

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan jenis penelitian deskriptif yang bertujuan untuk mengidentifikasi ada tidaknya bakteri *Salmonella* sp. pada legen yang dijual di daerah Tuban.

3.2 Populasi Sampel

3.2.1 Populasi penelitian

Dalam penelitian ini yang menjadi populasi adalah total sampel legen yang dijual di daerah Tuban.

3.2.2 Sampel penelitian

Sampel adalah bagian populasi yang akan dijadikan sebagai subjek. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 sampel legen yang dijual di daerah Tuban.

3.3 Lokasi Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2022 sampai dengan bulan Juni 2023, sedangkan waktu pemeriksaan dilakukan pada bulan Mei 2023 di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Teknologi Laboratorium Medis Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.4 Definisi Oprasional

Untuk mengetahui bakteri *Salmonella* sp. pada legen yang dijual di daerah Tuban, dengan kategori sebagai berikut :

1. Pada media *Selenite Broth* (SB)

(+) kekeruhan terjadi pada media *Selenite broth*.

(-) kekeruhan tidak terjadi pada media *Selenite broth*.

2. Pada media *Salmonella Shigella Agar (SSA)*

(+) koloni kecil, halus, tidak berwarna (transparan), inti hitam, permukaan cembung dengan tepi halus.

(-) tidak ada pertumbuhan koloni dengan ciri koloni kecil, halus, tidak berwarna (transparan), inti hitam, permukaan cembung dengan tepi halus.

3. Pada pewarnaan gram : Bakteri berbentuk basil atau batang dengan warna merah atau gram negatif.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan dengan cara observasi langsung, yaitu uji Laboratorium mikrobiologi. Langkah-langkah pemeriksaannya sebagai berikut :

3.5.1 Alat dan bahan penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : gelas arloji, batang pengaduk kaca, neraca analitik, gelas ukur, *beaker glass*, kaki tiga, kasa asbes, api spiritus, korek api, pipet tetes, objek glas, *erlenmeyer*, *autoclave*, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, kertas pH, baskom, botol kaca coklat.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian meliputi : media *Selenite broth*, media *Salmonella Shigella Agar*, kapas, kasa, *aquadest*, larutan NaOH 0,1 N, larutan HCL 0,1 N, kristal violet 0,5%, lugol, alkohol 70%, safranin 0,5%.

3.5.2 Pembuatan media

1. Sterilisasi alat

Alat yang digunakan dalam penelitian meliputi cawan petri, tabung reaksi, arloji, *erlenmeyer*, gelas ukur kaca, batang pengaduk kaca, botol kaca coklat (semua alat gelas). Alat tersebut dicuci bersih terlebih dahulu kemudian dikeringkan, setelah kering cawan petri dan tabung reaksi dibungkus dengan koran kemudian dimasukkan kedalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C.

2. Prosedur pembuatan media

a. Media *Selenite Broth* (SB)

Proses pembuatan media *Selenite Broth* adalah sebagai berikut:

1. Semua alat dan bahan disiapkan, semua alat yang akan digunakan dibersihkan.
2. Perhitungan media *Selenite broth* dilakukan sesuai jumlah tabung yang akan diproduksi.

Perhitungan media *Selenite broth* berdasarkan etiket:

$$35 \text{ tabung} \times 9 \text{ ml media} = 315 \text{ ml (aquades)}$$

$$\frac{19,01}{1000} \times 315 \text{ ml} = 5,98815 \text{ gram (media)}$$

3. Dilakukan penimbangan bahan dengan timbangan neraca analitik.
4. Media dipindahkan dari gelas arloji ke *beaker glass*.
5. Kemudian dilarutkan menggunakan akuades sebanyak 15 ml (telah diukur dengan gelas ukur).
6. Larutan bahan dipanaskan/dididihkan diatas api hot plate/api spirtus sampai benar-benar homogen dan larut sempurna.
7. *Beaker glass* diangkat dan disuam-suam.

8. Dilakukan uji pH pada media (apabila pH terlalu asam tambahkan NaOH, jika terlalu basa tambahkan HCl).
9. Jika pH sudah sesuai, larutan media dituangkan kesetiap tabung dengan volume yang sama.
10. Setelah itu tabung ditutup dengan kapas kasa dan diberi label nama (identitas).
11. Dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf pada tekanan 2 atm atau 1.5 lb pada suhu 121°C selama kurang lebih 15 menit dengan total keseluruhan 45-60 menit.
12. Media yang sudah jadi siap digunakan atau disimpan. Media pemupuk siap pakai dapat disimpan pada suhu kamar, kecuali selenite broth disimpan pada suhu 2-8 °C (Artanti dkk, 2020).

b. Media *Salmonella Shigella* Agar (SSA)

Prosedur pembuatan media SSA adalah sebagai berikut :

1. Semua alat dan bahan disiapkan, semua alat yang akan digunakan dibersihkan.
2. Dilakukan sterilisasi pada alat petri, gelas arloji, Erlenmeyer, gelas ukur yang kaca, spatula (semua alat gelas) sehari sebelum praktikum.
3. Perhitungan media SSA dilakukan sesuai jumlah dan volume plate atau petri yang dibutuhkan.

