

III. MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. Sampel yang digunakan berasal dari pasar tradisional Dukuh Kupang Barat Surabaya. Jangka waktu pelaksanaan penelitian ini dari bulan Mei hingga Juli 2021.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang dipergunakan meliputi telur asin, *Salmonella Shigella Agar* (SSA), Nutrient Agar (NA), NaCl Fisiologis, alkohol 70%.

3.2.2 Alat Penelitian

Perlengkapan alat yang dipergunakan yaitu tabung reaksi, cawan petri, batang pengaduk, lampu spiritus, inkubator, autoklaf, kantong plastik steril, elemanyer, aluminium foil, spatula, jarum ose cincin, vortex, timbangan digital, syringe, kapas, kertas label, rak tabung reaksi (Juariah dan Yanti, 2018).

3.2.3 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel berupa putih telur asin yang teknik pengambilannya secara acak dari pasar tradisional Dukuh Kupang Barat Surabaya. Terdapat 5 pedagang yang menjual telur asin dan di setiap pedagang diambil sampel telur asin sebanyak 6 butir, sehingga keseluruhan jumlah sampel yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah 30 butir telur asin.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian bentuk observasi, yang hasil datanya dianalisis dengan cara deskriptif. Metode ini digunakan dengan tujuan untuk mengetahui total bakteri dan *Salmonella sp* yang terkandung di dalam putih telur asin di pasar tradisional Dukuh Kupang Barat Surabaya. Sampel yang sudah dikumpulkan kemudian dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya untuk dilakukan penelitian lebih lanjut.

3.3.2 Variabel Penelitian

Variabel dari penelitian ini antara lain sebagai berikut:

1. Variabel bebas: Telur asin.
2. Variabel terikat: Total bakteri dan *Salmonella sp*.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Isolasi Bakteri

Sampel putih telur asin diambil dan ditimbang sebanyak 3 gr dan 5 cc NaCl fisiologis. Kantong plastik steril yang sudah terisi sampel digerus sampai halus. Kemudian memasukkan 9 ml NaCl fisiologis di setiap lima tabung reaksi. Sebanyak 1 cc sampel diteteskan pada tabung reaksi pertama (10^{-1}) dan dihomogenkan menggunakan vortex. Sebanyak 1 ml homogenat 10^{-1} diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang kedua sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2} . Prosedur kerja ini diulangi sampai tingkat konsentrasi 10^{-5} (Sukmawati dan Hardianti, 2018).

3.4.2 Inokulasi Pada Media Nutrient Agar (NA)

1. Menyiapkan 2 cawan petri berisi media Nutrient Agar.
2. Kemudian sebanyak 0,1 ml dari homogenat 10^{-4} , 10^{-5} , diteteskan ke cawan petri tersebut.
3. Spreader yang sudah dipijarkan pada api Bunsen, digunakan untuk meratakan larutan homogenat menggunakan metode sebar (*spread plate*). Kemudian diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam (Sukmawati dan Hardianti, 2018).

3.4.3 Inokulasi Pada Media *Salmonella Shigella* Agar (SSA)

1. Inokulasi homogenat dari sampel putih telur asin menggunakan jarum ose bulat steril.
2. Kemudian diaplikasikan secara zig-zag pada permukaan media.
3. Kemudian diinkubasi di inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C (Juariah dan Yanti, 2018).

3.4.4 Pewarnaan Gram

Proses pewarna gram melibatkan penggunaan beberapa bahan kimia pada koloni yang telah dipisahkan. Bahan kimia yang digunakan meliputi aquades, kristal violet, lugol, alkohol 96%, dan safranin. Aminollah (2016) mengatakan bahwa pewarnaan diferensial melibatkan penggunaan beberapa pewarna dan menunjukkan reaksi yang berbeda untuk setiap bakteri (Sari dkk., 2018). Salah satu metode pewarnaan diferensial yang umum digunakan adalah pewarnaan gram, yang dapat membedakan antara bakteri gram positif dan gram negatif (Sari dkk., 2018).

Amri (2017) mengatakan bahwa warna merah yang terdapat pada bakteri gram negatif disebabkan oleh lapisan peptidoglikan bakteri gram negatif yang tipis dan sangat permeabel, sehingga pewarna kristal violet dapat dengan mudah dihilangkan dan bakteri hanya menyerap warna safranin (Sari dkk., 2018).

3.5 Uji Biokimia

3.5.1 Uji Triple Sugar Iron Agar (TSIA)

Uji Triple Sugar Iron Agar digunakan untuk mengidentifikasi bakteri gram negatif berdasarkan kemampuannya dalam memfermentasi glukosa, sukrosa, dan laktosa, serta kemampuannya dalam memproduksi Hidrogen Sulfida (H_2S). Media yang dipergunakan yaitu media miring dan tusuk. Respon spesifik terhadap *Salmonella sp* pada uji TSIA terjadi pada bagian miring yang berwarna merah menunjukkan alkalis sedangkan bagian tusukan, akan berwarna kuning menandakan kondisi asam. Selain itu terdapat pembentukan endapan warna hitam yang menandakan adanya produksi Hidrogen Sulfida (H_2S) (Kumar dalam Sari dkk., 2017).

