

# SKRIPSI\_19820082\_ROSA MYSTICA NDUA GORE Ke-2

*by Fkh Uwks*

---

**Submission date:** 28-Jun-2023 04:46PM (UTC+0700)

**Submission ID:** 2123882946

**File name:** SKRIPSI\_19820082\_ROSA\_MYSTICA\_NDUA\_GORE\_Ke-2.docx (2.03M)

**Word count:** 10290

**Character count:** 64150

# TOTAL BAKTERI (TPC) DAN DETEKSI *Salmonella sp.* PADA INSANG IKAN GURAMI (*Osphronemus gouramy*) DI PENANGKARAN IKAN GURAMI SIDOARJO JAWA TIMUR

Rosa Mystica Ndua Gore

## ABSTRAK

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah menghitung total bakteri (TPC) dan deteksi *Salmonella sp.* pada insang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) di penangkaran ikan gurami Sidoarjo Jawa Timur. Sampel ikan gurami yang digunakan berjumlah 35 sampel yang diambil dari tempat penangkaran ikan Sidoarjo, Jawa Timur. Dalam penelitian ini menggunakan uji TPC, isolasi *Salmonella sp.*, pewarnaan Gram, dan yang terakhir adalah Uji Biokimia. Analisis data untuk perhitungan total jumlah bakteri menggunakan *Standar Plate Count* (SPC) dalam format tabel dan hasil tes deteksi *Salmonella sp.* dianalisis secara deskriptif dalam format tabel dan serta gambar. Satu gram insang ikan digunakan sebagai sampel penelitian, dan penempatannya dalam kantong ASI di dalam kotak pendingin memungkinkan pengukuran hasil penelitian yang akurat untuk dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. Hasil Uji *Total Plate Count* (TPC) dalam penelitian ini sebanyak  $12.95 \times 10^5$  CFU/gram. Hasil positif *Salmonella sp.* pada Uji SSA sebanyak 35 sampel atau sebesar 100%, hasil setelah pewarnaan Gram, temuan koloni menunjukkan hasil berwarna merah dan berbentuk batang (gram negatif), yang dapat dilihat di bawah mikroskop, dan dilanjutkan dengan Uji biokimia.

**Kata Kunci** : Insang ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*), penangkaran ikan Sidoarjo, *Salmonella sp.*, *Total Plate Count* (TPC).

25

**TOTAL BACTERI (TPC) AND DETECTION OF *Salmonella* sp. IN THE  
INSULTS OF GURAMI FISH (*Osphronemus gouramy*) AT THE  
SIDOARJO EAST JAVA GURAMI FISH RANCHERY**

**Rosa Mystica Ndua Gore**

1  
**ABSTRACT**

The purpose of this study was to calculate the total bacteria (TPC) and detection of *Salmonella* sp. in the gills of gourami (*Osphronemus gouramy*) in Sidoarjo gourami fish breeding in East Java. The gourami samples used amounted to 35 samples taken from the Sidoarjo fish breeding ground, East Java. In this study using TPC test, *Salmonella* sp. isolation, Gram staining, and the last is Biochemical Test. Data analysis for the calculation of the total number of bacteria using Standard Plate Count (SPC) in tabular format and the results of *Salmonella* sp. detection tests were analyzed descriptively in tabular format and as well as images. One gram of fish gills was used as a research sample, and its placement in a breast milk bag in a cool box allowed accurate measurement of research results to be taken to the Microbiology Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Wijaya Kusuma University Surabaya. The Total Plate Count (TPC) test results in this study were  $12.95 \times 10^5$  CFU/gram. The positive results of *Salmonella* sp. in the SSA test were 35 samples or 100%, the results after Gram staining, the colony findings showed red and rod-shaped results (gram negative), which could be seen under a microscope, and continued with biochemical tests.

**Keywords :** Gills of gourami (*Osphronemus gouramy*), Sidoarjo fish farm, *Salmonella* sp., Total Plate Count (TPC).

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Negara maritim seperti Indonesia memiliki potensi perikanan yang sangat besar (Yesserie, 2015). Kebutuhan pasar terhadap produk perikanan berkembang setiap tahun dan akan terus berkembang seiring dengan pertumbuhan penduduk dan pendapatan (Na'imah, 2022). Ikan adalah sumber protein yang tersedia dan terjangkau. Selain menjadi sumber protein berkualitas tinggi, ikan memiliki semua asam amino esensial yang dibutuhkan untuk kesehatan manusia yang baik. Insang, usus, dan kulit ikan semuanya dapat memiliki mikroorganisme dalam jumlah besar di permukaannya. Polusi, lingkungan, penyakit, dan mikroba patogen semuanya bisa menimbulkan risiko keamanan pangan dalam akuakultur (Bibi *et al*, 2015).

Gurami (*Osphronemus gouramy*) adalah salah satu spesies ikan yang sangat potensial. Perkembangan ikan gurami dipengaruhi oleh pengaruh internal dan eksternal. Keturunan atau genetika, jenis kelamin, umur, dan kekebalan terhadap penyakit merupakan unsur-unsur internal yang mempengaruhi pertumbuhan. Asupan nutrisi, kualitas air, dan ruang gerak merupakan unsur eksternal yang berdampak pada pertumbuhan ikan (Wibawa, 2018). Ikan gurami cukup populer karena memiliki kandungan protein yang tinggi dan hanya mengandung sedikit lemak (Patmawati, 2022).

Jenis pangan yang rentan terhadap kerusakan biologis dan kontaminasi mikrobiologis adalah ikan. Kerusakan ikan dapat dipicu oleh aksi bakteri dan enzim internal dan eksternal. Kuantitas mikroorganisme dalam makanan dapat mempengaruhi seberapa cepat makanan terdegradasi. Pada saat produksi ikan tinggi, proses pembusukan pada ikan dapat menghambat penjualan hasil perikanan yang seringkali mengakibatkan kerugian yang cukup besar (Christanti, 2019).

Mulai dari penangkapan, pengolahan, hingga pengiriman hasil perikanan kepada konsumen memungkinkan terjadi kontaminasi bakteri. Menggunakan alat penanganan pada suhu rendah yang mencegah terjadinya penyebaran bakteri, lingkungan yang bersih sehingga kontaminasi dan aktivitas bakteri dapat dicegah (Pasue, 2020). Perubahan makanan yang disebabkan oleh perkembangan mikroba dapat berbahaya dan juga sebagian dapat bermanfaat. Kerugian produksi disebabkan oleh bakteri berbahaya yang bertindak sebagai faktor pencemar dan pembusuk dalam makanan (Fatiqin, 2019).

Bakteri, virus, dan parasit adalah tiga kategori utama mikroorganisme. Kelas bakteri enterik yang disebut basil Gram negatif, salah satunya adalah *Salmonella sp.*, yang bertanggung jawab atas sebagian besar penyakit bakteri (Linda, 2017). Berdasarkan habitat utamanya *Salmonella sp.* hidup pada saluran pencernaan manusia maupun hewan, sehingga ketika mikroba tersebut bisa dijumpai pada produk perikanan baik olahan maupun ikan segar hal ini menggambarkan bahwa prosedur pengolahan atau teknik penanganan produk tersebut tidak dilakukan dengan benar. Karena dari kondisi saluran air,

pengolahan, dan penanganan dari nelayan hingga pemasaran ikan, produk ini dapat terinfeksi bakteri yang beracun dan berbahaya bagi manusia jika tertelan. Bakteri *Salmonella sp.* sering hadir dalam air yang terkontaminasi, sebagian besar disebabkan oleh sanitasi yang buruk (Akbar, 2016).

<sup>3</sup> *Salmonella sp.* merupakan salah satu bakteri patogen yang dapat mencemari ikan dan mengakibatkan keracunan makanan atau penyakit bawaan makanan (KEMENAG RI, 2013). Demam tifoid juga dikenal sebagai Salmonellosis adalah infeksi bakteri yang masuk ke dalam sirkulasi darah. Gastroenteritis akut yaitu infeksi bakteri melalui makanan yang terkontaminasi untuk masuk ke dalam tubuh yang adalah gejala lain dari *Salmonella sp.* yang bisa dibawa. Demam tifoid, yaitu nama lain dari Salmonellosis, adalah penyakit bawaan makanan yang sering bermanifestasi sebagai Bakteri *Salmonella* menyebabkan penyakit usus akut. Berbagai penyakit seperti tifus, demam, muntah, sakit perut, dan diare dapat disebabkan oleh bakteri yang terdapat pada daging yang terkontaminasi bakteri patogen (Utari, 2016).

Sesuai peraturan BPOM ( 2009 ), *Salmonella* hasilnya negatif dalam produk perikanan karena sangat berbahaya bagi kesehatan manusia. Menurut SNI (2009), makanan tidak boleh terdapat bakteri *Salmonella sp.* karena batas sampel 0/25g untuk membatasi keberadaan bakteri dalam makanan. Pengujian bahan pangan perikanan adalah salah satu cara untuk menjaga kualitasnya tetap terjaga. Memastikan akses publik atau pelanggan terhadap makanan yang aman, sangat penting untuk memeriksa kualitas produk perikanan (Christanti, 2019). Menurut

WHO (2014), *Salmonella sp.* ialah genus mikroba yang dalam hal ini merupakan kontributor utama pembawa penyakit makanan secara global.

Berdasarkan banyaknya kasus *Salmonella sp.* pada ikan dan produk olahan serta tingginya resiko yang diakibatkan, dilihat lagi masih terbatasnya pengetahuan mengenai laboratorium dan terbatasnya penelitian Salmonellosis yang menyebabkan tingginya penyakit akibat infeksi bakteri *Salmonella sp.* Sehingga dilakukannya penelitian untuk menghitung total serta mendeteksi keberadaan cemaran mikroba *Salmonella sp.* terhadap ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) di penangkaran ikan gurami Sidoarjo Jawa Timur.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Berapakah total bakteri (TPC) pada insang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) dari penangkaran ikan gurami Sidoarjo Jawa Timur?
2. Apakah terdapat kandungan bakteri *Salmonella sp.* pada insang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) dari penangkaran ikan gurami Sidoarjo Jawa Timur?

## 1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui seluruh jumlah bakteri (TPC) pada insang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) dari penangkaran ikan Sidoarjo Jawa Timur.
2. Mengidentifikasi keberadaan kehadiran *Salmonella sp.* pada insang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) dari penangkaran ikan gurami Sidoarjo Jawa Timur.

#### **1.4 Manfaat Hasil Penelitian**

1. Dapat memberikan tambahan informasi kepada mahasiswa Fakultas Kedokteran Hewan dalam menghitung total bakteri (TPC) yang terdapat pada insang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*).
2. Dapat memberikan informasi kepada masyarakat dan pembudidaya ikan gurami mengenai pencemaran yang disebabkan oleh mikroba *Salmonella sp.* pada insang ikan gurami di penangkaran ikan gurami Sidoarjo Jawa Timur.
3. Sebagai sumber untuk penyelidikan tambahan terhadap total bakteri (TPC) serta deteksi bakteri *Salmonella sp.*



## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan Umum Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*)

*Osphronemus gouramy* atau sering dikenal sebagai nama gurami, merupakan ikan yang asalnya dari Indonesia yaitu di laut sunda, lalu meluas ke laut di Malaysia, Thailand, Ceylon, dan Australia. Ikan gurami adalah salah satu ikan herbivora dan ikan unik di Asia Tenggara, khususnya Indonesia. Ikan gurami merupakan salah satu ikan yang banyak diminati oleh masyarakat umum dan memiliki nilai ekonomis tinggi jika dibandingkan dengan ikan air tawar yang lain (Azrita *et al*, 2015).

Ikan gurami banyak disukai karena terdiri dari tekstur daging yang utuh dan padat serta lezat dan terdiri dari duri yang besar. Sebagai ikan hias karena sisik dari ikan gurami yang bercorak terang. Ketertarikan bagi sebagian besar petani senang memelihara ikan gurami alasannya yaitu tidak memerlukan perawatan yang khusus, cukup dengan memperhatikan dalam kolam perawatan selalu terdapat air dalam jumlah lumayan banyak (Sani, 2014). Menurut Bachtiar (2010), klasifikasi ikan gurame yaitu : Kingdom *Animalia*, Phylum *Chordata*, Subphylum *Vertebrata*, Class *Pisces*, Subclass *Teleostei*, Ordo *Labyrinthici*, Subordo *Belontiidae*, Family *Osphronemidae*, Genus *Osphronemus*, Spesies *Osphronemus gouramy*.



