

III. MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi Dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan 18 Oktober 2022 – 1 November 2022 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran hewan Wijaya Kusuma Surabaya.

3.2 Materi Penelitian

Penelitian di awali dengan persiapan alat dan bahan sebagai penunjang dalam isolasi dan identifikasi *Salmonella sp* pada kura-kura *Emydura subglobosa*, kura-kura *Cuora amboinensis* dan kura-kura *Trachemys scripta* sebagai berikut.

3.2.1 Alat Penelitian

Alat untuk penelitian ini meliputi: Catton swab steril, tabung reaksi beserta rak tabung, tabung erlenmeyer, plastik wrap, glove, cawan petri, mikroskop, backer glass, timbangan, kertas timbang, ph meter, spatula, objek glass, jarum ose, needel, pipet, pembakar bunsen, autoclave, gunting, pinset, dan incubator.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan untuk penelitian ini meliputi: Sampel swab cloaca kura-kura *Emydura subglobosa*, kura-kura *Cuora amboinensis* dan kura-kura *Trachemys scripta*, Media SCB (*Selenite Cystine Broth*), Media SSA (*Salmonella Shigella Agar*), media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), media SIM (*Sulfide Indole Motility*), medium MR-VP (*Media Methyl red-Voges Proskauer*), media SCA (*Simmon's Citrate Agar*), zat warna kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin, minyak imersy, aquades, reagen kovacs, reagen MR, KOH 10%, dan naphthol 5%.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian perlu mempersiapkan alat dan bahan yang sudah disebut sebelumnya. Setelah alat dan bahan dipersiapkan kemudian seluruh alat yang akan digunakan dicuci bersih terlebih dahulu lalu dikeringkan dan dibungkus dengan kain lalu disterilisasi didalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan sebesar 1,5 atm. Selanjutnya pengambilan sampel diambil menggunakan catton steril pada feces kura-kura *Emydura subglobosa* kura-kura *Cuora amboinensis* dan kura-kura *Trachemys scripta* yang sudah disiapkan di pasar hewan Kota Malang, kemudian sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi yang sudah berisi media SCB (Selenite Cystine Broth) sebagai tempat isolasi media selektif *Salmonella sp* lalu ditutup rapat. Setelah itu sampel segera dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi FKH UWKS untuk proses penamaan menggunakan media SSA (*Salmonella Shigella Agar*) untuk menumbuhkan koloni *Salmonella sp* dengan ciri-ciri tidak berwarna dengan inti titik hitam ditengah permukaan cembung dengan tepi halus , dilajut pewarnaan gram, dan uji biokimia meliputi TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), SIM (*Sulfide Indole Motility*), MR-VP (*Media Methyl red-Voges Proskauer*), dan SCA (*Simon Citrate Agar*).

3.3.1 Jenis Penelitian

Eksperimental laboratorium dengan cara isolasi dan identifikasi *Salmonella sp* pada kura-kura *Emydura subglobosa*, kura-kura *Cuora amboinensis* dan kura-kura *Trachemys scripta*.

3.3.2 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini ada dua yaitu variabel bebas dan variabel terkait sebagai berikut:

1. Variabel terikat

Kura-kura *Emydura subglobosa*, kura-kura *Cuora amboinensis* dan kura-kura *Trachemys scripta* yang di jual di pasar hewan Kota Malang.

2. Variabel bebas

Hasil isolasi dan identifikasi *Salmonella sp* yang terdapat pada kura-kura *Emydura subglobosa*, kura-kura *Cuora amboinensis* dan kura-kura *Trachemys scripta* yang di jual di pasar hewan Kota Malang.

3.3.3 Teknik Pengambilan sampel

Sampel di ambil menggunakan catton steril pada 3 spesies meliputi kura-kura *Emydura subglobosa*, kura-kura *Cuora amboinensis* dan kura-kura *Trachemys scripta* yang sudah di tampung fecesnya dengan cara di individukan dari tempat koloni sebelumnya sebanyak 15 sampel tiap jenis kura-kura dengan ukuran kura-kura *Emydura subglobosa* rata-rata sekitar 5-7 cm, kura-kura *Cuora amboinensis* rata-rata sekitar 7-20 cm, dan kura-kura *Trachemys scripta* rata-rata sekitar 7-12cm. Sampel feces diambil kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi yang sudah berisi media SCB (*Selenite Cystine Broth*) lalu ditutup rapat dan dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi FKH UWKS.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pra-enrichment (Pra-pengayaan)

Pengambilan sample feces menggunakan cotton swab steril, di 3 spesies kura-kura meliputi kura-kura *Emydura subglobosa*, kura-kura *Cuora amboinensis* dan kura-kura *Trachemys scripta* dan tiap spesies di ambil 15 sampel, jadi keseluruhan sampel yang diambil sekitar 45 sampel. Fase pra enrichmen perlu menggunakan media SCB (*Selenite Cystine Broth*) dan sample feces di homogenkan pada media SCB (*Selenite Cystine Broth*) yang sudah di siapkan di tabung reaksi dan disimpan selama 24 jam dengan suhu 37°C.