3.5.2 Uji Sulfide Indole Motility (SIM)

Uji Sulfide Indole Motility digunakan untuk mengetahui pergerakan bakteri. Hasil uji indol, jika hasilnya negatif akan terlihat terbentuknya cincin berwarna hijau yang mengindikasikan bahwa tidak ada isolat bakteri yang membentuk indol. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak dapat menghasilkan indol karena triptofan tidak tersedia sebagai sumber energi (Afriyani dalam Amiruddin dkk., 2017). Yulvizar (2013) mengatakan bahwa pentingnya uji indol karena hanya beberapa varietas bakteri yang dapat menghasilkan indol dan produk

ini dapat dipelajari untuk digunakan sebagai identifikasi (Amiruddin dkk., 2017).

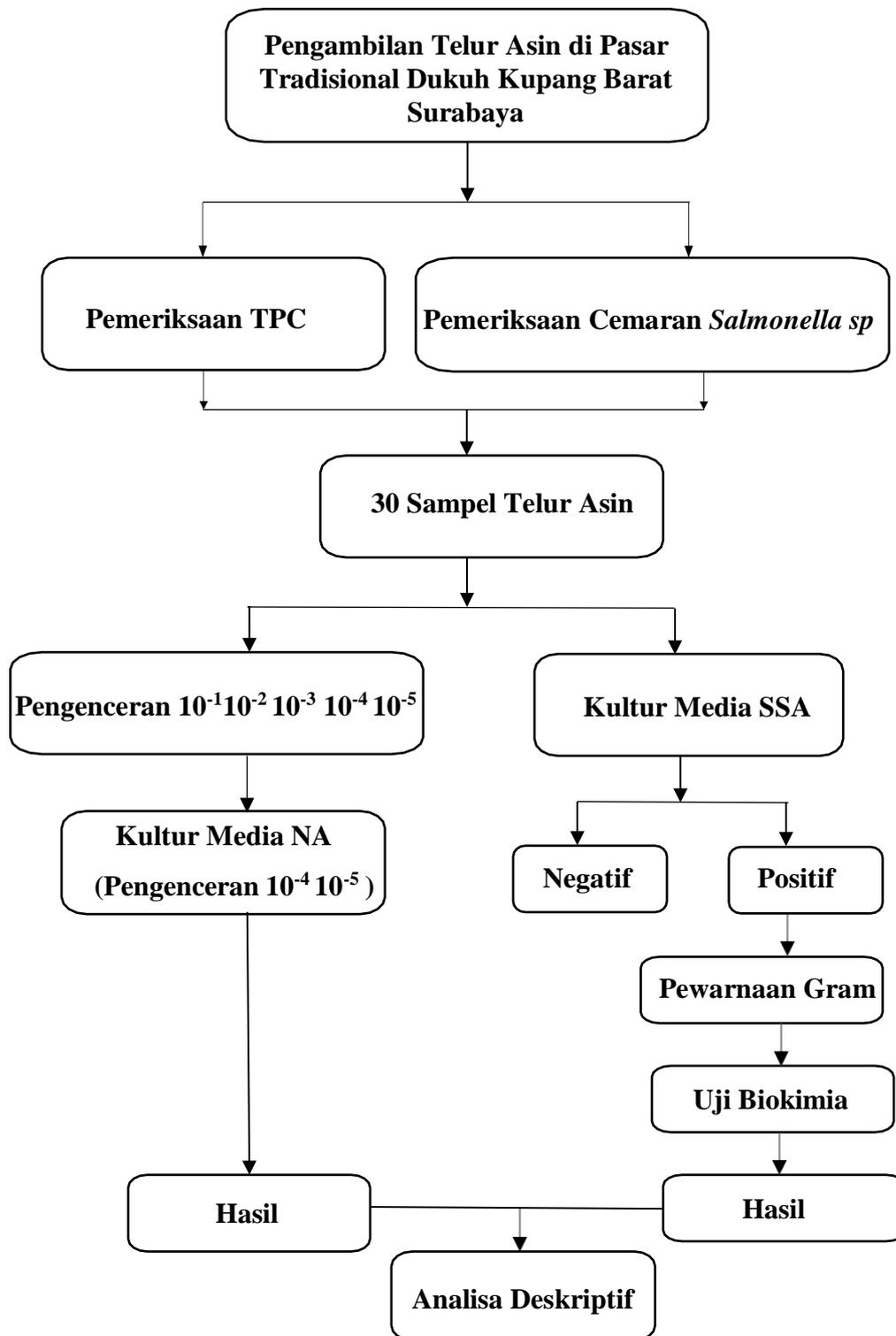
3.5.3 Uji Simmon Citrate Agar (SCA)

Menurut Afriyani (2016) hasil positif dari uji Simmon Citrate Agar (SCA) ditandai dengan perubahan warna media dari hijau menjadi biru, adalah sebuah indikasi bahwa bakteri mampu tumbuh dengan menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal (Rizky Amiruddin dkk., 2017). Secara umum, *Salmonella sp* akan memberikan hasil positif dengan tes sitrat. Pada *Salmonella typhi*, sitrat tidak digunakan sebagai sumber karbon (Rizky Amiruddin dkk., 2017).

3.5.4 Uji Urea

Isolat bakteri diambil kemudian ditanam ke dalam agar miring Urea. *Salmonella sp* menghidrolisis urea menjadi amonia menggunakan enzim urease. Perubahan warna dari kuning bening menjadi warna merah akan menunjukkan hasil yang positif setelah adanya penambahan metil red (Shofia dkk., 2023).

3.6 Kerangka Penelitian



3.7 Analisa Data

Hasil yang didapatkan dari penelitian berupa data total bakteri dan identifikasi bakteri *Salmonella sp* pada putih telur asin akan dianalisa secara deskriptif.