**Gambar 2.1** Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*)  
(Ghofur, 2017)

Ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) memiliki ciri-ciri morfologi tertentu menurut Sani (2014) antara lain bertubuh pipih, panjang tubuh dua kali lebarnya, sirip penuh, dan sirip perut yang dimodifikasi menyerupai benang. Sirip dada memiliki dua sinar dan 13 sampai 14 sinar lembek, garis sisik lengkap berupa 30 sampai 33 seluruh badannya, sedangkan sirip belakang mempunyai 12 sampai 13 duri, 11 sampai 13 sinar lembek dan sirip dubur memiliki 9 sampai 11 duri. Ikan gurami memiliki punggung berwarna coklat dan perut berwarna perak, ikan gurami juga memiliki dahi yang rata saat masih muda dan akan mulai berkembang saat ikan gurami mencapai usia dewasa dan siap bertelur (Sutanto, 2014). Ikan gurami juga memiliki mulut dan gigi yang kecil, miring, tidak pas di bawah bibir dan tidak terlalu dalam. Memiliki alat sentuh berupa dua benang yang menonjol di bagian bawah badannya. Pengamatan menunjukkan adanya perbedaan morfologi antara ikan gurami dewasa dan ikan gurami muda antara lain perbedaannya dari perbedaan <sup>3</sup> ukuran tubuh, warna, bentuk kepala dan dahi. Untuk ikan gurami muda lebih bagus jika mempertimbangkan warnanya daripada ikan gurami dewasa. Ikan gurami merupakan keluarga ikan yang dikenal dengan labyrinthic, yang meliputi ikan dengan alat bantu pernafasan tambahan (labyrinth) berupa membran

tambahan berupa tonjolan di tepi atas lapisan insang pertama yang memungkinkan mereka untuk langsung menyerap oksigen dari udara (Marilyn, 2015).

Budidaya peternakan gurami (*Osphronemus gouramy*) berkisar dari jumlah kecil hingga besar, dan biasanya ditempatkan di kolam yang kecil tetapi dengan kepadatan tinggi, sehingga ikan gurami rentan terhadap penyakit dan pastinya juga mengalami stres (Hardaningsih *et al*, 2012). Lebih sederhana untuk mengelola kualitas air untuk ikan gurami. Air tidak perlu bergerak cepat untuk ikan gurami. Habitat gurami lebih menyukai suhu antara 25-30°C. Ukuran derajat keasaman (pH) perairan adalah antara tujuh sampai delapan. Ikan akan melompat atau berenang dengan cepat ketika pH tiba-tiba berubah, dan mereka akan tampak kekurangan oksigen hingga tiba-tiba mati. Penyesuaian pH yang lambat dapat menyebabkan keluarnya lendir berlebih, tetapi kulit akan menjadi putih dan menjadi rentan terhadap mikroba. Menurut studi Verawatiet *et al*. (2015), nilai pH cenderung turun seiring dengan peningkatan produk sisa metabolisme ikan gurami. Dalam budidaya pertumbuhan ikan gurami, pakan merupakan faktor penting yang harus diperhatikan. Pakan merupakan faktor krusial yang harus diperhatikan sebagai sumber energi untuk berkembang dan bertahan hidup (Virnanto *et al*, 2016). Makanan harus disediakan dalam ukuran yang tepat serta diberikan dalam waktu yang tepat juga, dan termasuk nutrisi yang dibutuhkan untuk perkembangan ikan (Juliana, 2018). Menurunnya produktivitas salah satu kesulitan dalam membudidayakan ikan gurami adalah penyakit (Setiawan *et al*, 2012).

Dibandingkan sama ikan lainnya, ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) mempunyai nilai komersial yang lebih besar (Ahmad *et al.*, 2017 & Mareta *et al.*, 2018). Gurami memiliki karakteristik yang menguntungkan sebagai herbivora atau pemakan tanaman selain nilai ekonomi yang prospektif karena biaya perawatannya yang relatif murah. Ikan gurami mempunyai daging yang lebih tebal dibandingkan dengan ikan di air tawar yang lain, lebih beraroma, lebih sedikit tulang dan duri, serta mampu bertahan hidup di lingkungan yang rendah oksigen (Hardaningsih *et al.*, 2012). Keunggulan lain dari ikan gurami yaitu memiliki peralatan pernapasan tambahan yang memungkinkan mereka bertahan di lingkungan perairan dengan kadar oksigen rendah (Nugroho, 2012).

Ikan gurami dikategorikan sebagai protein lengkap karena ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) memiliki kandungan protein yang tinggi sebagai protein hewani biasanya memiliki nilai biologis yang tinggi. Ikan gurami memiliki tingkat protein yang tinggi yaitu sekitar 19-20 % (Ahmad, 2017).

**Tabel 2.1** Kandungan Gizi Ikan Gurami (Sani, 2014)

Jenis Nutrisi	Total
Protein	18,93%
Lemak	2,43%
Vit B1	749,715 IUI100g
Vit B2	0,0792 mg/100g
Vit B3	0,083 mg/100g
	1,22 mg/100g

### 15 2.1.1 Insang Ikan Gurami (*Ospbronemus gouramy*)

Tahap inspirasi dan ekspirasi keduanya termasuk dalam pernapasan ikan. Membuka mulut selama fase inspirasi akan menciptakan sedikit tekanan negatif di rongga mulut dan ruang insang. Berbeda kontras dengan fase ekspirasi, yaitu saat air dikeluarkan dari insang, oksigen ( $O_2$ ) diikat oleh kapiler darah saat air masuk ke insang, ekspirasi di mulut dan diangkut ke jaringan yang membutuhkannya. Ketika air memasuki rongga mulut, celah mulut menutup, operkulum terbuka, dan karena tekanan yang meningkat di sana, air keluar melalui celah operkulum, di mana akan bersentuhan dengan lembaran insang dan menyebabkan pertukaran gas (Putra, 2014). Insang gurami terdiri dari empat filamen di setiap sisi, berwarna merah dan secara anatomis terletak di pangkal kepala, sepasang lamela membentuk satu filamen insang. Tiga komponen dari satu filamen insang adalah rigi-rigi insang, lengkungan insang (*arcus branchiali*), dan sepasang lamela (Solikhah, 2015).

Insang adalah organ yang sangat berperan penting dalam proses respirasi pada ikan. Sama halnya dengan fungsi paru-paru pada hewan mamalia. Insang berfungsi untuk proses pertukaran antara  $O_2$  (oksigen) dengan  $CO_2$  (karbondioksida). Kapiler darah pada insang akan mengambil oksigen yang telah larut dalam air, akan terjadi proses difusi dan karbondioksida akan dibuang ke air melalui insang (Pertiwi *et al*, 2017). Ikan gurami sering terlihat pada permukaan air dengan mulutnya yang menonjol keluar, gerakan ini adalah usaha untuk menarik oksigen dari udara bebas yang telah dilepaskan ke dalam air yang sekitar insang (Veronica, 2017). Oksigen yang terisap akan diikat oleh labirin.

Ikan memiliki tambahan pernafasan yang disebut labirin. Lembaran Pertama insang adalah turunan dari alat pelengkap ini. Lubang kosong di belakang atau di atas insang terdapat labirin. Saat muncul di permukaan air, udara ditampung di lubang labirin. Filamen berfungsi sebagai organ sensorik, sedangkan labirin berfungsi sebagai organ pernapasan (Yuda, 2013).

Terdapat sangat banyak kapiler darah di insang ikan, dimana darah merupakan sumber yang kaya akan nutrisi dan sangat cocok untuk perkembangbiakan mikroorganisme seperti parasit, bakteri, virus dan jamur (Priosoeryanto *et al*, 2010). Sistem pernapasan ikan yang berhubungan erat dengan air disebut insang. Menurut Hardianty (2016), perairan yang terkontaminasi bisa merusak sistem pernapasan ikan, terutama pada insang dan labirin dan juga dapat membahayakan sistem pernapasan ikan. Selain itu, insang mengontrol pergantian mineral dan garam serta pembuangan sisa industri yang mengandung nitro oksida. Air sebagai media hidupnya, dan insangnya berada di luar dan bersentuhan langsung dengan air. Lingkungan air yang tercemar karena pencemar yang terlarut, maupun yang tersuspensi dapat berpengaruh pada insang. Oleh karena itu, setiap modifikasi pada lingkungan perairan akan akan berdampak langsung pada susunan dan kegunaan insang.

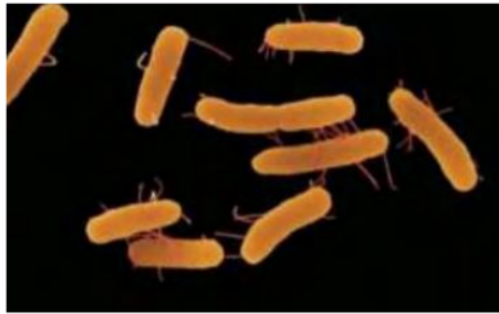
## **2.2 Bakteri *Salmonella sp.***

Theobald Smith pertama kali menemukan *Salmonella sp.* dalam tubuh babi pada tahun 1885 (yang terkenal sebagai hasil analisis), tetapi Daniel E. Salmon seorang ahli Patologi AS yang menamai *Salmonella sp.* (Masita, 2015). Genus bakteri yang paling umum menyebabkan foodborne disease di dunia adalah

*Salmonella sp.* menurut Organisasi Kesehatan Dunia (WHO, 2014). Kurangnya penelitian sampai saat ini tentang Salmonellosis yang dilakukan di laboratorium sehingga meningkatkan bahaya yang menyebabkan penyakit oleh infeksi *Salmonella sp.* di negara berkembang. Taksonomi bakteri *Salmonella sp.* antara lain yaitu: cingdom <sup>22</sup> *Bakteria*, Filum *Proteobacteria*, Kelas *Gamma proteobacteria*, Ordo *Enterobacteriales*, Famili *Enterobacteriaceae*, Genus *Salmonella*, Species *Salmonella sp.* Genus *Salmonella sp.* dan spesies lebih dari 2000 serovar. Serovar yang dapat ditemukan di Asia Tenggara dan India antar lain adalah : *S. aberdeen*, *S. agona*, <sup>47</sup> *S. albany*, *S. Anatum*, *S. arizonae*, *S. Bradvord*, *S. Brunei*, *S. Drypool*, *S. Enteritidis*, *S. Havana*, *S. Javiana*, *S. Paratyphi B*, *S. Paratyphi B java*, *S.typhi*, *S. Typhymurium*, *S. Weltevreden*, *S. Worthington* dan terdapat lebih dari 70 jenis lainnya (Olgunoglu, 2012). *Salmonella sp.* secara epidemiologi dikategorikan jadi 3 kelompok: (1) *Salmonella sp.* yang cuma menginfeksi orang, seperti *S. typhi* dan *S. paratyphi* (2) *Salmonella gallinarum* <sup>31</sup> (ayam), *S. dublin* (sapi), *S. abortus -equi* (kuda), *S. abortusovis* ( domba), dan *Salmonella cholerasuis* (babi), sebagian dapat berbahaya bagi manusia serta bisa ditransfer oleh perantara makanan (3) Serovar *Salmonella sp.* yang tidak bisa beradaptasi (tidak butuh inang) (Muzadin, 2018).

### <sup>42</sup> 2.2.1 Morfologi

Bakteri *Salmonella sp.* adalah bakteri Gram negatif, bentuk basil, fakultatif anaerobik, <sup>2</sup> tidak memiliki spora, bersifat motil karena mempunyai flagela peritrikus (Nisa, 2018). Panjang *Salmonella sp.* bervariasi, sebagian besar isolate motil dengan flagel peritrika (Andari, 2022). Kecuali *S. pullorum* dan *S. gallinarum*, semua spesies *Salmonella* berbentuk batang lurus yang bergerak dengan flagel peritrichous. Dengan diameter 0,8 hingga 1,5  $\mu$ m dan panjang rata-rata 2 hingga 5  $\mu$ m, pada *Salmonella sp.* (Masita, 2015). Ciri-ciri umum bakteri *salmonella sp.* adalah sebagai berikut : pada jenis bakteri dapat berbentuk batang atau silinder, dengan panjang 2  $\mu$ m sampai 3  $\mu$ m dan diameter 0,3  $\mu$ m sampai 0,6  $\mu$ m, (dengan pengecualian bakteri *S. gallinarum* dan *S. pullorum* ) <sup>43</sup> adalah Gram negatif, berkembang dengan membelah diri, dan mengandung flagela peritrichous di seluruh permukaan sel ( Putra, 2021).



**Gambar 2.2** *Salmonella sp.* (Sinaga, 2016)

Warnaan gram pada *Salmonella sp.*, menurut Firmanda *et al.* (2013) cara warna pink dihasilkan karena setelah dicuci dengan alkohol, lipid di dinding sel bakteri Gram negatif pecah, menyebabkan pelepasan pewarna kristal violet dan hanya menyerap zat di dalam safranin. Bakteri gram negatif punya dinding sel



rumit, dan lapis tiga. Struktur sel mikroba *Salmonella sp.* terdiri atas : membran<sup>2</sup> luar berupa bilayer yang berfungsi sebagai penghalang selektif terhadap zat yang masuk atau keluar sel dan memiliki konsekuensi berbahaya, bagian lapisan kedua berupa lipopolisakarida, lapisan dalam berupa peptidoglikan tipis , lapisan luar adalah berupa lipoprotein yang bersifat permeabilitas tinggi (Dwicahyani *et al*, 2018).

### 2.2.2 Sifat Biokimia

Sifat bakteri *Salmonella sp.* antara lain: dapat bergerak, berkembang dalam lingkungan anaerobik dan aerobik fakultatif, memberikan hasil yang baik dalam reaksi fermentasi yang melibatkan sorbitol dan manitol dan hasilnya negatif bagi respons fermentasi indol, DNase, fenadolamin deaminase, uraase, laktosa, sukrosa, dan voges proskauer. Jika tertelan, *Salmonella sp.* dapat membahayakan manusia dan hewan. Kuman *Salmonella* dapat tetap hidup pada makanan tinggi lemak untuk waktu yang sangat lama. *Salmonella sp.* mudah mati pada suhu yang tinggi. Bakteri *Salmonella sp.* dapat memfermentasi laktosa dan sukrosa serta sederhana untuk tumbuh pada. Bakteri *Salmonella sp.* sanggup berubah glukosa menjadi manosa serta menghasilkan gas, asam, dan H<sub>2</sub>S (Andari, 2022).