Indikasi ada pertumbuhan *Salmonella sp* dapat ditandai dengan perubahan warna media menjadi orange dan keruh (Darmawi dkk., 2019).

3.4.2 Isolasi dan Identifikasi

Media SCB yang berubah menjadi orange dan keruh, dilanjut penanaman menggunakan media Salmonella Shigella Agar (SSA) selama 24 jam dengan suhu 37°C. Salmonella Shigella Agar (SSA) adalah media diferensial dan media selektif berbentuk padat yang digunakan untuk mengisolasi *Salmonella sp* dan *Shigella sp*. Indikasi ada pertumbuhan bakteri *Salmonella sp* dapat ditandai dengan munculnya H₂S yang dihasilkan oleh bakteri sehingga akan terbentuk koloni kecil, tidak berwarna dengan inti titik hitam ditengah permukaan cembung dengan tepi halus (Darmawi dkk., 2019).

3.4.3 Pewarnaan Gram

Salmonella sp yang telah dimurnikan pada media SSA, dilakukan pewarnaan Gram dengan cara jarum ose dipanaskan di atas api, oleskan biakan bakteri pada objek glass steril yang sudah terdapat tetesan aquades dan dikeringkan dengan pembakar bunsen, kemudian teteskan zat warna cristal violet dan didiamkan selama 5 menit, lugol atau yodium ditetaskan, didiamkan selama 3 menit, alkohol 96% ditetaskan hingga tidak ada lagi larutan ungu yang luntur. Safranin ditetaskan, didiamkan selama 45 detik hingga 1 menit, minyak imersi ditetaskan kemudian diamati di bawah mikroskop dengan menggunakan perbesaran 100x (Darmawi dkk., 2019).

3.4.4 Uji TSIA (Triple Sugar-Iron Agar)

Koloni *Salmonella sp* pada media SSA yang berbentuk koloni kecil, tidak berwarna dengan inti titik hitam ditengah permukaan cembung dengan tepi halus diambil menggunakan jarum ose ke dalam media agar miring TSIA pada tabung reaksi dengan

cara menggores bagian miringnya dan menusuk bagian tegaknya, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Ciri koloni *Salmonella sp* adalah bagian tegaknya terjadi perubahan warna kuning, terdapat warna hitam (H₂S), dan bagian miringnya berwarna merah (tidak berubah) (Erina dkk., 2021).

3.4.5 Uji SCA (Simon Citrate Agar)

Koloni *Salmonella sp* pada media SSA yang berbentuk koloni kecil, tidak berwarna dengan inti titik hitam ditengah permukaan cembung dengan tepi halus diambil menggunakan jarum ose dan diinokulasikan ke dalam media SCA (Simmon sitrat Agar), kemudian diinkubasi pada temperatur 35 °C selama 96 ± 2 jam. Hasil positif ditandai dengan adanya pertumbuhan koloni yang diikuti perubahan warna dari hijau menjadi biru. Umumnya bakteri *Salmonella* memberikan hasil positif pada uji sitrat (Erina dkk., 2021).

3.4.6 Uji SIM (Sulfide Indole Motility)

Koloni *Salmonella sp* pada media SSA yang berbentuk koloni kecil, tidak berwarna dengan inti titik hitam ditengah permukaan cembung dengan tepi halus diambil menggunakan jarum ose dimasukkan ke dalam media SIM (Sulfide Indole Motility) dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian ditambahkan 0,2 sampai dengan 0,3 mL reagen Kovacs. Hasil uji positif ditandai dengan adanya cincin merah di permukaan media. Hasil uji spesifik *Salmonella sp* adalah negatif uji indol (Erina dkk., 2021).

