

III. MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. Pengambilan sampel 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.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel insang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) sebanyak 35 sampel yang diperoleh dari kolam air tawar di daerah Sidoarjo Jawa Timur. Bahan yang digunakan untuk uji *Total Plate Count* (TPC) adalah media *Nutrient Agar* (NA), *NaCl*, alkohol dan aquades. Bahan yang digunakan untuk mengkultur bakteri adalah media *Tetrathionate broth* (TTB), bahan yang digunakan untuk isolasi bakteri adalah media *Salmonella Shigella Agar* (SSA), bahan yang digunakan untuk pewarnaan Gram 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*. Media yang digunakan untuk uji biokimia adalah *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), *Sulfide Indol Motility* (SIM), *Simmon's Citrate Agar* (SCA), Urease dan MR-VP.

3.2.2 Alat Penelitian

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : *cool box*, pisau, tabung reaksi, rak tabung reaksi, 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 diperlukan dalam 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 melihat adanya total bakteri dan menggunakan media *Salmonella Shigella Agar* (SSA) untuk mengidentifikasi ada atau tidaknya bakteri *Salmonella sp.* pada 35 sampel insang ikan gurami yang diambil dari tempat penangkaran ikan gurami Sidoarjo Jawa Timur.

3.3.2 Variabel Penelitian

Penelitian ini menggunakan tiga variabel yaitu variabel bebas, variabel terikat dan variabel kontrol. Variabel bebas dalam penelitian ini menggunakan insang ikan gurami. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah total bakteri dan kandungan bakteri *Salmonella sp.* Variabel Kontrol bergantung pada tempat asal ikan gurami.

3.3.3 Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan 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 dimasukkan kedalam *cool box* yang berisi es agar kesegaran ikan gurami tetap terjaga. Sampel ikan yang akan diuji dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya untuk langsung dianalisa secara mikrobiologi.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Penelitian

Sebelum dilakukan penelitian peralatan disterilkan terlebih dahulu dengan cara dicuci. Peralatan yang berbahan kaca contohnya cawan petri, *objek glass* dan tabung reaksi disterilisasi terlebih dahulu dengan cara dimasukkan kedalam *autoclave* selama 30 menit, dengan tekanan dua atm dan suhu 121°C.

3.4.2 Uji Total Plate Count (TPC)

Uji TPC dilakukan untuk mengidentifikasi total bakteri pada insang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*). Sebelum dilakukan pengujian, seluruh alat disterilisasikan dahulu menggunakan autoklaf. Menyiapkan lima tabung reaksi yang sudah diisi dengan 9ml larutan NaCl fisiologis. Dalam 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 10^{-1} . Untuk

mendapatkan pengenceran 10^{-2} , dilakukan dengan cara mengambil 1ml suspensi dari tabung reaksi pertama kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi kedua hingga terbentuk pengenceran 10^{-2} . Pengenceran 10^{-3} dilakukan dengan cara mengambil 1ml dari pengenceran 10^{-2} , metode yang sama dilakukan hingga memperoleh pengenceran ke 10^{-5} . Disaat proses pengenceran harus dilakukan dalam kondisi steril. Saat sebelum dan setelah melakukan perlakuan, mulut tabung reaksi didekatkan dengan api bunsen. Hal tersebut untuk menghindari terjadinya kontaminasi mikroba yang menempel pada mulut tabung reaksi. Selanjutnya saat memasukkan sampel diwajibkan ujung pipet tidak menempel dengan dinding tabung reaksi (Bambang, 2014).

Setiap tabung reaksi diambil 1ml menggunakan pipet untuk dilakukan penanaman pada *Nutrient Agar* (NA) dengan cara diteteskan 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°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 cecairan tetapi tidak digolongkan sebagai koloni bakteri (Putri, 2018).