Bakteri *Salmonella sp.* dapat bertahan di suhu antara 5 sampai 45°C dengan<sup>2</sup> suhu optimal 35 sampai 37°C dan mati pada suhu di bawah 4,1°C. Bakteri *Salmonella sp.* jika dalam medium dengan kadar garam lebih dari 9 % , kadar garam tinggi tidak dapat hidup dan akan musnah. Ketika *Salmonella sp.* terkena temperatur yang sangat tinggi atau rendah, yaitu 4 sampai 8°C atau 45 ° C dengan<sup>2</sup> nilai pH 4,4 atau 9,4 , ia akan berbentuk basil dan menghasilkan rantai filamen

yang panjang (Masita, 2015). *Salmonella sp.* merupakan mikroba yang umur panjang dalam kurun waktu yang lama, termasuk lebih dari 90 hari di air, 200 hari di tanah, dan 28 bulan di feses, menurut Rahmi *et al* (2014).

Infeksi bakteri *Salmonella sp.* juga disebarkan melalui transmisi fekal-oral, yaitu ketika hewan mengkonsumsi tinja dan bersentuhan langsung. enzim bakteri *Salmonella sp.* yang ditemukan yaitu katalase yang dapat memecah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Karena *Salmonella sp.* kekurangan enzim superoksida dismutase, yang mengubah H<sub>2</sub> menjadi peroksida, mereka memiliki karakteristik oksidase negatif. Ciri-ciri lain *Salmonella sp.* termasuk kemampuan untuk mengkonversi nitrat menjadi nitrit, dan kemampuan hidup pada kisaran pH 4 sampai 9, bahkan beberapa galur dapat bertahan pada pH 3,7 (Suryandari, 2018).

### 2.2.3 Cara Penularan

Hingga 80,1 % bakteri *Salmonella sp.* penularan terjadi melalui makanan, 6,3% antar manusia, dan 4,3% melalui hewan, sebaliknya menurut Standar Nasional Indonesia (SNI.7388:2009), *Salmonella sp.* memiliki batas residu maksimum dan batas maksimum untuk kontaminasi mikrobiologis pada makanan yang berasal dari hewan (SNI 3924:2009) kualitas daging dan karkas (Wibisono, 2022). *Salmonella sp.* disebarkan oleh makanan dan minuman yang terkontaminasi dan biasanya ditemukan di air, es, dan limbah kering. Jika bakteri ini memasuki area tubuh yang sesuai, akan berkembang biak hingga mencapai dosis infeksius (Rizkoh, 2021). Penyebaran bakteri *Salmonella sp.* terjadi karena beberapa faktor, diantaranya adalah faktor lingkungan seperti terbawa dari aliran

air hujan yang sudah tercemar *Salmonella sp.*, hasil ekskresi hewan sakit, pakan yang tercemar *Salmonella sp.*, sumber air yang terkontaminasi, proses pengolahan daging ikan yang berasal dari es, air, kontainer, dan cara penanganan yang salah (Poeloengan *et al.*, 2014).

#### **2.2.4 Bakteri *Salmonella sp.* pada ikan**

*Salmonella sp.* diisolasi dari ikan dan produk ikan, namun beberapa peneliti mengungkapkan bahwa bagian yang sering ditemukan bakteri *Salmonella sp.* yaitu pada bagian organ dalam, insang, serta kulit. Mengonsumsi daging ikan mentah tanpa diolah dan kontaminasi silang selama pengolahan merupakan penyebab utama salmonellosis. Bakteri *Salmonella sp.* adalah bakteri kontaminan yang sering ditemukan di dunia adalah *Salmonella weltevreden*. Pada makanan laut paling sering ditemukan *Salmonella worthington* dan diikuti *Salmonella weltevreden*. Ikan yang terkena *Salmonella sp.* kadang menunjukkan gejala klinis septikemia, akan tetapi ikan cenderung tidak menampilkan gejala klinis Salmonellosis (Olgunoglu, 2012).

#### **2.2.5 Gejala Klinis**

Berdasarkan pada tingkat bahaya yang ditimbulkan oleh infeksi *Salmonella sp.*, daging yang terkontaminasi akan mengalami perubahan tekstur jadi berlendir, tidak sedap, tidak sedap rasanya, juga menimbulkan masalah masalah kesehatan kalau dimakan (Ulfiani, 2022). Akibat dari kontaminasi bakteri *Salmonella sp.* dapat menyebabkan *food borne disease*, yang merupakan menyebabkan penyakit apabila menelan pangan yang telah terpapar bakteri berbahaya, virus, atau makanan yang tidak dimasak dalam air mendidih selama 10 menit. *Food borne*

*disease* dapat menyebabkan penyakit jika tidak dideteksi sejak awal (Andari, 2022). Infeksi bakteri ini pada manusia atau hewan dapat menimbulkan dengan kelainan sistem pencernaan, seperti kelainan pada lambung dan usus (Wibisono, 2020). Gejala kelainan pada pencernaan manusia termasuk yang signifikan secara manifestasi klinis seperti demam, pusing, dehidrasi, diare, sakit perut nyeri, muntah, dan mual. Diare akut dan persisten, bahkan kematian disebabkan oleh bakteri *Salmonella sp.* (Abd ElGhany, 2020; Anderson *et al*, 2016).

Kasus *food borne disease* yang paling banyak dijumpai adalah Salmonellosis. Bakteri *Salmonella sp.* menyebabkan gastroenteritis hingga infeksi sistemik yang biasa dikenal demam *typhoid*. Kepala sakit tiba-tiba, perut sakit, diarrhea, rasa ingin muntah, dan panas tinggi adalah gejala Salmonellosis. Bila terjadi dalam jangka panjang akan mengakibatkan dehidrasi berat (Aerita, 2014). Salmonellosis pada hewan dapat menyebabkan beberapa kerugian diantaranya yaitu bisa sampai mati, turunkan produksi ternak, keguguran, matinya bayi baru lahir, serta pemborosan komponen pangan terkontaminasi. Ada atau tidaknya gejala penyakit hewan yang sedang bunting dapat mengalami aborsi atau keguguran. Salmonellosis menyebabkan demam, anoreksia, lesu, dehidrasi, dan kehilangan nafsu makan hingga empat hari, setelah tidak sehat kematian mungkin terjadi, dan setelah beberapa minggu atau bulan, tubuh dapat pulih dengan sendirinya. Gejala demam terlihat pada beberapa kasus Salmonellosis subakut tetapi tidak semua. Anak sapi yang sering terserang penyakit antara usia satu sampai dua bulanan, menunjukkan gejala septikemia berat, radang sendi atau peradangan menjadi gejala penyakit yang menuju kronis. Sementara angka tingkat

kematian 10-20% atau lebih, angka morbiditas bisa mencapai 80 % (Pudjiatmoko, 2014).

#### **2.2.6 Cara Pencegahan**

Penggunaan antibiotik dengan tujuan menurunkan infeksi dan meminimalkan gejala yang signifikan merupakan salah satu cara untuk mengobati gangguan infeksi yang disebabkan oleh *Salmonella sp.* (Aulia, 2015). Sebagai bagian upaya pengendalian, perlu dilakukan penyadaran peningkatan kesadaran terhadap penyakit salmonellosis di kalangan masyarakat umum. Dari masa periode pemeliharaan hingga pengolahan, infeksi *Salmonella sp.* dapat dihindari. Tempat untuk berjualan harus dibersihkan baik sebelum maupun sesudah digunakan, dan lokasi lapak yang digunakan untuk berjualan harus rutin didesinfeksi menggunakan disinfektan alami yang aman bagi pelanggan. Deteksi kasus, kebersihan, pencegahan lingkungan, kontaminasi dalam bisnis makanan, menurunkan jumlah reaktor Salmonellosis, pendidikan kesehatan masyarakat, dan pemberantasan asal infeksi adalah metode pencegahan yang efektif (Detha & Datta, 2015; Wibisono, 2020).

#### **2.2.7 Patogenesis**

Bakteri *Salmonella sp.* terbawa lewat makanan maupun benda yang lain dengan memasuki saluran pencernaan. Pada bagian gastrointestinal bakteri dihancurkan asam yang dihasilkan lambung. Tetapi, yang berpenetrasi dapat menembus ke dalam usus kecil. Mukosa, usus kecil, dan usus besar semuanya dikolonisasi oleh bakteri. Hidup intraseluler dan berkembang biak. Degenerasi enzim batas sikat terjadi ketika bakteri menuju epitel dan IgA tidak

dapat mengelolanya, membran sitoplasma terbalik, menyerupai vakuola fagositik mengelilingi sel bakteri. *Salmonella sp.* akan membelah diri didalam pencernaan penderita, yang akan menyebabkan terjadinya enteritis atau peradangan usus. Poliferasi menyebabkan peradangan usus dan penghancuran mukosa pada usus, serta organ pencernaan. *Sallmonella sp.* sebagai yang menyebabkan *dhiarre*, diakibatkan dari bakteri memproduksi toxic yang dinamakan zat sitotoksik dan enterotoksik (Arifin, 2015).

### 2.3 Uji *Total Plate Count* (TPC)

Jumlah mikroba bisa dihitung baik secara langsung maupun tidak secara langsung. Dengan menggunakan alat yang dikenal sebagai hemositometer, semua bakteri masih hidup atau sudah mati yang ada di media dihitung secara langsung (menggunakan penghitung sel Petrof-Hauser). Sedangkan ada beberapa teknik untuk melakukan perhitungan tidak langsung, antara lain penyaringan, pencacahan lempeng, dan pengukuran berat (Romadhon, 2016).

Jumlah total mikroorganisme ditemukan dalam sampel makanan dan bahan pangan dapat ditentukan dengan menggunakan teknik *Total Plate Count* (TPC). Kuantitas mikroorganisme dan kepatuhan terhadap pedoman yang ditentukan harus dibatasi dalam bahan pangan. Teknik penuangan (*pour plate*) dan metode permukaan (*plate menyebar*) yaitu dua variasi dari metode TPC. Pendekatan penuangan meliputi penambahan 15 sampai 20 ml *Nutrient Agar* (NA) yang telah didinginkan (47 sampai 50°C) ke dalam plate bersama dengan sejumlah sampel (1 ml atau 0,1 ml) mendekati yang diperlukan, kemudian homogenkan campuran tersebut, untuk menyebarkan sampel secara merata. Teknik permukaan (*penyebar*)

digunakan untuk menanam benih, dan kemudian ditambahkan hingga 0,1 ml sampel yang diencerkan diambil menggunakan spuit dan ditetesi pada bagian atas media *Nutrient Agar* (NA). Setelah itu, ratakan dengan kaca tongkat bengkok yang bersih (Wati, 2018).

Dengan mengintroduksi sel bakteri hidup agar dapat tumbuh pada medium, mikroorganisme tersebut dapat berkembang dan membentuk koloni yang dapat dilihat tanpa mikroskop (Fauzia, 2021). Air yang bersih, jumlah residu desinfektan, cara pengolahan, masa air untuk pengujian, suhu, dan masa inkubasi adalah faktor yang mempengaruhi hasil TPC (Martoyo *et al*, 2014). Menurut Handoko (2012), yang mencerminkan konsep higienitas dan sanitasi pada bahan pangan yaitu nilai TPC atau jumlah total mikroba.

**Tabel 2.2** Pengelompokan Data Perhitungan Hasil TPC

Jumlah Koloni / Cawan Petri ( <i>Colony Form Unit</i> )	Keterangan
30 sampai 300	Bisa dijumlahkan
Lebih kecil dari 30	TKUD (Terlalu kecil untuk dihitung)
Lebir besar dari 300	TBUD (Terlalu besar untuk dihitung)
Koloni tidak terbentuk dan lebih besar $\frac{1}{4}$ plate	<i>Spreader</i>

Oleh : Harti, 2015

Teknik ini memiliki manfaat adalah hanya menghitung sel mikroba yang hidup, tidak termasuk yang mikroba yang mati dan juga menghitung beberapa bakteri sekaligus. Sementara kekurangan metode ini adalah membutuhkan banyak waktu

dan sumber daya dan menghitung sekelompok banyak sel dihitung menjadi satu koloni (Hazan *et al*, 2012).

## **2.4 Isolasi serta Identifikasi *Salmonella sp.***

### **2.4.1 Media Enrichment**

Penanaman bakteri dalam medium *Salmonella-Shigella Agar* (SSA) dilakukan pada media pengaya, dan menggunakan media namanya *Tetrathionate broth*, dilakukan dengan suhu 37°C selama 24 jam. Kemampuan bakteri Gram positif kemampuan bakteri untuk berkembang biak dapat dibatasi oleh komponen spesifik dalam kaldu tetrathionate, seperti garam empedu. Ketika kalium iodida (I<sub>2</sub>KI) ditambahkan ke media, tetrathionate diproduksi. Karena memiliki enzim tetrathionate reductase, bacterium *Salmonella sp.* dapat tumbuh subur dalam media kaldu tetrathionate (Pytri, 2021).

