

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode penelitian observasi

3.2 Tempat dan Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai Februari 2021. Analisis dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

3.3 Definisi Operasional

Tabel 1 Definisi Operasional Variabel

NO	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Data
1.	Bakteri <i>Salmonella</i> <i>sp.</i>	<i>bakteri</i> gram-negatif berbentuk batang	Uji Kualitatif bakteri <i>Salmonella sp.</i> pada bumbu soto giling kemasan dan bumbu soto giling <i>home made</i> menggunakan media selektif	Bakteri dinyatakan dalam bentuk vebral yaitu positif dan negative	Nominal
2.	Bumbu soto giling kemasan	bumbu yang terbuat dari campuran	Observasi		Nominal

	dan homemade	berbagai rempah dalam keadaan segar yang telah dihaluskan			
--	--------------	---	--	--	--

3.4 Variabel

- Variabel bebas (independent)
Bumbu soto giling kemasan dan bumbu soto giling *home made*
- Variabel terikat (dependen)
Pertumbuhan bakteri *Salmonella sp.*

3.5 Bahan dan Alat

1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi gelas kimia (1L), Erlenmeyer (100 ml), cawan petri, kaca arloji, spatula, tabung reaksi (50 ml), rak tabung reaksi, bola hisap, mortar alu, batang pengaduk, gelas ukur, neraca analitik, kaca preparat, pipet tetes, pipet ukur (10 ml, 1 ml), seperangkat alat pewarnaan gram, mikroskop, LAF, autoklaf, kompor, inkubator.

2. Bahan

Sampel bumbu soto giling kemasan dan *home made* yang dijual di Pasar Sukun Kota Malang, media Salmonella Shigella Agar (SSA) merk *Merck*, media Nutrient Broth (NB) merk *Merck*, media Nutrient Agar (NA) merk *Merck*, media KIA merk *Merck*, media SIM merk *Merck*, media MR-VP merk *Merck*, media Simon Citrate Agar (SCA) merk *Merck*, reagen Kovac's merk *Merck*, reagen MR merk *Merck*, KOH 40%, a-naphthol, aquades, alcohol 95%, Larutan pengencer NaCl 0,85%, larutan Kristal violet, larutan lugol, larutan safranin, kapas, kertas tahan panas, benang boll

3.6 Prosedur penelitian

- **Pengambilan sampel**

Pengambilan sampel dilakukan pada pasar tradisional yang ada di Kota Malang, yaitu Pasar Mergan Sukun. Dilakukan pengambilan 2 produsen/penjual bumbu soto giling *home made* dan 2 merk sampel bumbu soto giling kemasan, merk “A” dan merk “B”.

Analisis dilakukan dengan 3 kali replikasi. Sampel bumbu soto giling dimasukkan dalam wadah sampel steril dan dibawa ke laboratorium menggunakan *coolbox* untuk mencegah kontaminasi. Sampel diambil pada hari itu juga dan langsung dibawa ke laboratorium. Perkiraan jarak dari Pasar Mergsn ke kampus ± 15 menit.

- **Preparasi Sampel**

1. Diambil 10 gram sampel dan dimasukkan kedalam Erlenmeyer
2. Dilarutkan dengan 90 ml aquades steril
3. Dihomogenkan

- **Pembuatan media**

1. Media NB ditimbang sebanyak 0,28 gram dan dilarutkan dalam 36 ml aquades (4 tabung, @9 ml), media SSA ditimbang sebanyak 15,12 gram dan dilarutkan dalam 240 ml aquades (12 tabung, @20 ml) dan media NA ditimbang sebanyak 1,2 gram dan dilarutkan dalam 60 ml aquades (12 tabung, @5 ml). Media SSA dan NA dilarutkan dengan dipanaskan hingga larut sempurna
2. Media KIA ditimbang sebanyak 5,5 gram, media SCA ditimbang sebanyak 1,45 gram, media SIM ditimbang sebanyak 2,17 gram, media MR-VP ditimbang sebanyak 2 gram. Masing-masing media dilarutkan dalam 60 ml aquades (12 tabung, @5ml).