Perhitungan koloni bakteri biasanya digunakan suatu standart yang disebut “*Standart Plate Count*” yang menjelaskan cara menghitung koloni pada cawan serta cara memilih data yang ada untuk menghitung jumlah koloni dalam satu sample. Cara hitungan cawan menggunakan SPC sebagai berikut:

- 1) Setiap cawan akan dihitung apabila mengandung jumlah koloni antara 30 sampai 300 atau berjumlah sekitar 300.
- 2) Beberapa jumlah koloni yang tidak jelas atau tidak terlihat dapat dihitung menjadi satu koloni.
- 3) Satu kumpulan rantai koloni yang terlihat seperti suatu garis tebal dapat dihitung sebagai satu koloni.
- 4) Perbandingan jumlah bakteri dilihat dari hasil pengenceran yang lebih besar dan pengenceran lebih sebelumnya; apabila hasilnya menunjukkan sama atau 2 yang digunakan adalah jumlah mikroba dari hasil pengenceran sebelumnya.
- 5) Apabila dalam pengenceran menggunakan ulangan dan hasilnya sesuai dengan standart maka harus dirata-rata (Waluyo, 2008).

Rumus untuk menghitung jumlah koloni yaitu :

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

Hasil penghitungan dari setiap pengenceran selanjutnya dimasukkan kedalam rumus berikut 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 kemudian dipotong dan diambil bagian insang lalu dimasukkan kedalam plastik steril lalu digerus menggunakan mortar dan stemper sampai halus. Setelah dihaluskan, selanjutnya dimasukkan kedalam tabung yang berisi media *Tetrathionate broth* 5ml. Setelah itu homogenkan menggunakan *vortex* selama dua menit, kemudian diinkubasikan pada suhu 45°C selama 24 jam. Diamati pada media *Tetrathionate broth* warna berubah menjadi keruh (Dermawan, 2017).

3.4.4 Isolasi Bakteri *Salmonella sp.*

Isolasi bakteri dilakukan menggunakan media selektif *Salmonella Shigella Agar* (SSA) dengan 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, selanjutnya media SSA diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam posisi terbalik. Hasil positif *Salmonella sp.* akan menunjukkan koloni transparan atau tidak memiliki warna dengan bintik hitam karena bakteri *Salmonella sp.* mampu menghasilkan H₂S. Sodium sitrat yang terkandung dalam media SSA

yang bereaksi dengan H₂S menyebabkan terjadinya endapan hitam pada pusat koloni (Yuswananda, 2015).

3.4.5 Pewarnaan Gram

Uji identifikasi pewarnaan dilakukan dengan cara ditetaskan NaCl fisiologi pada *objek glass*. Ose dipanaskan dengan cara membakar ose pada api bunsen. Setelah itu koloni bakteri diambil dengan ose bulat, kemudian dihomogenkan dengan NaCl fisiologis di atas objek glas hingga suspensi bakteri berbentuk lingkaran dengan diameter kira-kira satu cm. Sediaan diambil dari hasil positif media *Salmonella Shigella Agar (SSA)*. Ditunggu hingga mengering dan difiksasi menggunakan api bunsen. Setelah itu sediaan ditetesi dengan reagen oksalat *kristal violet* 1% selama satu menit dan dicuci dengan air mengalir. Kemudian preparat ditetesi larutan lugol dan dibiarkan selama kurang lebih satu menit, selanjutnya dibilas menggunakan air mengalir dan preparat dicuci dengan alkohol 96% selama 10 – 20 detik. Terakhir, sediaan ditetaskan larutan pewarna safranin selama satu menit, lalu dibilas menggunakan air mengalir dan dikeringkan dengan cara di angin anginkan atau bisa juga menggunakan kertas penghisap atau tisu. Setelah kering sediaan dapat diamati di bawah mikroskop dengan ditetesi *oil emersi* dan dengan perbesaran 1000x (Prayogi, 2016).

3.4.6 Uji Biokimia

Hasil positif dari media *Salmonella Shigella Agar (SSA)* berupa koloni tidak berwarna dengan titik hitam di tengahnya, diinokulasikan pada media biokimia diantaranya : media *Triple Sugar Iron Agar (TSIA)*, *Sulfide Indol Motility (SIM)*, media *Simmon's Citrate Agar (SCA)*, dan media Urease.