### **2.4.2 Uji *Salmonella-Shigella Agar* (SSA)**

Media khusus yang dikenal sebagai *Salmonella-Shigella Agar* (SSA) sering digunakan untuk menemukan kontaminasi bakteri *Salmonella sp.*. Garam empedu, brilian hijau, dan natrium sitrat adalah bahan dalam media SSAs yang bekerja untuk menekan bakteri gram positif dan fermentasi laktosa tertentu (Tille, 2014). Untuk isolasi bakteri digunakan medium *Salmonella-Shigella Agar* (SSA) dan menghasilkan koloni yang cembung, melingkar, dan permukaan halus, bertepi rata, mengkilap, dan memiliki titik hitam ditengahnya. Warna hitam pada tengah media disebabkan oleh kemampuan bakteri untuk menghasilkan H<sub>2</sub>S. Jika koloni menunjukkan warna bening tanpa titik hitam merupakan bakteri *Shigella sp.*



Perbedaan mendasar antara berbagai jenis bakteri adalah tingkat metabolisme yang berbeda. *Shigella sp.* adalah bakteri yang tidak bisa mencerna laktosa dan membuat H<sub>2</sub>S dan tiosulfat reduktase, menyebabkan koloni yang dihasilkan menjadi transparan atau tembus cahaya. Media SSA sudah mengandung penghambat mikrobai selain bakteri *Salmonella sp.*, *Shigella*, dan *Escherichia*., oleh karena itu tidak memerlukan sterilisasi (Muktiningsih *et al*, 2016).

### 2.4.3 Pewarnaan Gram

Tujuan penggunaan pewarnaan Gram adalah untuk menggunakan melihat morfologi sel *Salmonella sp.* secara mikroskopik dan dengan menggunakan warna, dapat mengidentifikasi karakteristik dan kimia dari mikroorganisme. Bahan bahan untuk pewarnaan Gram antara lain crystal ungu, safranin, yodium, etanol, dan safranin. Fungsi dari crystal ungu adalah untuk berguna untuk mordan, mempercepat reaksi antara pewarnaan awal dan dinding sel, tujuan pemberian etil alkohol adalah untuk memungkinkan bakteri Gram positif bertahan pada tahap pewarnaan pertama karena pembentukan ikatan silang asam peptidoglikan dan asam teichoic, tetapi pada mikroba Gram negatif, warna yang awal akan hilang diakibatkan jumlah lipopolysaccharide besar di dalamnya (Delost, 2015).

Pewarnaan Gram diklasifikasikan jadi dua antara lain yaitu, Gram positif dan Gram negatif. Bakteri gram negatif (-) ditampilkan dalam warna merah, dan bakteri Gram positif (+) disorot dalam warna ungu. Menjadi pembeda warna pada bakteri Gram positif dan Gram negatif menunjukkan bahwa kedua jenis bakteri terdapat struktur dinding sel yang berbeda. Bakteri gram positif terdapat kandungan peptidoglycan yang tebal pada dinding selnya, tetapi pada bakteri

gram negatif memiliki kandungan peptidoglycan yang tipis pada dinding selnya (kandungan lemak banyak) (Fitri, 2011). Pewarnaan gram memiliki manfaat sebagai salah satu cara tercepat dan termurah untuk mengidentifikasi infeksi bakteri. Dibandingkan dengan kultur, proses ini jauh lebih cepat. Kerugian metode ini adalah cuma bisa dipakai sebagai analisis struktur bakteri dengan menggunakan pewarna untuk mengidentifikasi bentuk dan ukuran bakteri (Bulele, 2019).

#### **2.4.4. Uji Biokimia**

Untuk mengetahui ciri-ciri fisiologis bakteri yang diisolasi perlu dilakukan uji biokimia. Biokimia bakteri mempelajari bagaimana metabolisme sel sel bakteri bekerja. Deteksi bakteri tidak dapat dilakukan untuk mengetahui ciri morfologinya, akan tetapi dapat dilakukan untuk mengetahui ciri fisiologis bakteri juga. Sifat fisiologi bakteri penting untuk diketahui jika akan dilakukan deteksi bakteri, ciri fisik dari bakteri akan tampak serupa atau mungkin tidak dapat dikenali. Spesies bakteri dapat diidentifikasi dengan menggunakan pengujian biokimia pada koloni bakteri (Pakpahan, 2013).

Uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) bertujuan mencari tahu apakah bakteri dapat memfermentasi gula (glucose, lactose, serta sucrose). Kandungan dari TSIA adalah besi sulfat, yang menghasilkan menghasilkan hidrogen sulfida, dan fenol merah, dan yang bertindak sebagai indikasi keasaman. Bakteri diketahui dapat melakukan fermentasi Glukosa jika terdapat adanya asam (*acid*) atau warna kuning pada dasar media dan basa (*alkali*) atau warna merah pada lereng media. Jika bakteri dapat menfermentasi seluruh karbohidrat, maka akan terdapat warna

kuning pada dasar media (*Asam*). Jika bakteri tidak bisa menfermentasi seluruh karbohidrat maka akan terdapat warna merah di dasar media (*Basa*) serta terdapat warna merah pada bagian tepi media (*Basa*) (Anggraini, 2016).

Uji Simmon's Citrat Agar (SCA) berfungsi mengetahui adanya sumber sitrat pada karbon bakteri. Hasil uji citrat diketahui negatif (-) jika pada media tidak terjadi pergeseran warna dari hijau berubah ke biru. Jika positif (+) pada media terjadi pergeseran warna dari hijau berubah ke biru, dapat disimpulkan bahwa sitrat digunakan menjadi salah satu sumber karbon bakteri (Ummamie *et al.*, 2017).

Uji *Sulfidae Indole Motility* (SIM) berguna untuk mengetahui kandungan enzim tryptophanase dalam bakteri, sehingga bakteri dapat mengurai amino acid triptopan menjadi indole. Keberadan Pereaksi Ehrlich / Kovac yang mengandung para-dimetilamino benzaldehida, dapat ditambahkan untuk menentukan indole. Jika positif (+) maka akan terdapat bentukan penutup cincin berwarna merah pada bagian atas medium, karena triptofan, yang dapat menghasilkan indole, merupakan sumber karbon. Jika pada objek tidak ada memiliki permukaan peringatan merah, seperti lapisan cincin pada pembiakan, hasil percobaan dapat dibaca sebagai negatif (-) (Lumantouw, 2013).

Dengan memecah urea menjadi amonium dan karbon dioksida, tes urease mencoba mengidentifikasi enzim urease yang ada pada bakteri. Bakteri Gram negatif bentuk basil dan beberapa mempunyai enzim urease. Tes dapat dikatakan negatif (-) apabila tidak ada pergeseran rona warna menjadi merah muda pada

medium. Jika hasil positif (+) pada medium diasumsikan bahwa bakteri penghasil enzim urease dapat memecah urea menjadi amonia jika warnanya berubah menjadi merah atau muda (Anggraini, 2016).

Tujuan uji <sup>2</sup> *Methyl red* dan *Voges Proskauer* (MR-VP) adalah memastikan untuk memastikan kapasitas bakteri untuk mengoksidasi glukosa, memperoleh asam sebagai produk sampingan, dan menghasilkan kapasitas yang tinggi dalam uji MR. Tujuan dari uji VP adalah untuk menilai kemampuan organisme untuk menetralkan asam organik atau membuat senyawa non - asam sebagai hasil metabolisme glukosa asetilmetilkarbonil. Karakteristik masing-masing kultur bakteri ini ditentukan dengan meneteskan reagen MR dan reagen VP. Hasil MR positif bila terbentuknya kompleks berwarna merah muda hingga merah menunjukkan bahwa mikroorganisme tersebut menghasilkan asam. Hasil VP positif bila media berubah warna pada permukaan substrat menjadi lembayung (ungu dan patma) dan jika hasilnya negatif tidak menunjukkan perubahan warna apapun di media (Isnaeni, 2016).

### 1 III. MATERI DAN METODE

#### 3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Dilaksanakannya penelitian di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. Sampel yang diperoleh dalam penelitian ini dengan menggunakan sampel insang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) yang ikannya diperoleh dari Penangkaran ikan gurami Sidoarjo Jawa Timur. Penelitian ini dimulai pada tanggal 13 Januari – 24 Januari 2023.

#### 24 3.2 Materi Penelitian

##### 3.2.1 Bahan Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan sampel insang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) sebanyak 35 sampel yang diperoleh dari penangkaran ikan gurami di daerah Sidoarjo Jawa Timur. Bahan yang digunakan dalam uji *Total Plate Count* (TPC) yaitu medium *Nutrient Agar* (NA), *NaCl*, alkohol dan aquades. *Tetrathionate broth* (TTB) adalah bahan yang digunakan untuk pengayaan, medium *Salmonella-Shigella Agar* (SSA) merupakan bahan yang dipakai guna untuk isolasi bakteri, untuk pewarnaan Gram bahan yang digunakan adalah lugol iodine, safranin, *kristal violet*, *NaCl* fisiologis, aquadest steril, alkohol 96%. Bahan lain yang digunakan adalah aquadest steril, alkohol 70%, spirtus dan *oil emersi*. Medium yang dipakai untuk uji biokimia adalah *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), *Sulfide Indol Motility* (SIM), *Simon's Citrate Agar* (SCA), Uraase serta MR-VP.

### 3.2.2 Alat Penelitian

Instrumen penelitian antara lain sebagai berikut: kotak pendingin, pisau, test tube, tempattest tube, plastik susu, kantong plastik, label, mortir, stemper, *coloni counter*, bunsen, *objek glass*, *cover glass*, *beaker glass*, cawan petri, ose bulat, ose runcing, pipet tetes, pinset, spatula, mangkuk pewarna, kertas penghisap, korek api, penjepit kayu, kapas, *cotton bud*, timbangan dan kamera. Alat laboratorium penunjang yang dibutuhkan untuk kegiatan penelitian ini adalah *autoclave*, *vortex*, inkubator, mikroskop, dan *laminar airflow*.

## 3.3 Metode Penelitian

### 3.3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian deskriptif observasional yang dilakukan dengan menghitung nilai TPC (*Total Plate Count*) untuk mendeteksi jumlah total bakteri dan menggunakan media *Salmonella Shigella Agar* (SSA) untuk mengidentifikasi bakteri *Salmonella sp.* pada 35 sampel insang ikan gurami yang diambil dari tempat penangkaran ikan gurami Sidoarjo Jawa Timur.

### 3.3.2 Variabel Penelitian

Variabel bebas, variabel terikat, dan variabel kontrol merupakan tiga variabel yang digunakan dalam penelitian ini. Dalam penelitian variabel bebasnya menggunakan insang ikan gurami. Jumlah jumlah total bakteri adalah variabel dependen penelitian, dan kandungan *Salmonella sp.* Variabel Kontrol bergantung pada tempat asal ikan gurami.

### 3.3.3 Teknik Pengambilan Sampel

Sampel insang ikan diambil sebanyak 35 sampel dari ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) yang diambil langsung dari tempat Penangkaran ikan gurami Sidoarjo Jawa Timur. Ikan gurami dimasukkan kedalam kantong plastik, diberi label, kemudian masukkan kedalam wadah yang berisi es agar sampel ikan gurami tetap terjaga kesegarannya. Sampel ikan yang akan diuji dibawa ke Lab Mikro, FKH UWKS untuk dianalisis mikrobiologi secara langsung.

## 2 3.4 Prosedur Penelitian

### 3.4.1 Persiapan Penelitian

Peralatan disterilkan **sebelum penelitian** dilaksanakan yaitu dengan cara dicuci. Peralatan yang terbuat dari kaca contohnya *plate*, *objek glass* dan tabung reaksi disterilisasi terlebih dahulu dengan cara dimasukkan kedalam autoklaf dalam 30 menit, dan tekanannya 2 tm serta pH121°C.

### 46 3.4.2 Uji *Total Plate count* (TPC)

Pengujian **TPC** ditujukan untuk mengidentifikasi jumlah bakteri pada insang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*). Sebelum dilakukan pengujian, seluruh alat disterilisasikan dahulu menggunakan autoklaf. Siapkan lima tabung reaksi yang diisi dengan 9ml larutan NaCl fisiologis. Pada pembuatan pengenceran  $10^{-1}$  dilakukan dengan cara menggerus 1g sampel insang menggunakan mortir dan stemper, selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan sehingga terbentuk pengenceran yang  $10^{-1}$ . Agar memperoleh pengenceran  $10^{-2}$ , mengambil satu ml suspensi di tabung reaksi pertama kemudian dimasukkan

kedalam tabung reaksi kedua hingga terbentuk pengenceran yang  $10^{-2}$ . Pengenceran yang  $10^{-3}$  dilakukan menggunakan cara diambil 1ml dari pengenceran  $10^{-2}$ , metode yang sama dilakukan hingga memperoleh pengenceran ke  $10^{-5}$ . Selama proses pengenceran, hal ini dilakukan dalam kondisi steril. Sebelum dan sesudah melakukan perlakuan, mulut tabung reaksi didekatkan dengan api bunsen. Hal ini mencegah kontaminasi mikroba yang menempel pada mulut tabung reaksi. Selain itu, ujung pipet tidak boleh menempel pada dinding tabung reaksi saat memasukkan sampel (Bambang, 2014).

