasi penelitian ini dilakukan di laboratorium mikrobiologi, Fakultas Ilmu Kesehatan Prodi D3 Analis Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya Jalan Suterejo no. 59 Surabaya.

##### **3.3.2 Waktu Penelitian**

Waktu penelitian ini dilakukan mulai bulan Desember 2016 s/d waktu pemeriksaan bakteri *Salmonella sp* pada bakso dilakukan bulan Juli 2017.

### **3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel**

#### **3.4.1 Variabel Penelitian**

Kandungan kuman *Salmonella sp* pada bakso.

#### **3.4.2 Definisi Operasional Variabel**

Kandungan yang dimaksud dalam penelitian ini adalah ditetapkan ada tidaknya kuman *Salmonella sp* pada bakso melalui pemeriksaan laboratorium identifikasi *Salmonella sp* menjadi positif (+) terdapat kuman *Salmonella sp* . Naegatif (-) tidak terdapat kuman *Salmonella sp*.

### **3.5 Pengumpulan Data dan Analisis Data**

Pengumpulan data berdasarkan observasi atau pengamatan melalui uji laboratorium kemudian diidentifikasi ada tidaknya bakteri *Salmonella spp* pada sampel penelitian.

#### **3.5.1 Pengumpulan Data**

##### **1. Pembuatan Media**

###### **a. Alat**

Pada pembuatan media alat yang digunakan yaitu Erlenmeyer, hot plate, gelas ukur, spatula, pipet pasteur, beaker glass, tabung gula-gula steril, petridish steril, kertas pH, rak tabung, neraca analitik, kain kasa, autoclave, pipet ukur 10ml steril, gelas arloji.

###### **b. Bahan**

Pada pembuatan media bahan yang digunakan yaitu media *Selenite Broth*, *Mac Conkey*, gula-gula, *Urea*, *metil red*, *Voges prosteur*, *Simon citrat*, *motil*, *indol*, *TSIA*.

**c. Prosedur Pembuatan media**1) *Mac Conkey* (MC)

- a) Ditimbang media *Mac Conkey* sebanyak 13,5 gram.
- b) Larutkan dengan 270 mL aquades diaduk hingga larut, panaskan diatas hot plate hingga larut sempurna.
- c) *Mac Conkey* yang sudah larut sempurna ditunggu sampai suam-suam kemudian di pH  $7,1 \pm 0,2$ , apabila pH terlalu tinggi ditambah HCl, jika pH kurang ditambah NaOH.
- d) Sterilkan *Mac Conkey* ke dalam autoclave waktu yang dibutuhkan adalah 15 menit untuk mempertahankan suhu dan suhu yang dibutuhkan  $121^{\circ}\text{C}$  dan tekanan 1,5 atm.
- e) Media yang telah disterilkan dituang ke dalam Petridish masing-masing Petridish di isi 15mL setiap tabung.

2) *Voges prosteur* (VP)

- a) Ditimbang komposisi pembuatan *Voges prosteur* (VP) yaitu Pepton 0,01 gram,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,1 gram, Glukosa 0,1 gram.
- b) Mencampur semua komposisi yang telah ditimbang ke dalam *Erlenmeyer* lalu dilarutkan dengan aquades 54 mL.
- c) Panaskan diatas *hot plate* hingga larut sempurna.
- d) *Voges prosteur* (VP) yang telah larut ditunggu hingga suam-suam lalu di pH mencapai 7,1
- e) Media *Voges prosteur* (VP) yang telah selesai dituang kedalam tabung yang telah disediakan, tuang masing-masing 3mL setiap tabung.
- f) Tutup semua tabung dengan kasa, lalu bungkus dengan Koran