Koloni dari media *Salmonella Shigella Agar* (SSA) diambil menggunakan ose, kemudian diinokulasikan pada media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) dengan cara ditusukkan dan ditancapkan di tengah media hingga dasar. Ose ditarik secara perlahan dengan gerakan maju mundur lalu diberi label yang sesuai dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif (+) akan terjadi perubahan warna dari merah – orange menjadi kuning dan jika hasil negatif (-) tidak ada perubahan warna. Apabila positif gas oksigen (O₂) media terangkat dan pecah. Apabila positif *hidrogen sulfide* (H₂S), maka terbentuk endapan warna hitam pada media.

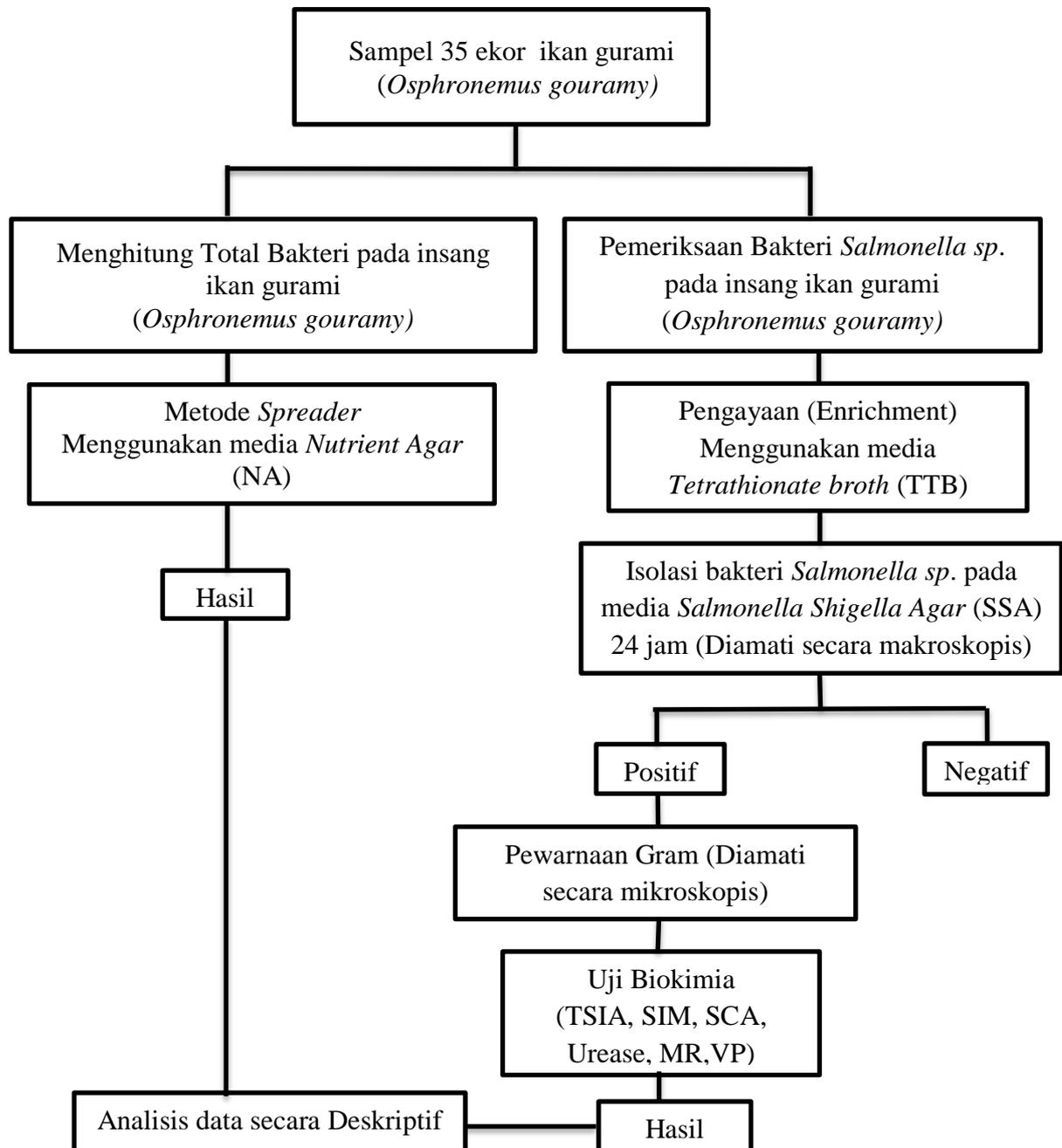
Setelah dilakukan uji TSIA selanjutnya dilakukan uji lain. Ose disterilkan dengan cara dipanaskan diatas api bunsen hingga bercahaya, dinginkan pada dinding tabung, ini dilakukan pada semua uji. Koloni bakteri diambil pada media dan diinokulasikan pada media uji *Simmon's Citrat Agar* (SCA), bakteri diinokulasikan dengan menusuk dan menggores pada bagian miring media tersebut, dan diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif (+) akan terjadi perubahan warna dari hijau menjadi biru.