Setiap tabung reaksi diambil 1ml menggunakan pipet untuk dilakukan penanaman pada *Nutrient Agar* (NA) dengan cara ditetaskan dan diratakan menggunakan batang kaca bengkok dengan metode *spreader*, diberi label atau penomoran pada setiap cawan petri menggunakan spidol dan dibungkus menggunakan kertas payung. Cawan petri diinkubasi menggunakan inkubator dengan posisi terbalik untuk menghindari pengembunan. Suhu diatur dalam  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam, koloni bakteri akan terlihat dan dapat dilakukan proses perhitungan menggunakan *colony counter* dan secara manual. Koloni bakteri dapat diidentifikasi dengan memperhatikan bentuk dan bulat sempurna, apabila ditemukan bentuk yang tidak beraturan maka termasuk dalam cemarannya tetapi tidak digolongkan sebagai koloni bakteri (Putri, 2018).

<sup>28</sup> Cara menghitung koloni dalam cawan dan cara menggunakan data yang tersedia untuk menghitung jumlah koloni dalam satu sampel, biasanya SPC



“*Standar Plate count*” digunakan dalam hitungan cangkir. Penghitungannya sebagai berikut :

- 1) Semua plate jika memiliki antara 30 sampai 300 jumlah koloni atau sekitar 300 total koloni, dihitung.
- 2) Satu koloni mungkin termasuk sejumlah atau buram atau koloni yang tidak terlihat.
- 3) Sekumpulan baris tebal menyerupai koloni dapat dianggap sebagai satuan koloni.
- 4) Membandingkan dengan jumlah bakteri berdasarkan hasil pengenceran yang tertinggi dan pengenceran sebelumnya; jika hasil menunjukkan persamaan ataupun dua maka digunakan hitungan mikroba hasil sebelumnya.
- 5) Jika digunakan ulangan dalam pengenceran memenuhi standar, maka harus dicari rata-ratanya (Waluyo, 2008).

Perhitungan untuk jumlah koloni adalah :

$$\text{koloni per ml/per gr} = \text{Jumlah koloni percawan} \times \frac{1}{\text{Faktor pengenceran}}$$

Hasil penjumlahan untuk setiap pengenceran kemudian dimasukkan kedalam perhitungan dibawah ini :

$$\text{Jumlah kuman tiap sampel} = \frac{n_1 \times 10^2 + n_2 \times 10^3 + n_3 \times 10^4 + n_4 \times 10^5}{\Sigma n}$$

### 3.4.3 Pengayaan (*Enrichment*)

Sampel ikan gurame (*Osphronemus gouramy*) yang telah disiapkan diambil bagian insangnya kemudian dipotong kemudian disegel dalam kantung ASI dan digerus menggunakan mortar dan stamper. Setelah dihaluskan, selanjutnya dimasukkan kedalam tabung yang sudah diisi media *Tetrathionate broth* 5ml. Setelah itu homogenkan menggunakan *vortex* selama dua menit, selanjutnya inkubasikan selama 24 jam pada pH 45°C. Diamati rona medium *Tetrathionate broth* berubah keruh (Dermawan, 2017).

### 3.4.4 Isolasi Bakteri *Salmonella sp.*

Isolasi bakteri menggunakan medium selektif *Salmonella-Shigella Agar* (SSA) menggunakan metode *streak* langsung pada media SSA yang sudah disterilisasi dan terbebas dari kontaminasi. *Streak* dilakukan dengan cara membakar ose bulat diatas api bunsen, kemudian dinginkan ose disekitar tabung lalu dicelupkan pada sampel yang sudah dihomogenkan dengan media *Tetrathionate broth*. Ose digariskan dengan cara *menstreak* pada media selektif SSA, kemudian media SSA diinkubasi secara terbalik di Ph 35°C - 37°C dalam 24 jam. *Salmonella sp.* hasilnya yang positif menunjukkan koloni transparan atau tidak berwarna dengan titik hitam, *Salmonella sp.* dapat menyebabkan H<sub>2</sub>S diproduksi. Sodium citrat pada medium SSA yang bekerja dengan H<sub>2</sub>S sehingga terdapat titik gelap atau hitam di tengah koloni (Yuswananda, 2015).

### 3.4.5 Pewarnaan Gram

Uji identifikasi pewarnaan dilakukan dengan cara teteskan NaCl fisiologi pada permukaan *objek glass*. Oose dipanaskan dengan cara dibakar dengan api bunsen. Oose bulat digunakan untuk mengambil koloni, selanjutnya dicampur dalam cawan kaca dengan NaCl hingga suspensi bakteri terbentuk jadi lingkaran dengan ukuran kira-kira satu cm. Sediaan diambil dari hasil positif pada media *Salmonella Shigella Agar* (SSA). Ditunggu hingga mengering dan difiksasi menggunakan api bunsen. Setelah itu sediaan ditetesi dengan reagen oksalat kristal violet 1% ditunggu sebentar dan dibilas dengan air mengalir. Setelah itu larutan Lugol ditetaskan ke dalam sediaan dan dibiarkan bekerja sekitar satu menit, dicuci dengan air mengalir dan dicuci dengan alkohol 96% selama 10-20 detik. Terakhir, preparat ditetesi larutan pewarna safranin selama satu menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan di angin anginkan atau bisa menggunakan tisu atau kertas penyerap. Sesudah kering, preparat dijatuhi *oil emersi* dan dapat diamati di mikroskop pada perbesaran 1000x (Prayogi, 2016).

### 3.4.6 Uji Biokimia

Hasil positif dari media *Salmonella-Shigella Agar* (SSA) dengan koloni transparan atau tanpa warna dan terdapat titik-titik hitam di tengahnya, diinokulasikan pada media biokimia antara lain : *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), media *Sulfide Indol Motility* (SIM), media *Simon's Citrate Agar* (SCA), dan media Urease.

Koloni dari medium *Salmonella-Shigella Agar* (SSA) dipindahkan menggunakan loop, selanjutnya diinokulasikan di *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)

caranya yaitu ditusukkan atau ditancapkan di tengah media hingga dasar. Ose ditarik secara perlahan dengan gerakan maju mundur lalu diberi label yang sesuai dan diinkubasi dalam pH 35°C hingga 37°C sekitar 24 jam. Hasil yang positif (+) mengubah warna yang awalnya merah – orange jadi kuning dan apabila hasil negatif (-) tidak akan terdapat perubahan warna. Jika positif gas oksigen (O<sub>2</sub>) akan membuat media terangkat dan pecah. Jika positif *hidrogen sulfide* (H<sub>2</sub>S), akan terbentuk endapan berwarna hitam didalam media.

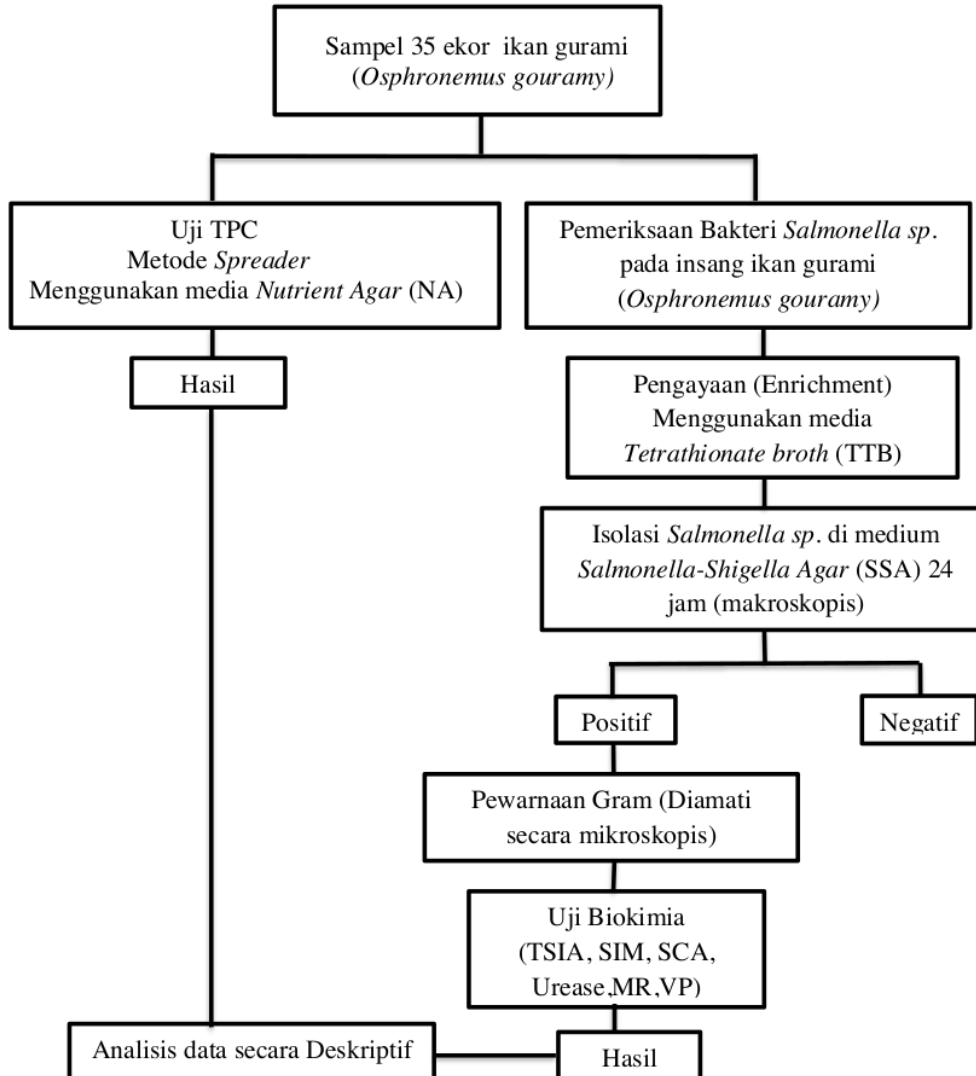
Setelah dilakukan uji TSIA selanjutnya di lakukan uji lain. Ose disterilkan dengan cara dipanaskan diatas api bunsen hingga bercahaya, dinginkan pada dinding tabung, ini dilakukan pada semua uji. Koloni mikroba diambil pada media dan diinokulasikan dimedia uji *Simon's Citrat Agar* (SCA), bakteri diinokulasikan menggunakan cara ditusuk serta digores di bagian lereng medium tersebut, dan ikubasi pada pH37°C dalam 24 jam. Hasil yang positif (+) akan merubah dari warna awalnya hijau menjadi biru.

Berikutnya, koloni bakteri diambil di medium SSA lalu dipindahkan di medium *Sulfide Indol Motility* (SIM) menggunakan ose lalu ditusuk kedalam tengah media dan diinkubasi pada 24 jam dan Ph 37°C, selanjutnya inkubasi media diteteskan 0,2 sampai 0,3 ml pereaksi indol kedalam setiap tabung lalu dihomogenkan lalu didiamkan sekitar beberapa saat. Jika reaksi indol positif (+) terjadi perubahan warna jadi merah di atas permukaan serta bentuk seperti cincin, bila reaksi indol negatif (-) maka ronanya berubah menjadi jingga.

Pengujian berikutnya yaitu uji Urease menggunakan medium urea base. Bakteri *Salmonella sp.* diinokulasikan pada media berbahan dasar urea yang diinkubasi pada pH 37°C dalam 24 jam, amoniak yang didapatkan akan menaikkan pH medium berubah jadi basa dan media berubah warna awalnya jingga berubah jadi warna merah (Anggraini, 2016).

Uji yang terakhir yaitu uji MR-VP. Diawali dengan bakteri diambil menggunakan ose steril lalu ditempatkan kedalam medium MR-VP dan inkubasi dalam 24 jam di pH 37°C. Keesokan harinya, dilanjutkan dengan uji MRVP dengan dibagi menjadi 2 pada tabung yang terpisah. Tabung pereaksi yang awal ditambahkan 3 sampai 4 tetes larutan Methyl Red 1%, bila warna media berubah menjadi merah, menandakan fermentasi asam campuran, menunjukkan hasil positif. 10 tetes larutan  $\alpha$ -naftol 5% dan 10 tetes larutan KOH 40% ditambahkan ke dalam tabung reaksi kedua. Tabung reaksi kemudian dihomogenkan atau dikocok dalam 20 sampai 30 detik, dan hasil positif ditunjukkan dengan cairan warna merah jambu atau asam (acid). Hasil negatif menunjukkan media tidak mengalami perubahan warna (Fallo & Sine, 2016).

### 3.5 Kerangka Operasional Penelitian



### 3.6 Analisis Data

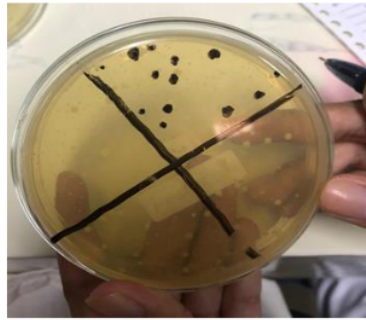
Dengan menghitung *Total Plate Count* ( TPC ) terhadap hasil jumlah total bakteri, data penelitian dianalisis. Analisis data perhitungan total bakteri menggunakan <sup>17</sup> *Standar Plate Count* (SPC) ini menjelaskan cara menghitung koloni pada plate dan memilih data yang tersedia untuk menghitung jumlah koloni dalam sampel. Hasil uji deteksi *Salmonella sp.* <sup>52</sup> dianalisis secara deskriptif berupa tabel dan gambar. Hasil yang diperoleh dibandingkan dengan <sup>9</sup> SNI 7388:2009 untuk mendapatkan batas maksimum cemaran mikroba pada ikan gurami.

## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil Penelitian

#### 4.1.1 Hasil Pemeriksaan Uji TPC

Penghitungan total koloni bakteri menggunakan *Standar Plate Count (SPC)*. Penghitungan jumlah bakteri yang tumbuh sesuai dari hasil uji TPC yang dilakukan pada pengenceran dengan jumlah hasilnya 30 sampai 300. Pada penelitian sampel yang diambil guna dilakukan pemeriksaan uji TPC adalah insang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) sebanyak 35 sampel yang diambil langsung dari penangkaran ikan gurami, Sidoarjo, Jawa Timur.



**Gambar 4.1** Pertumbuhan Bakteri di Media *Nutrient Agar (NA)*

Hasil rata - rata TPC yang diperoleh adalah  $12.95 \times 10^5$  CFU/gram. Hasil rata - rata analisis nilai *Total Plate Count (TPC)* di insang ikan ditunjukkan pada Tabel

4.1.

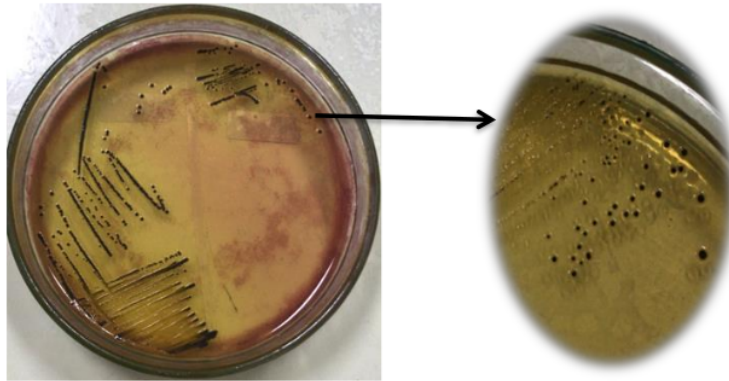
**Tabel 4.1** Hasil *Total Plate Count (TPC)* Insang Ikan Gurami

Sampel	Jumlah Sampel	Rata-rata Total Cemaran (CFU/gram)
Insang Ikan Gurami ( <i>Osphronemus gouramy</i> )	35	$12.95 \times 10^5 \pm 7.699$



#### 4.1.2 Hasil Deteksi Bakteri *Salmonella sp.*

Sampel insang ikan berasal dari pengayaan (*enrichment*) menggunakan media *Tetrathionate broth* diisolasi menggunakan medium selektif *Salmonella-Shigella Agar (SSA)* yang inkubasi pada pH 37°C dalam 24 jam dengan posisi terbalik.



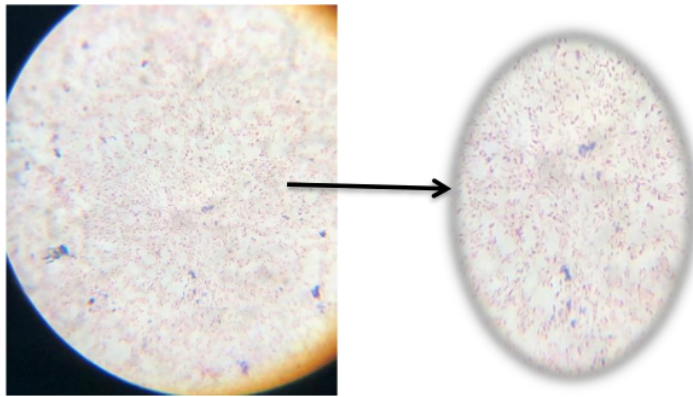
**Gambar 4.2** Hasil Tumbuh Bakteri *Salmonella sp.*

Berdasarkan hasil isolasi pada media SSA dan dilakukan pengamatan secara makroskopis terdapat bakteri dengan karakteristik koloni tidak transparan atau bening dengan titik hitam bagian tengah medium. Terbentuknya endapan hitam karena hasilkan *hidrogen sulfida* ( $H_2S$ ), yang menunjukkan kalau bakteri hasil isolasi diduga adalah bakteri *Salmonella sp.*

**Tabel 4.2** Hasil Isolasi dan Identifikasi *Suspect* Bakteri *Salmonella sp.*

Koloni pada Media SSA	Sampel	<i>Salmonella sp.</i>	
		Positif	Negatif
Koloni Tidak Berwarna Dengan Titik Hitam di Tengahnya	35 (100%)	35 (100%)	-

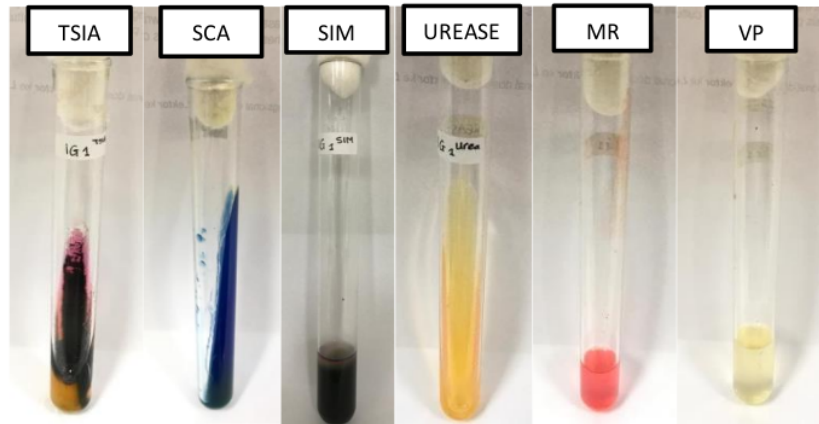
Berdasarkan semua sampel yang diduga positif *Salmonella sp.*, diambil kemudian dilakukan pengujian selanjutnya yaitu pewarnaan Gram. Larutan cristal violet 1%, Lugol's, alkohol 96% dan safranin digunakan untuk pewarnaan Gram.



**Gambar 4.3** Pewarnaan Gram dan Pemeriksaan Mikroskopis

Pada uji pewarnaan Gram diamati secara mikroskopis dengan perbesaran 1000x. Berdasarkan pengamatan pada pewarnaan Gram, hasil yang didapatkan 35 sampel (100%) menunjukkan bakteri *Salmonella sp.* adalah salah satu bagian dari Gram negatif mempunyai bentuk basil dan berwarna merah.

Berdasarkan hasil sampel yang diambil dari <sup>25</sup> media *Salmonella Shigella* Agar (SSA) diduga positif *Salmonella sp.*, dilanjutkan tes selanjutnya yaitu uji biokimia dengan media <sup>4</sup> *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), *Simons Citrat Agar* (SCA), *Sulfide - Indol Motility* (SIM), *Urease*, *Methyl Red* (MR), dan *Voges Proskauer* (VP).



**Gambar 4.4** Media TSIA, SCA, SIM, Urease, MR, VP

Hasil dari tes biokimia positif *Salmonella sp.* pada media TSIA yang menunjukkan adanya H<sub>2</sub>S, warna kuning (*acid*) pada bagian dasar dari media (*butt*), serta warna merah (*alkali*) pada bagian lereng atas medium (*slant*) dan tidak terbentuk gas. Hasil uji biokimia positif *Salmonella sp.*, media uji biokimia SCA menunjukkan adanya pergeseran warna medium awalnya warna hijau berubah jadi warna biru. Hasil uji biokimia positif *Salmonella sp.*, media uji biokimia SIM menunjukkan adanya H<sub>2</sub>S, negatif uji Indol dan bersifat motil. Hasil uji biokimia positif *Salmonella sp.*, media Urease menunjukkan tidak terdapat perubahan warna pada media. Uji urease merupakan uji pembeda bakteri *Salmonella sp.* dengan mikroba yang lain karena bakteri *Salmonella sp.* tidak mampu memproduksi urease. Hasil uji biokimia positif *Salmonella sp.*, media uji biokimia MR setelah ditambahkan *Methyl Red* 1% menunjukkan adanya hamburan berwarna merah pada bagian dalam media. Hasil uji biokimia positif *Salmonella sp.*, media uji biokimia VP setelah ditambah larutan KOH 40% dan  $\alpha$ -

napthol 5%, hasil negatif *Salmonella sp.* menunjukkan tidak terdapat perubahan warna di medium.

16

## 4.2 Pembahasan

### 4.2.1 *Total Plate Count* (TPC)

Hasil pada *Total Plate Count* (TPC) (**Lampiran 1**), menunjukkan bahwa 5 (lima) sampel dari 35 sampel yang diuji menunjukkan hasil cemaran mikroba berada didalam batas normal (sesuai) batas SNI (IG1,IG21,IG33,IG34,IG35), dan terdapat 30 sampel yang menunjukkan hasil cemaran mikroba diatas (tidak sesuai) batas SNI. Berdasarkan hasil *Total Plate Count* (TPC) diperoleh hasil yaitu dengan rata – rata  $12,95 \times 10^5$  CFU/gram. Artinya, pada setiap 1 gram insang ikan gurami tersebut terdapat  $12,95 \times 10^5$  koloni bakteri. Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa ikan gurami dari penangkaran ikan gurami Sidoarjo mengandung cemaran bakteri di atas ketentuan Standar Nasional Indonesia (SNI). Sesuai tercantum dalam pasal 4 SNI 7388:2009 menjelaskan bahwa batas total bakteri pada ikan yaitu sebesar  $5 \times 10^5$ . CFU./gram.

Dari 30 sampel (86%) yang tidak mematuhi standar karena dipengaruhi oleh penurunan kualitas dan kualitas ikan dan disebabkan juga dari lingkungan asal ikan. Konsisten klaim yang dibuat oleh Apriani *et al.* ( 2017 ) dalam penelitiannya bahwa bahwa bakteri merupakan mikroorganisme yang paling kuat mempengaruhi pembusukan daging ikan dan kualitas ikan dapat menurun setelah ikan mati. Namun, Hadinoto *et al.*, (2016) mengatakan bahwa jumlah bakteri yang ada dalam komponen makanan bergantung pada seberapa baik atau buruk zat tersebut digunakan dalam pemrosesan selanjutnya. Keadaan perairan tempat

tinggal ikan sangat berpengaruh terhadap kualitas ikan . Salah satu faktor yang mempengaruhi kekakuan daging ikan adalah debit air. Kontaminasi mikroba pembusukan menyebabkan kerusakan mikrobiologis pada ikan (Sukmawati, 2018). Konsisten dengan pernyataan yang dibuat oleh Apriani *et al.* ( 2017 ) dalam penelitiannya bahwa ikan merupakan bahan pangan hewani yang mudah terurai <sup>29</sup> karena mengandung banyak protein yang tinggi asam amino bebas yang digunakan dalam metabolisme karena itu amoniak, dari mikroorganisme, asam organik, keton, dan komponen belerang, sehingga kondisi tersebut dapat melemahkan kondisi kesehatan tubuh ikan.

Kulit tubuh ikan, sisik, dan sistem pencernaan semuanya termasuk mikrobiota yang khas. Hal ini sejalan dengan pernyataan Sukmawati, (2018) dalam penelitiannya bahwa cemaran mikroba pada makanan dapat disebabkan oleh jumlah mikroba awal pada ikan dapat berdampak pada jumlah mikroorganisme tambahan sehingga menyebabkan meningkatkan jumlah kuman mencemari produk perikanan. Gustini *et al.*, (2014) mengklaim bahwa kandungan air tubuh ikan yang tinggi menjadikan badan ikan substrat yang ideal untuk habitat hidup bakteri dan mikroba lainnya. Namun pendapat Bau, (2014) faktor di luar tubuh ikan dan keadaan ikan itu sendiri saat diambil merupakan faktor utama .sumber bahaya ikan dari sumbernya. Keadaan keadaan fisik dandan kimiawi ikan inilah yang menyebabkan kerusakan yang diakibatkan oleh kondisi ikan itu sendiri, sedangkan pencemaran dan tekanan fisik atau dampak dari penanganan ikan adalah penyebab kerusakan yang diakibatkan dari luar tubuh ikan.

Menurut Mzula *et al.*, (2019), parameter fisikokimia yang penting adalah suhu, pH, salinitas, daya hantar air dan oksigen terlarut rendah. Faktor lingkungan yang membuat ikan stres, membuat ikan rentan terhadap infeksi dan penyakit. Berdasarkan penelitian Kamelia *et al.*, (2018), hasil pengukuran TPC ikan dan parameter fisikokimia kualitas air menunjukkan adanya pengaruh antara kelimpahan bakteri dengan kualitas air. Pada insang terjadi proses pertukaran antara O<sub>2</sub> (oksigen) dengan CO<sub>2</sub> (karbondioksida). Oksigen terlarut dalam air akan diserap kedalam kapiler-kapiler darah pada insang sehingga terjadi proses difusi, dan karbondioksida dilepaskan ke dalam air melalui insang (Pertiwi *et al.*, 2017). Pada insang terdapat sangat banyak kapiler–kapiler darah, dimana darah merupakan sumber yang kaya akan nutrisi dan sangat cocok untuk perkembangbiakan mikroorganisme seperti parasit, bakteri, virus dan jamur (Priosoeryanto *et al.*, 2010).