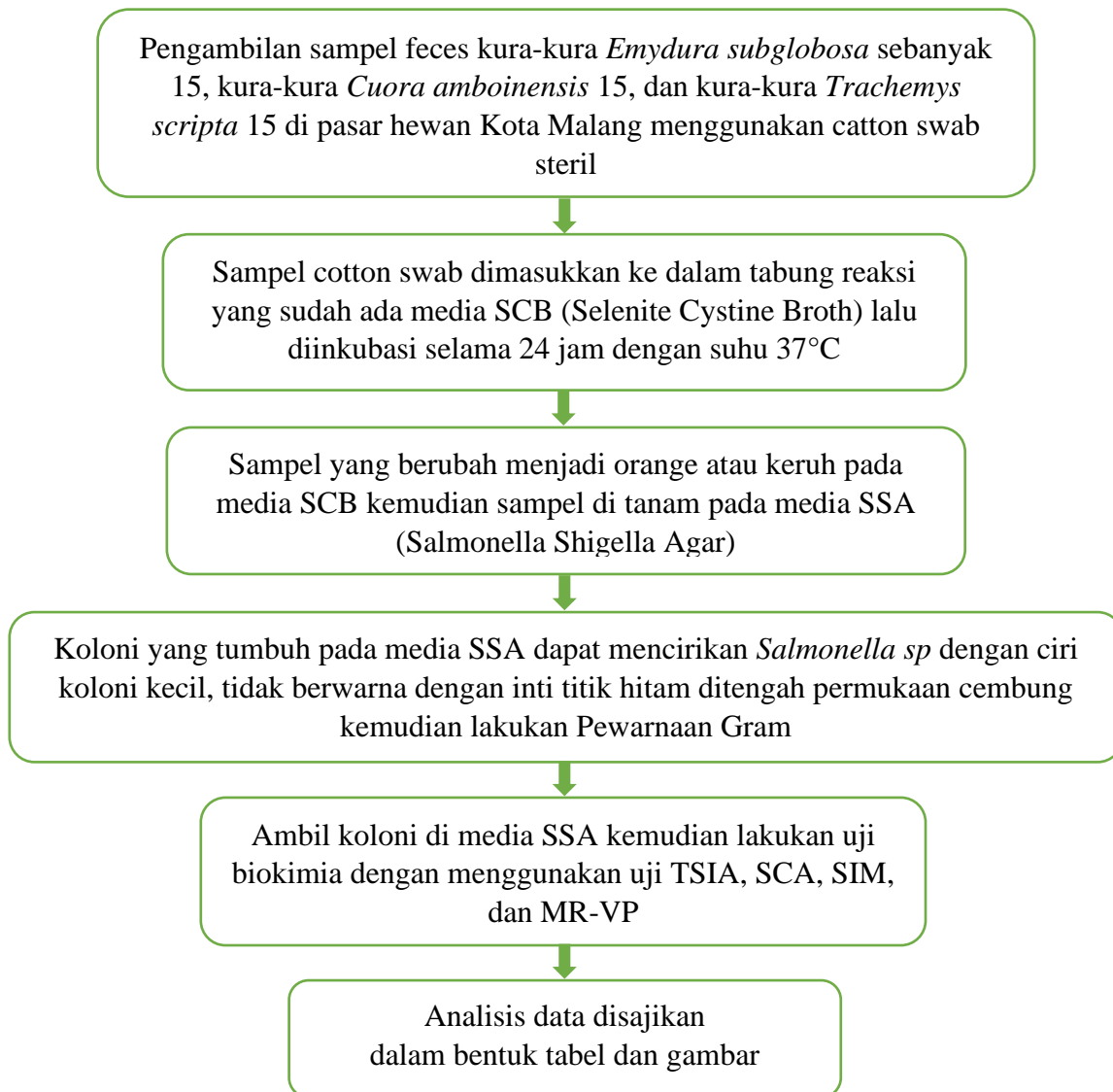
3.4.7 Uji MR-VP (Media Methyl Red-Voges Proskauer)

Uji MR yaitu koloni *Salmonella sp* pada media SSA yang berbentuk koloni kecil, tidak berwarna dengan inti titik hitam ditengah permukaan cembung dengan tepi halus diambil menggunakan jarum ose dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10

mL media MR-VP dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 48 jam, kemudian ditambahkan 5-6 tetes indikator dengan reagen methyl red pada tabung. Hasil positif ditandai dengan adanya perubahan pada media menjadi warna merah. Umumnya bakteri *Salmonella sp* memberikan hasil positif untuk uji MR (Darmawan., 2017).

Uji VP yaitu koloni *Salmonella sp* pada media SSA yang berbentuk koloni kecil, tidak berwarna dengan inti titik hitam ditengah permukaan cembung dengan tepi halus diambil menggunakan jarum ose dan diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang berisi yang berisi 10 ml media MR-VP, kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 48 jam. Kemudian ditambahkan 5-6 tetes KOH 10% dan naphthol 5% kemudian dihomogenkan dan didiamkan. Hasil uji positif apabila terjadi perubahan warna merah muda sampai merah. Umumnya *Salmonella sp* memberikan hasil negatif (Darmawan., 2017).

3.5 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka operasional

3.6 Analisa Data

Pada penelitian ini, data yang diperoleh dari hasil penelitian akan disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.