3. Media yang berada dalam erlenmeyer disterilkan di autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C dengan menutup mulut Erlenmeyer dengan *aluminium foil*.
4. Setelah itu media NB dipipet 9 ml kedalam 4 tabung reaksi steril lalu ditutup mulut tabung dengan kapas.
5. Dipipet media SSA masing-masing sebanyak 20 ml kedalam 12 tabung reaksi lalu ditutup mulut tabung dengan kapas. Dipipet media NAS masing-masing sebanyak 5 ml kedalam 12 tabung reaksi lalu ditutup mulut tabung dengan kapas.
6. Semua media disimpan dalam kulkas

- **Isolasi dan Identifikasi Bakteri**

1. Diambil masing-masing 1 ml sampel dengan pipet volume dan dimasukkan kedalam tabung yang berisi media NB
2. Dihomogenkan dan tabung diberi label
3. Diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C
4. Diambil 1 mata ose dari media NB lalu digoreskan pada media SSA di cawan petri
5. Diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C
6. Diambil bakteri Salmonella dari media SSA dengan jarum ose lalu ditusukkan pada media NA serta digoreskan zig zag pada permukaan media.
7. Diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C

- **Pewarnaan gram**

1. Kaca preparat disterilisasi menggunakan alcohol
2. Ose bulat di sterilisasi dengan metode panas pijar
3. Bakteri diambil dari media SSA menggunakan ose bulat lalu diletakkan diatas kaca preparat
4. Diteteskan 1-2 tetes aquadest diatas kaca preparat

5. Kaca preparat yang telah terdapat bakteri kemudian difiksasi
6. Ditetesi kristal violet pada bakteri yang sudah difiksasi, dibiarkan selama 1 menit kemudian dibilas menggunakan aquadest
7. Ditetesi iodium/lugol, dibiarkan selama 1 menit kemudian dibilas menggunakan aquadest
8. Ditetesi alcohol, dibiarkan 30 detik kemudian dibilas menggunakan aquadest
9. Ditetesi safranin, dibiarkan 30 detik kemudian dibilas menggunakan aquadest
10. Diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x dan penambahan oil imersi

- **Uji Biokimia**

- **IMVIC (*Indole, Methyl red, Voges Proskauer dan Citrat*)**

- a. Uji Indole**

1. Diinokulasi koloni bakteri dari media SSA pada media SIM dengan jarum ose
2. Diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C dalam incubator
3. Ditambahkan 5 tetes reagen kovac's kedalam tabung
4. Diamati permukaan media, terbentuknya cincin kuning pada bagian atas menunjukkan indol positif

- b. Uji Methyl Red**

1. Diinokulasi koloni Salmonella dari media SSA pada media MR dengan jarum ose
2. Diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C dalam incubator
3. Ditambahkan 5 tetes metil red kedalam tabung
4. Diamati permukaan media, terbentuknya warna merah menunjukkan hasil positif

c. Uji Voger Prokaurer

1. Diinokulasi koloni Salmonella dari media SSA pada media VP dengan jarum ose
2. Diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C dalam incubator
3. Ditambahkan 0,6 ml reagen a-naftol 5% dan 0,5 ml KOH 40% ke dalam tabung
4. Diamati permukaan media, terbentuknya warna merah pada permukaan media menunjukkan hasil positif

d. Uji Citrate

1. Diinokulasi koloni secara tusuk tegak biakan Salmonella pada media SCA
2. Diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C dalam incubator
3. Diamati permukaan media, jika terdapat perubahan dari warna hijau ke biru menunjukkan hasil positif

– Penanaman pada media KIA

1. Menginokulasi koloni bakteri dari media SSA ke media KIA dengan cara tusukan dan geseran menggunakan ose jarum
2. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C
3. Positif (+) apabila terdapat gas, terbentuk warna hitam pada medium, bagian lereng berwarna merah, bagian dasar berwarna kuning.

3.7 Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengujian akan dilakukan pengecekan dengan standar kriteria pangan olahan berdasarkan Peraturan Kepala BPOM RI No. 16 tahun 2016 dan SNI No 738 Tahun 2009 yaitu negative (tidak terdapat bakteri *Salmonella sp.* pada sampel). Jika hasilnya positif maka sampel tersebut tidak layak untuk dipasarkan dan berbahaya jika dikonsumsi karena mengandung bakteri.