Dalam kajian keamanan sesuai dengan Standar Nasional Indonesia (SNI) 2009, menyebutkan bahwa <sup>34</sup> ALT (*Angka Lempeng Total*) atau TPC (*Total Plate Count*) umumnya tidak terkait untuk risiko untuk keamanan pangan, namun bermanfaat untuk kualitas keamanan pangan, masa penyimpanan, hidup atau paruh, kontaminasi dan juga kondisi higienis dalam produksi makanan.

#### <sup>1</sup> 4.2.2 Deteksi Bakteri *Salmonella sp.*

Dengan digunakannya medium *Salmonella-Shigella Agar (SSA)*, dilakukan sebagai uji sampel awal. *Salmonella sp.* dapat diisolasi menggunakan medium SSA, yang adalah medium yang sangat efektif (Fatiqin, 2019). Media SSA dapat menghambat tumbuhnya Gram positif yang membuatnya lebih

menguntungkan bagi bakterium Gram negatif, terkhususnya bakteri *Salmonella*-*Shigella*, yang hidup subur serta tumbuh dan berkembang di lingkungan media tersebut (Maritsa, 2017). *Tetrathionate broth* (TTB) digunakan untuk inokulasi pada media SSA mengikuti prosedur pengayaan. Secara spesifik, garam empedu pada TTB dapat mencegah perkembangan bakteri Gram positif. Ketika kalium iodida (I<sub>2</sub>KI ) ditambahkan ke media, tetrasionat akan diproduksi. Karena mengandung enzim tetrathionate reductase, bakterium *Salmonella sp.* mampu hidup subur di medium TTB (Putri, 2021).

Berdasarkan pada (**Tabel 4.2** dan **Lampiran 2**) bakteri *Salmonella sp.* disolasi pada media SSA menunjukkan bahwa 35 sampel (semua sampel) menunjukkan koloni bening atau memiliki titik hitam di tengah dan tidak berwarna. Titik hitam dibagian tengah koloni disebabkan *Salmonella sp.* dapat membuat hidrogen sulfida (H<sub>2</sub>S) dan menghasilkan koloni tidak berwarna (transparan) karena tidak dapat mencerna laktosa. Endapan hitam terbentuk di inti koloni sebagai hasil reaksi antara H<sub>2</sub>S dan natrium sitrat yang ada dalam media SSA (Rosnani, 2016). Enzim tiosulfat reduktase digunakan oleh mikroba enterik tertentu untuk memecah natrium tiosulfat, yang terdapat dalam media SSA menjadi gas sulfit dan H<sub>2</sub>S. Interaksi H<sub>2</sub>S dengan ion besi atau besi sitrat menghasilkan pembentukan endapan besi sulfida hitam tidak larut , yang terlihat di tengah koloni sebagai bukti produksi gas H<sub>2</sub>S (Budiarmo, 2009). Berdasarkan hasil dari media uji SSA disimpulkan bahwa 35 sampel (100%), keseluruhan sampel menunjukkan *suspect* bakteri *Salmonella sp.*

Hasil dari pewarnaan Gram pada (**Gambar 4.3**) menunjukkan bahwa 35 sampel yang diperiksa dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x, maka didapatkan seluruh sampel peneliti menunjukkan warna pink kemerahan yang mengidentifikasi bakteri dari Gram negatif serta memiliki morfologi berbentuk batang panjang. Dinding sel pada bakteri Gram negatif cukup tipis mengandung lapisan peptidoglikan, sehingga akan sulit mengikat zat warna primer setelah ditetesi menggunakan alkohol 96%. Hasil dekolisasi sudah tidak mengikat kristal violet sebagai pewarna primer sehingga pewarna sekunder (safranin) akan mewarnai kembali peptidoglikan. Hasil pewarnaan yang diperoleh menunjukkan bahwa, sel bakteri yang bergram negatif akan terlihat berwarna merah setelah dilihat dibawah mikroskop. Menurut penelitian Putri (2016), mikroba *Salmonella sp.* adalah Gram negatif, bentuknya basil, dan berwarna merah.

Identifikasi bakteri *Salmonella sp.* selanjutnya yaitu menggunakan uji biokimia (**Gambar 4.4**). Uji biokimia dilakukan untuk lebih memahami fungsi metabolisme sel bakteri dan untuk memastikan bahwa koloni yang ditemukan benar – benar bakteri *Salmonella sp.* <sup>4</sup> *Triple Sugar Iron Agar (TSIA)*, *Simmon's Citrate Agar (SCA)*, *Sulfide Indole Motility (SIM)*, *Urease*, *Methyl Red (MR)*, dan media *Voges Proskauer (VP)*, digunakan untuk pengujian biokimia. Menghasilkan gas, H<sub>2</sub>S, menggunakan sumber energi tambahan (uji urea, sitrat, nitrat), memiliki sifat metabolik (uji oksidasi/fermentasi), gula fermentasi (glukosa, laktosa, sukrosa, manitol), menghasilkan asam campuran (MR/VP), indol dan motil ditentukan oleh uji biokimia. Pengujian dilakukan dengan memanaskan ose terlebih dahulu, kemudian mengeluarkan koloni satu per satu



dilakukan dengan menempatkannya pada media uji biokimia. Kemudian diinkubasikan selama 24 jam dalam pH 37°C, periksa media untuk mengetahui perubahan (Syabaniar *et al*, 2017).

*Triple Sugar Iron Agar (TSIA)* yaitu medium yang berfungsi dalam melakukan uji biokimia pertama. Tes TSIA memeriksa apakah bakteri menghasilkan gas atau tidak, yaitu H<sub>2</sub>S. Dengan hasil yang baik perubahan warna, uji TSIA digunakan untuk memastikan kemampuan mikroorganisme memfermentasi karbohidrat (glukos, laktosa, dan sukrosa). Media yang digunakan terdiri dari dua komponen yaitu lereng (slant) dan alas (butt). Respon positif untuk *Salmonella sp.* pada TSIA menghasilkan produksi H<sub>2</sub>S (hitam pada media sampai menutupi warna dasar media, dengan atau tanpa menghasilkan gas), pada bagian miring dari TSIA yang berwarna merah (basa) dan di bagian dasar berwarna kuning (asam) (Sari, 2012). Bakteri *Salmonella sp.* biasanya menghasilkan gas dan memiliki respon negatif terhadap laktosa yang ditandai dengan tidak adanya perubahan warna, bahkan menghasilkan reaksi laktosa positif, temuan ini dapat dicirikan sebagai bukan *Salmonella sp.* kecuali pada media TSIA menghasilkan reaksi asam dimana media berubah menjadi kuning (SNI, 2006).

*Salmonella sp.* teruji positif pada media *Simmons Citrat Agar (SCA)* yang ditunjukkan dengan berubah warna dari hijau menjadi biru akibat adanya sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon yang menandakan bahwa bakteri dapat berkembang dengan memanfaatkan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon untuk pertumbuhan mikroba (Afriyani dkk, 2016). Untuk *Salmonella typhi* yang tidak memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon, *Salmonella sp.* sering

menghasilkan temuan positif dalam uji sitrat. Penggunaan sitrat oleh bakteri untuk menaikkan kadar pH, yang membuat asam dalam biakan hilang, warna media berubah dari hijau menjadi biru. Permease sitrat adalah protein yang membantu pengangkutan sitrat ke dalam sel. Sebagai hasil dari reaksi ini, natrium karbonat yang dibuat ketika karbon dioksida bereaksi dengan natrium dan air, yang menyebabkan reaksi basa dalam medium. Indikator biru bromtimol yang ditambahkan medium berubah dari hijau menjadi biru prusia tua dengan adanya natrium karbonat (Ulfa *et al*, 2016).

*Salmonella sp.* dapat dideteksi dengan menggunakan tes *Indole Motility Sulfide* (SIM), yang memberikan hasil negatif ketika cincin merah tidak berkembang sebagai respons terhadap tes Indole (Tantri, 2016). Tidak adanya lapisan merah muda (cincin) pada permukaan biakan menunjukkan bahwa bakteri tidak menghasilkan indol dari triptofan sebagai sumber karbon, *Salmonella sp.* menghasilkan hasil negatif untuk uji indol (Hidayati, 2016). Temuan positif untuk *Salmonella sp.*, jika bakteri diidentifikasi dengan menyebarkan pertumbuhan bakteri, dikatakan bergerak (motil), dan jika diperoleh satu garis saja, dikatakan tidak bergerak (non motil) (Sudarsono, 2008). Pada uji SIM, yang mana ditentukan oleh pertumbuhan bakteri yang menyebar atau bergerak ( motil ), dan ada tidaknya H<sub>2</sub>S, *Salmonella sp.* sering membuahkan hasil yang positif . Tes *Indole Motility Sulfide* (SIM) berusaha untuk memastikan mobilitas bakteri. Pada pengujian ini warna media SIM berubah menjadi hitam, dan dapat mengamati gerakan ( motilitas ) di media yang tertusuk ose (Afriyani *et al*, 2016).

Ketika indikator fenol merah ditambahkan ke media uji urease, media akan tetap kuning bukannya berubah menjadi merah muda, menunjukkan hasil negatif *Salmonella sp.* Spesies *Salmonella sp.* diuji negatif untuk produksi urease, menunjukkan bahwa bakteri tersebut tidak dapat memproduksi urease. Media tetap berwarna kuning atau tidak ada perubahan warna yang merupakan tanda uji urease pada *Salmonella sp.* yaitu negatif. Disebabkan oleh hubungan yang tidak terputus antara karbon dan nitrogen, yang ketika diputus oleh enzim urease, menghasilkan amonia dan mengubah pH medium. Setelah 24 jam inkubasi, hasil negatif terlihat pada media, apabila tidak terjadi pembentukan warna merah muda (Fallo & Sine, 2016).

Pada penambahan larutan *Metil Red* 1% ke dalam media, warna media berubah menjadi merah, hal ini menunjukkan bahwa hasil uji *Metil Red* (MR) pada *Salmonella sp.* berhasil. Uji MR untuk *Salmonella sp.* Umumnya menghasilkan temuan positif (SNI, 2008). Tes Methyl Red, menurut Sudarsono (2008), mencoba memastikan kemampuan bakteri untuk mengoksidasi glukosa dengan menghasilkan asam dalam jumlah besar sebagai produk sampingan. Melalui pengujian MR, diketahui bahwa jalur fermentasi asam campuran menghasilkan asam laktat, asam asetat, asam format, dan asam suksinat sebagai produk sampingan dari fermentasi glukosa. Selanjutnya pH akan turun menjadi 5,0 atau lebih rendah karena pengembangan asam campuran. Hasilnya, indikator *Metil Red* (MR) akan menjadi merah bila diletakkan pada biakan dengan pH rendah tersebut (Sardiani *et al*, 2015).

Hasil uji *Voges Proskauer* (VP), bila larutan KOH 40% dan larutan - naphthol 5% digabungkan maka hasil uji *Voges Proskauer* (VP) akan menunjukkan hasil positif berwarna merah kecoklatan sedangkan *Salmonella sp.* tes akan menunjukkan hasil negatif tanpa perubahan warna. Bakteri *Salmonella sp.* dapat melakukan fermentasi karbohidrat menjadi produk asam tanpa menghasilkan produk netral seperti asetonin . Dengan menggunakan uji VP, adalah mungkin untuk menilai kapasitas organisme untuk mensintesis senyawa non asam atau produk akhir netral , seperti asetilmetil karbonil, dari asam organik sebagai hasil metabolisme glukosa ( Fallo & Sine, 2016 ). *Salmonella sp.* sering menghasilkan uji VP negatif, artinya tidak ada perubahan warna pada medium ( SNI, 2008) .

Hasil dari deteksi bakteri *Salmonella sp.* dari uji biokimia sebagai uji konfirmasi setelah dilakukan isolasi bakteri *Salmonella sp.* menggunakan media SSA dan juga pewarnaan Gram (**Lampiran 2**). Menurut SNI (2009 & 2008), *Salmonella sp.* harus negatif di dalam otot/25 g. Hal ini menunjukkan bahwa masih terdapat bakteri *Salmonella sp.* pada ikan dan air di penangkaran ikan Gurami Sidoarjo, Jawa Timur. Menurut SNI (2009), juga menyebutkan bahwa batas maksimum cemaran bakteri *Salmonella* pada ikan adalah negatif/gram. Sesuai SNI didalam ikan segar harus memberikan hasil yang negatif atau tidak terhadap kandungan bakteri *Salmonella sp.* yang ditandai dengan tidak adanya koloni berwarna hitam transparan pada medium *Salmonella Shigella Agar* (SSA) (Sahara, 2017). Hal ini karena *Salmonella sp.* dapat menyebabkan penyakit Salmonellosis. Faktor meningkatnya penyebaran bakteri *Salmonella sp.* dapat

disebabkan oleh ketersediaan nutrisi dan faktor yang mendorong lingkungan perkembangan mikroorganisme tersebut (Nugraha *et al*, 2012)

Faktor lain yang bisa mempengaruhi kontaminasi bakteri *Salmonella sp.* dalam kasus produk perikanan, hal ini dapat disebabkan oleh lingkungan yang dapat mendukung perkembangan bakteri antara lain lokasi yang berlumpur dan lembab serta cuaca yang cerah pada saat pengambilan sampel. Cara ini meningkatkan suhu ruangan relatif panas, dapat membuat pertumbuhan bakteri yang sangat tinggi. Suhu mendorong pertumbuhan bakteri *Salmonella sp.* dapat tumbuh dengan baik dan cepat karena pada suhu yang hangat, setiap sel dapat membelah setiap 20 menit sekali. Menurut Irianto (2006), bakteri akan berkembang dengan baik pada suhu 37 ° C, namun pada periode tersebut mereka sangat membutuhkan air, karena itu banyak bahan makanan dengan kandungan air yang lebih tinggi akan lebih cepat membusuk daripada makanan yang tidak banyak mengandung air, meskipun dalam keadaan kering.