Selanjutnya koloni bakteri diambil pada media SSA dan diinokulasikan pada media *Sulfide Indol Motility* (SIM) dengan cara ose ditusukkan kedalam media dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, setelah 24 jam ditetaskan 0,2 -0,3 ml pereaksi indol kedalam tiap tabung lalu dikocok dan didiamkan selama beberapa menit. Jika reaksi indol positif (+) akan terjadi perubahan warna menjadi merah pada permukaan yang membentuk cincin, sedangkan jika reaksi indol negatif (-) akan terjadi perubahan warna menjadi jingga.

Uji yang selanjutnya yaitu uji Urease menggunakan medium urea base. Bakteri *Salmonella sp.* diinokulasikan ke dalam media urea base dan diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam, ammonia yang dihasilkan akan meningkat pH media menjadi basa dan akan terjadi perubahan media dari orange menjadi merah (Anggraini, 2016).

Uji yang terakhir yaitu uji *Methyl Red – Voges Proskauer* (MR-VP). Cara kerjanya, bakteri diambil dengan menggunakan ose steril lalu dimasukkan kedalam media MR-VP lalu diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Keesokan harinya dilakukan uji MR-VP dengan membagi menjadi 2 pada tabung yang berbeda. Tabung reaksi pertama ditambahkan 3-4 tetes larutan *Methyl Red* 1%, jika terjadi perubahan warna media menjadi merah yang menandakan fermentasi asam campuran berarti hasilnya positif. Tabung reaksi kedua ditambahkan 10 tetes larutan α -naphthol 5% dan 10 tetes larutan KOH 40%. Tabung reaksi kemudian dikocok atau dihomogenkan selama 20-30 detik dan hasil positif ditunjukkan dengan larutan berwarna merah muda atau acid. Hasil negatif menunjukkan media tidak mengalami perubahan warna (Fallo & Sine, 2016).

3.5 Kerangka Operasional Penelitian



3.6 Analisis Data

Analisis data dalam penelitian dilakukan dengan mendeskripsikan hasil total jumlah koloni bakteri dengan metode penghitungan *Total Plate Count* (TPC). Analisis data untuk perhitungan total jumlah bakteri menggunakan *Standar Plate Count* (SPC) yang menjelaskan cara menghitung koloni pada cawan serta memilih data yang ada untuk menghitung jumlah koloni di dalam suatu sampel. Hasil uji deteksi *Salmonella sp.* dianalisis secara deskriptif dalam bentuk tabel dan gambar. Hasil yang didapatkan dibandingkan dengan SNI 7388:2009 sehingga didapatkan batas maksimum cemaran mikroba dalam ikan gurami.