Perhitungan media SSA berdasarkan etiket :

35 tabung x 20 ml media = 700 ml (aquades)

63 x 700 ml = 44,1 gram (media)

1000

4. Dilakukan penimbangan gelas arloji kosong steril, media SSA, dan catat hasilnya (menggunkan teknik aseptik).

5. Bahan dipindahkan dari gelas arloji ke *erlenmeyer* steril dengan teknik aseptik.
6. Kemudian bahan dilarutkan dengan akuades, panaskan hingga larut (mendidih) diatas api spirtus,
7. Dilakukan suam-suam dengan air kran.
8. Ukur pH media dengan melihat ketentuan di etiket bahan (apabila pH terlalu asam tambahkan NaOH, apabila terlalu basa tambahkan HCl).
9. Media dituang dari *erlenmeyer* ke cawan petri steril dengan teknik aseptik, tentunya dengan melewati mulut *erlenmeyer* ke api (tanpa ada autoklaf sehingga langsung dituang).
10. Media diratakan perlahan dengan memutar petri searah angka delapan. Biarkan memadat.
11. Media siap digunakan, disimpan pada suhu 2-8 °C (Artanti dkk, 2020).

3.5.3 Cara kerja penelitian

a. Pengambilan sampel

Sampel legen yang ada didalam botol plastik dipindahkan ke dalam botol kaca coklat steril 5 ml dengan teknik aseptik tentunya dengan melewati mulut botol kaca coklat ke api dan diberikan label atau etiket. Kemudian dimasukkan kedalam *coolbox* dan dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Teknologi Laboratorium Medis Universitas Muhammadiyah Surabaya untuk dilakukan penelitian, pengambilan sampel dan penelitian dilakukan pada hari yang sama.

b. Prosedur penelitian

Hari Pertama :

1. Alat dan bahan disiapkan, disterilkan dan dibersihkan di atas meja praktikum.

2. Sampel legen diambil dari botol kaca coklat sebanyak 1 ml menggunakan spuit dan dimasukkan kedalam media *selenite broth*.
3. Sampel dan media dihomogenkan.
4. Media yang telah ditanami di inkubasi pada inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C (Artanti dkk, 2020).

Hari Kedua :

1. Disiapkan alat dan bahan yang akan digunakan diatas meja praktikum.
2. Media *selenite broth* diambil dari inkubator yang telah ditanami kuman selama 24 jam pada suhu 37°C.
3. Kemudian dilakukan penanaman sampel kuman pada media SSA, dengan cara diambil satu mata ose kuman pada media *selenite broth* dan di tanam pada media SSA (Teknik gores T atau Y).
4. Media yang telah ditanami di inkubasi pada inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C (Artanti dkk, 2020).

Hari Ketiga :

1. Disiapkan alat dan bahan yang akan digunakan diatas meja praktikum.
2. Kemudian media SSA diambil dari inkubator yang telah ditanami kuman selama 24 jam pada suhu 37°C.
3. Dilakukan karakteristik morfologi koloni kuman pada media SSA meliputi bentuk koloni, warna koloni, tekstur koloni, tepian koloni, permukaan kolonin dan sifat koloni.
4. Kemudian dibuat preparete. Diambil 1 mata ose pada media *selenite broth* dan dibuat apusan pada obyek glas hingga tipis dengan ukuran kira-kira 1 x 1,5 cm kemudian dikeringkan.

5. Dilakukan pewarnaan kuman dengan pewarnaan Gram, dan dilakukan pengamatan dengan perbesaran lensa obyektif 100x.
6. Pembacaan hasil (Artanti dkk, 2020).

Pembacaan Hasil

1. Setelah media *Salmonella Shigella Agar* (SSA) yang telah ditanami kuman, di inkubasi selama 1 x 24 jam dan dilakukan pewarnaan gram.
2. Dilakukan pembacaan hasil pada media SSA dengan melihat koloni yang tumbuh.
3. Apabila hasilnya positif yaitu koloni kecil, smooth, tidak berwarna (bening), berinti hitam, permukaan cembung dengan tepian halus. dan sebaliknya apabila tidak ada pertumbuhan koloni dengan ciri koloni kecil, *smooth*, tidak berwarna (bening), berinti hitam, permukaan cembung dengan tepian halus hasilnya negatif (Artanti dkk, 2020).

Pewarnaan Gram

Pembuatan preparat dilakukan sebelum melakukan pewarnaan gram, pembuatan preparat dilakukan dengan cara, ambil objek glass fiksasi pada lampu bunsen kemudian ambil koloni letakkan pada objek glass tambahkan akuades, biarkan sampai kering, setelah kering dilakukan pewarnaan gram, SOP pewarnaan gram (cara hucker) dari Laboratorium Bio Analitika Surabaya (2023-2025) dengan cara sebagai berikut :

1. Preparat yang telah difiksasi digenangi dengan pewarna kristal ungu 2% selama 1 menit.
2. Dibilas dengan air lalu segera genangi dengan lugol selama 1 menit.
3. Dibilas dengan air mengalir.

4. Dichelupkan kedalam aceton-alkohol sambal digoyang-goyang selama 1 menit.
5. Kemudian dibilas dengan air mengalir.
6. Diwarnai dengan pewarna safranin selama 1 menit.
7. Dibilas dengan air lalu dikeringkan.

3.5.4 Tabulasi data

Data yang diperoleh ditampilkan dalam bentuk table sebagai berikut :

Tabel 3. 1 Hasil Identifikasi Salmonella sp. Pada Legen Yang Dijual Di Daerah Tuban Di Laboraturium Mikrobiologi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

No.	Kode Sampel	Hasil Pemeriksaan Koloni Medi SSA	Hasil Pewarnaan Gram	Morfologi/ Bentuk Sel	Keterangan
1.					
2.					
3.					
4.					
5.					
6.					
7.					
8.					
9.					
10.					
Dst					
30.					

3.6 Metode Analisis Data

Teknik analisis data pada penelitian ini yaitu deskriptif dengan skala nominal yang ditabulasikan dalam bentuk tabel dan diagram, kemudian di interprestasikan dengan jumlah presentase (%). Dari Rumus : $P = F/N \times 100\%$.