Di mana saja dapat terkontaminasi *Salmonella sp.*, meskipun pengaturan tropis dengan suhu lingkungan yang tinggi dengan musim panas yang terik adalah yang paling kondusif. Sesuai pernyataan Duta *et al*, (2015) bahwa pH luar ruangan yang tinggi akan merangsang pertumbuhan *Salmonella sp.* Kontaminasi yang tinggi mungkin disebabkan oleh kurangnya sanitasi dan kebersihan diri, peralatan, bahan dan lingkungan selama proses pengambilan sampel. *Salmonella sp.* kontaminan makanan pencemar bisa dapat ditemukan di udara, air, dan tanah, menurut Arifah (2010), sehingga bahan makanan yang sudah lama berada diudara terbuka dapat menjadi terkontaminasi oleh bakteri *Salmonella sp.*.

Bakteri *Salmonella sp.* dapat dijumpai diperairan, tanah, kotoran hewan atau hewan lain. Kehadiran spesies *Salmonella sp.* dipercaya juga bahwa air yang digunakan di penangkaran tidak cukup murni sehingga rentan terhadap juga kontaminasi. *Salmonella sp.* menyebar dan berkembang di media baru ketika ketika hewan dan manusia mengkonsumsi atau meminum air dan makanan yang terinfeksi (Une, 2022). Kebersihan lingkungan juga perlu diperhatikan, seperti tempat penampungan air dan kolam penampungan ikan yang kotor, peralatan yang belum dibersihkan dengan benar. Pencemaran juga bisa berasal dari kotoran hewan yang dipelihara di dekat tempat pembenihan ikan.

Insang adalah organ yang mudah diserang oleh bakteri, ini karena insang bersentuhan langsung dengan air untuk respirasi. Selain itu, insang bukanlah alat gerak seperti sirip dan ekor, sehingga bakteri dapat dengan mudah menempel pada insang. Menurut Kamelia *et al.*, (2018), lamela insang merupakan organ yang berfungsi sebagai penyaring oksigen sekaligus patogen dapat diangkut dan disaring sedemikian rupa sehingga patogen mudah menempel pada lamela. Bahan organik dibagian bawah pada insang adalah makanan untuk patogen. Ikan yang terinfeksi dapat disebabkan karena faktor akuatik (lingkungan), stres, limbah pertanian, limbah domestik, patogen, kepadatan ikan yang berlebihan, residu musiman, dan akuakultur. Hal ini dibenarkan oleh Angeri *et al.*, (2018), bahwa ikan yang terkena penyakit dapat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan yang buruk. Faktor yang mempengaruhi adalah sisa pakan budidaya, stres, limbah pertanian, limbah domestik, patogen, berlebihan kepadatan ikan, dan musim.

Tindakan terhadap infeksi bakteri *Salmonella sp.*, yaitu dari tempat asal ikan dan meminimalisir akan terjadinya kontaminasi silang, tangan dicuci bersih sebelum dan sesudah menangani ikan segar, peralatan dicuci menggunakan detergen serta air mengalir dan dibasuh dengan air panas sebelum digunakan untuk menyiapkan bahan makanan lainnya (Apelabi, 2015).

## **V. KESIMPULAN DAN SARAN**

### **5.1 Kesimpulan**

Dapat disimpulkan temuan dari penelitian yang telah dilakukan bahwa :

1. Penghitungan TPC pada insang ikan gurami menampilkan hasil rata-rata dari semua koloni bakteri .  $12,95 \times 10^5$  CFU/gram.
2. Terdapat kandungan bakteri *Salmonella sp.* diantaranya pada media *Salmonella Shigella Agar (SSA)*, pewarnaan gram, dan uji Biokimia terdapat bakteri *Salmonella sp.* pada ke-35 sampel (100%).

### **5.2 Saran**

Dari penelitian, adapun saran dari penulis :

1. Bagi masyarakat, agar harus ekstra hati-hati saat memilih ikan digunakan untuk dikonsumsi. Ikan harus benar-benar diolah hingga matang, karena bakteri *Salmonella sp.* tidak dapat hidup pada suhu yang tinggi.
2. Bagi institusi, diharapkan dapat menjadi wawasan bagi pembaca sehingga mendapatkan informasi mengenai adanya bakteri pada ikan.
3. Bagi peneliti selanjutnya, diharapkan memperhatikan kebersihan alat dan bahan penelitian agar dapat menurunkan resiko penyebab adanya kontaminasi silang antara bakteri yang ada pada insang ikan dengan alat yang digunakan.



# SKRIPSI\_19820082\_ROSA MYSTICA NDUUA GORE Ke-2

## ORIGINALITY REPORT

10%

SIMILARITY INDEX

9%

INTERNET SOURCES

3%

PUBLICATIONS

2%

STUDENT PAPERS

## PRIMARY SOURCES

1	<a href="http://erepository.uwks.ac.id">erepository.uwks.ac.id</a> Internet Source	1%
2	<a href="http://repository.ub.ac.id">repository.ub.ac.id</a> Internet Source	1%
3	<a href="http://docplayer.info">docplayer.info</a> Internet Source	1%
4	<a href="http://jebas.org">jebas.org</a> Internet Source	<1%
5	<a href="http://qdoc.tips">qdoc.tips</a> Internet Source	<1%
6	<a href="http://scitepress.org">scitepress.org</a> Internet Source	<1%
7	<a href="http://id.123dok.com">id.123dok.com</a> Internet Source	<1%
8	<a href="http://journal.ubb.ac.id">journal.ubb.ac.id</a> Internet Source	<1%
9	<a href="http://theses.uin-malang.ac.id">theses.uin-malang.ac.id</a> Internet Source	<1%

10

[repository.usd.ac.id](https://repository.usd.ac.id)

Internet Source

&lt;1 %

11

Eva Safitri, Nur Annis Hidayati, Rossy Hertati. "PREVALENSI BAKTERI Salmonella PADA AYAM POTONG YANG DIJUAL DI PASAR TRADISIONAL PANGKALPINANG", EKOTONIA: Jurnal Penelitian Biologi, Botani, Zoologi dan Mikrobiologi, 2019

Publication

&lt;1 %

12

Freshinta Jellia Wibisono, Adhitya Yoppy Ro Candra, Mohammad Exceltyanto Widodo, Arief Mardijanto, Sheila Marty Yanestria. "Uji Kualitas (Organoleptis, Eber ) dan Identifikasi Cemaran Salmonella Sp. Pada Daging Ayam Dari Pasar Tradisional di Surabaya Barat", Jurnal Ilmu Peternakan dan Veteriner Tropis (Journal of Tropical Animal and Veterinary Science), 2022

Publication

&lt;1 %

13

[online-journal.unja.ac.id](https://online-journal.unja.ac.id)

Internet Source

&lt;1 %

14

[ejournal.uncen.ac.id](https://ejournal.uncen.ac.id)

Internet Source

&lt;1 %

15

[repository.unisba.ac.id](https://repository.unisba.ac.id)

Internet Source

&lt;1 %

16

[text-id.123dok.com](https://text-id.123dok.com)

Internet Source

&lt;1 %

---

17	<a href="http://ikameilaty.wordpress.com">ikameilaty.wordpress.com</a> Internet Source	<1 %
18	<a href="http://repository.uinjkt.ac.id">repository.uinjkt.ac.id</a> Internet Source	<1 %
19	Rizal Maarif Rukmana, Rika Siwi Utami. "Isolasi dan Identifikasi Bakteri Salmonellasp dan Serratia sp Pada Eksoskeleton Lalat Hijau (Chrysomya megacephala)", Biomedika, 2019 Publication	<1 %
20	Submitted to UIN Raden Intan Lampung Student Paper	<1 %
21	Submitted to Universitas Airlangga Student Paper	<1 %
22	<a href="http://ricky-ilmutakterbatas.blogspot.com">ricky-ilmutakterbatas.blogspot.com</a> Internet Source	<1 %
23	Submitted to Syiah Kuala University Student Paper	<1 %
24	Submitted to Universitas Pendidikan Indonesia Student Paper	<1 %
25	<a href="http://doaj.org">doaj.org</a> Internet Source	<1 %
26	<a href="http://news.unair.ac.id">news.unair.ac.id</a> Internet Source	<1 %

---

[scholar.unand.ac.id](http://scholar.unand.ac.id)

27	Internet Source	<1 %
28	<a href="ftp.unpad.ac.id">ftp.unpad.ac.id</a> Internet Source	<1 %
29	<a href="melyndadwipuspita.blogspot.com">melyndadwipuspita.blogspot.com</a> Internet Source	<1 %
30	<a href="repositori.uin-alauddin.ac.id">repositori.uin-alauddin.ac.id</a> Internet Source	<1 %
31	<a href="rozi-fpk.web.unair.ac.id">rozi-fpk.web.unair.ac.id</a> Internet Source	<1 %
32	Daimul Abror, Rasyadan Taufiq Probojati, Susi Ratnawati. "PKM PENGASAPAN IKAN YANG RAMAH LINGKUNGAN UNTUK MENINGKATKAN KUALITAS PRODUK, MANAJEMEN, DAN PEMASARAN DI DESA PENATARSEWU KECAMATAN TANGGULANGIN KABUPATEN SIDOARJO", Jurnal Abdi Masyarakat, 2022 Publication	<1 %
33	<a href="es.scribd.com">es.scribd.com</a> Internet Source	<1 %
34	<a href="repository.poltekkes-tjk.ac.id">repository.poltekkes-tjk.ac.id</a> Internet Source	<1 %
35	<a href="repository.upi.edu">repository.upi.edu</a> Internet Source	<1 %

36	<a href="https://123dok.com">123dok.com</a> Internet Source	<1 %
37	Asiska Permata Dewi, Reza Irma. "Identifikasi Cemaran Escherichia Coli Pada Makanan Jajanan yang Dijual di Kampus Universitas Abdurrab", <i>Journal of Pharmaceutical and Sciences</i> , 2023 Publication	<1 %
38	<a href="https://akutresno.wordpress.com">akutresno.wordpress.com</a> Internet Source	<1 %
39	<a href="https://id.scribd.com">id.scribd.com</a> Internet Source	<1 %
40	<a href="https://lib.unnes.ac.id">lib.unnes.ac.id</a> Internet Source	<1 %
41	<a href="https://media.neliti.com">media.neliti.com</a> Internet Source	<1 %
42	<a href="https://nophienov.wordpress.com">nophienov.wordpress.com</a> Internet Source	<1 %
43	<a href="https://repository.poltekkespim.ac.id">repository.poltekkespim.ac.id</a> Internet Source	<1 %
44	Hasna Ul Maritsa, Fitratul Aini, Ardiansyah Saputra, Desri Santi Nurhakim, Greace Meisinta Sihombing. "Isolasi dan Identifikasi Cemaran Bakteri Salmonella sp. pada Daging	<1 %

# Ayam dan Ikan Mentah", BIOSITE | BIOLOGI Sains Terapan, 2018

Publication

---

45	<a href="http://dergipark.org.tr">dergipark.org.tr</a> Internet Source	<1 %
46	<a href="http://docobook.com">docobook.com</a> Internet Source	<1 %
47	<a href="http://fugazi.var.fgov.be">fugazi.var.fgov.be</a> Internet Source	<1 %
48	<a href="http://jim.unsyiah.ac.id">jim.unsyiah.ac.id</a> Internet Source	<1 %
49	<a href="http://kartika-nursuci.blogspot.com">kartika-nursuci.blogspot.com</a> Internet Source	<1 %
50	<a href="http://pt.slideshare.net">pt.slideshare.net</a> Internet Source	<1 %
51	<a href="http://rekuninoo.wordpress.com">rekuninoo.wordpress.com</a> Internet Source	<1 %
52	<a href="http://repository.akfarsam.ac.id">repository.akfarsam.ac.id</a> Internet Source	<1 %
53	<a href="http://www.lankaweb.com">www.lankaweb.com</a> Internet Source	<1 %
54	<a href="http://www.scribd.com">www.scribd.com</a> Internet Source	<1 %
55	<a href="http://repo.unand.ac.id">repo.unand.ac.id</a> Internet Source	<1 %

---

56

idoc.pub  
Internet Source

<1 %

---

57

journal.ugm.ac.id  
Internet Source

<1 %

---

58

jurnal.unimus.ac.id  
Internet Source

<1 %

---

59

repository.unair.ac.id  
Internet Source

<1 %

---

---

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography Off