- g) Sterilkan media yang sudah dituang kedalam tabung ke dalam autoclave dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.
  - h) Media siap untuk digunakan.
- 3) *Metil Red* (MR)
- a) Ditimbang komposisi pembuatan Metil red (MR) yaitu Pepton 0,1 gram,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,1 gram, Glukosa 0,1 gram.
  - b) Mencampur semua komposisi yang telah ditimbang ke dalam *Erlenmeyer* lalu dilarutkan dengan akuades 54 mL
  - c) Di panaskan diatas *hot plate* hingga larut sempurna.
  - d) Media Metil red (MR) yang telah larut ditunggu hingga suam-suam lalu di pH mencapai 7,1
  - e) Media Metil red (MR) yang telah selesai dituang kedalam tabung yang telah disediakan, tuang masing-masing 3mL setiap tabung.
  - f) Tutup semua tabung dengan kasa, lalu bungkus dengan Koran
  - g) Sterilkan media yang sudah dituang kedalam tabung ke dalam autoclave dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.
  - h) Media siap untuk digunakan.
- 4) *Simon Citrat* (SC)
- a) Ditimbang simon citrat (SC) sebanyak 1,2 gram.
  - b) Dilarutkan dengan 54mL aquades aduk hingga larut, dipanaskan diatas *hot plate* hingga larut sempurna.
  - c) Simon citrat (SC) yang sudah larut ditunggu sampai suam-suam kemudian di pH 6,8 – 7,0 dengan kertas indikator pH, jika terlalu rendah teteskan NaOH 0,1 N, jika terlalu tinggi teteskan HCl 0,1 N

sampai pH mencapai 7,0 dan tambahkan indikator BTB 0,4% 0,1 mL (1:1)

- d) Dituang ke tabung reaksi sedang, tutup bagian atas mulut tabung dengan bulatan kapas dan dibungkus dengan Koran.
  - e) Disterilkan pada autoclave selama 15 menit suhu 121°C, tekanan 1,5 atm.
  - f) Media siap untuk digunakan.
- 5) *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) yang sudah larut
- a) Ditimbang media Triple Sugar Iron Agar (TSIA) sebanyak 4 gram.
  - b) Dilarutkan dengan 54 aquades diaduk hingga larut, kemudian dipanaskan pada *hot plate* hingga larut sempurna.
  - c) Triple Sugar Iron Agar (TSIA) yang sudah larut ditunggu sampai suam-suam kemudian di pH  $7,4 \pm 0,2$  (7,2 – 7,6) jika terlalu tinggi ditetaskan HCl 0,1 N, jika terlalu rendah ditetaskan NaOH 0,1 N sampai pH 7,6.
  - d) Dituang ke tabung reaksi sedang, tutup bagian atas mulut tabung dengan bulatan kapas dan dibungkus dengan koran.
  - e) Disterilkan pada autoclave selama 15 menit suhu 121°C, tekanan 1,5 atm.
  - f) Dimiringkan tabung hingga terbentuk lereng dan dasar.
  - g) Media siap untuk digunakan.

6) *Selenite Broth*

- a) Ditimbang komposisi pembuatan media *Selenite Broth* yaitu, Sodium hidrogen selenite 0,4%, Sodium phosphate 1,0%, Peptone 0,5 %, Lactose 0,4%.
- b) Mencampur semua komposisi yang telah ditimbang ke dalam *Erlenmeyer* lalu dilarutkan dengan aquades mL.
- c) Dipanaskan pada *hot plate* hingga larut sempurna.
- d) *Selenite Broth* yang telah larut ditunggu hingga suam-suam kemudian di pH .
- e) *Selenite Broth* yang telah selesai dituang kedalam tabung yang telah disediakan, tuang masing-masing 3mL setiap tabung.
- f) Tutup semua tabung dengan kasa, lalu bungkus dengan Koran
- g) Disterilkan media yang sudah dituang kedalam tabung ke dalam autoclave dengan suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit, media siap digunakan.

7) *Indol*

- a) Ditimbang media Pepton sebanyak 1 gram.
- b) dilarutkan dengan 54 mL aquades diaduk hingga larut, dipanaskan pada *hot plate* hingga larut sempurna.
- c) Media indol yang sudah larut ditunggu sampai suam-suam lalu di pH 7,0 – 7,4, jika terlalu tinggi diteteskan HCl 0,1 N, jika terlalu rendah diteteskan NaOH 0,1 N sampai 7,4.
- d) Dituang ke tabung reaksi sedang, tutup bagian atas mulut tabung dengan bulatan kapas dan dibungkus dengan Koran.

- e) Disterilkan di autoclave selama 15 menit suhu 121°C, tekanan 1,5 atm.
- f) Media siap untuk digunakan.

8) *Urea*

- a) Ditimbang Urea Agar Base 1 gram kemudian dilarutkan dalam 54 mL aquadest, pH 6,6 -7,0 lalu di steril,
- b) Ditimbang Harnstoff 1 gram dilarutkan dalam 10 mL aquadest steril dalam keadaan steril.
- c) Dicampurkan Urea Harnstoff kedalam urea agar base dalam keadaan steril ( pada suhu 37°C).
- d) Dimasukkan kedalam tabung yang sudah steril dan dimiringkan hanya terdapat lereng.
- e) Media Urea memadat dan siap digunakan.

9) *Motil*

- a) Ditimbang komposisi pembuatan motil yaitu pepton from meat 0,3 gram, NaCl 0,3 gram, agar-agar 0,2 gram.
- b) Mencampur semua komposisi yang telah ditimbang ke dalam *Erlenmeyer* lalu dilarutkan dengan aquades 54 mL.
- c) Dipanaskan pada *hot plate* hingga larut sempurna.
- d) Motil yang telah larut ditunggu hingga suam-suam lalu di pH mencapai  $7,6 \pm 0,2$
- e) Dituang ke tabung reaksi sedang, tutup bagian atas mulut tabung dengan bulatan kapas dan dibungkus dengan Koran.
- f) Disterilkan di autoclave selama 15 menit suhu 121°C, tekanan 1,5 atm.
- g) Media siap untuk digunakan.

## 10) Gula-gula

Media gula-gula terdiri dari 5 macam yaitu: Glukosa, Sukrosa, Laktosa, Maltosa, Manosa.

- a) Ditimbang komposisi pepton sebanyak 1gram kemudian dilarutkan dalam 54 mL aquades.
- b) Ditimbang masing-masing media gula-gula sebanyak 0,5 gram.
- c) Masing-masing media gula-gula dilarutkan dalam 54 mL air pepton, kemudian ditambahkan 0,1 mL BTB 0,4% lalu dihomogenkan.
- d) Dididihkan diatas *Hot plate* sampai larut sempurna.
- e) Ditunggu sampai suam-suam kuku lalu di pH sampai  $7,2 \pm 0,2$ , jika terlalu tinggi ditetaskan HCl 0,1 N, jika terlalu rendah ditetaskan NaOH 0,1 N.
- f) Menyiapkan tabung gula-gula yang telah di isi tabung durham sejumlah yang dibutuhkan.
- g) Memasukkan masing-masing media gula-gula kedalam tabung tersebut, kemudian ditutup sesuai dengan warna.
- h) Disterilkan diautoclave selama 15 menit suhu  $121^{\circ}\text{C}$ , tekanan 1,5 atm.
- i) Media siap untuk digunakan.

## 2. Penanaman pada Media Pemupuk

### a. Alat

Pada penanaman media pemupuk alat yang digunakan yaitu tabung, dipipet ukur 10mL, incubator, filler, kain kasa, kapas



**b. Bahan**

Pada penanaman media pemupuk bahan yang digunakan yaitu *Selenite Broth* dan bakso.

**c. Prosedur****Hari pertama :**

- 1) Mencincang bakso kemudian dihaluskan dengan mortar.
- 2) Ditimbang 1 gr sampel bakso yang sudah dihaluskan.
- 3) Dimasukkan ke dalam media Selenite Broth ( 10 ml).
- 4) Diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam.

**3. Penanaman pada Media *Mac Conkey Agar*****Hari kedua :****a. Alat**

Pada penanaman media *Mac Conkey Agar* alat yang digunakan yaitu *Petridish*, ose bulat, dan incubator.

**b. Bahan**

Pada penanaman media *Mac Conkey* (Mc) bahan yang digunakan yaitu *Mac Conkey Agar* dan sampel.

**c. Prosedur**

- 1) Dipanaskan ose bulat sampai merah membara kemudian didinginkan
- 2) Dichelupkan ose bulat ke dalam media *Selenite Broth* yang telah diinkubasi, kemudian goreskan ose pada media MCA.
- 3) Dipanaskan kembali ose bulat lalu dinginkan.
- 4) Dinkubasi McA yang telah ditanami kuman pada suhu 37 ° C selama 24 jam

#### 4. Penanaman pada Media Biokimia Reaksi

##### Hari ketiga :

##### a. Alat

Pada penanaman media biokimia reaksi alat yang digunakan yaitu tabung reaksi, ose bulat ose jarum, dan incubator.

##### b. Bahan

Pada penanaman media biokimia reaksi bahan yang dibutuhkan yaitu media gula-gula, indol, metil red, Voges prosteur, simon citrat, Urea, motil, dan TSIA / KIA.

##### c. Prosedur

- 1) Indol : koloni bakteri yang diambil akan dieramkan dalam medium air pepton. Yang mengandung asam tryptophan dan kemudian diinkubasi selama semalam dalam suhu 37°C.
- 2) *Methyl Red* (MR) : bakteri akan diinokulasi dalam medium glucose phosphate broth, yang mengandung glukosa dan buffer fosfat yang kemudian diinkubasi dalam suhu 37 ° C selama 48 jam.
- 3) *Voges Proskauer* (VP) : bakteri yang hendak di tes akan diinokulasi kedalam glucosa peptone broth, diinkubasi dalam suhu 37 ° C selama 48 jam.
- 4) *Sitrat* : koloni bakteri diinokulasi kedalam medium biakan Simmon Citrat Agar dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 ° C. Jika bakteri yang diuji dapat menggunakan sitrat maka medium akan berubah warna dari hijau ke biru.

- 5) Gula-gula : koloni bakteri yang diambil akan dieramkan dalam medium gula-gula. Yang digunakan untuk mengetahui kemampuan kemampuan kuman dalam memfermentasi, dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
- 6) *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) : koloni bakteri yang diambil akan dieramkan dalam medium yang mengandung Glukosa, Sukrosa, dan laktosa, dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

## 5. Uji Reaksi Biokimia Media

### Hari keempat ( pembacaan hasil ) :

#### a. Alat

Pada uji reaksi biokimia media alat yang digunakan yaitu pipet Pasteur.

#### b. Bahan

Pada uji reaksi biokimia media bahan yang digunakan yaitu Kovac, Methyl Red, KOH 40%, alpha-naphthol 5 %.

#### c. Prosedur

- 1) Indol/air pepton : Setelah diinkubasi ditambahkan 3 tetes reagen Kovac's kedalam medium air pepton. Reagen Kovac's mengandung para-dimethyl aminobenzaldehyde, isoamyl alcohol dan con. HCl. Reagen Erlich lebih sensitif dalam mendeteksi produksi indole dalam lingkungan anaerob. Formasi cincin merah yang terbentuk memberikan hasil positif dalam tes.
- 2) *Methyl Red* (MR) : Untuk mengetahui PH dalam medium maka ditambahkan 3 tetes reagen MR. Jika berubah warna menjadi merah maka hasil menunjukkan positif.

- 3) *Voges Proskauer* (VP) : ditetaskan 4 tetes KOH 40 % kedalam medium tersebut dan dikocok dan 12 tetes reagen alpha-naphthol 5 %. Warna merah yang terjadi menunjukkan hasil tes yang positif.

### 3.5.2 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian bakteri *Salmonella sp* kemudian ditabulasikan dalam bentuk tabel dan disajikan secara presentase peesentase persen (%) dan dibuat dalam bentuk diagram pie.

Data hasil penelitian yang diperoleh, dapat ditabulasikan seperti Tabel 3.1 dibawah ini

**Tabel 3.1 Ada atau tidaknya *Salmonella sp*. Di dalam bakso pada pemeriksaan uji biokimia reaksi.**

No.Urut	Kode Sampel	Hasil
1	1a	
2	1b	
3	2a	
4	2b	
5	3a	
6	3b	
7	4a	
8	4b	
9	5a	
10	5b	
11	6a	
12	6b	
13	7a	
14	7b	
15	8a	
16	8b	
17	9a	
18	9b	
	18	