

I. MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. Sampel dalam penelitian ini diambil dari klinik DRD Veterinary Dukuh Kupang Surabaya Barat. Penelitian ini dilaksanakan mulai dari 19 Januari 2024 sampai 17 Februari 2024.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Pada penelitian ini alat yang digunakan adalah cotton swab steril, gloves, masker, cool box, wadah steril (kantong plastik), ice pack, cawan petri, erlenmeyer, beaker glass, rak tabung reaksi, tabung reaksi, kapas, bunsen, korek api, kertas label, autoclave, mikroskop, ose bulat, ose runcing, object glass, cover glass, penjepit kayu, bunsen, inkubator, vortex, panci dan kompor.

3.2.2 Bahan Penelitian

Dalam penelitian ini bahan yang digunakan adalah 32 sampel swab kloaka kura-kura, Tetrathionate broth (HIMEDIA M876®), Salmonella shigella agar (SSA) (MERCK 10766705500®), Simmons citrate agar (SCA) (HIMEDIA M099®), TSIA (HIMEDIA M021®), Urease (HIMEDIA M112®) Sulfide indole motility (SIM) (HIMEDIA M181®), dan aquades. Bahan pengujian biokimia yaitu reagen kovacs, Methyl Red, KOH 40% dan Alpha Naphthol. Bahan dalam pewarnaan Gram yaitu lugol, safranin, kristal violet, oil emersi, NaCl Fisiologis, dan alkohol 70%.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian deskriptif, yang pengambilan sampelnya menggunakan metode strsfied random sampling. Stratified sampling adalah metode di mana setiap strata dari populasi dibagi menjadi kelompok terpisah, dan sampel acak diambil dari setiap strata. Setiap strata adalah kumpulan alami dari item dalam populasi dan dapat dibentuk berdasarkan berbagai karakteristik seperti ukuran, jenis kelamin. Teknik pengambilan sampel ini sering digunakan ketika terdapat variasi yang signifikan dalam populasi. Tujuan dari stratified sampling adalah untuk memastikan bahwa setiap kelompok atau strata terwakili dengan baik dalam sampel yang diambil. Kelebihannya meliputi inklusi semua subpopulasi yang penting dan peningkatan presisi. Namun, kekurangannya melibatkan kesulitan dalam pemilihan variabel stratifikasi yang relevan, keterbatasan penggunaan stratifikasi pada banyak variabel, dan biaya yang mungkin tinggi. (Firmansyah, *et al.*, 2022).

3.3.2 Pengambilan Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel swab kloaka dari beberapa dari 6 jenis kura-kura yang terdapat diklinik DRD Veterinary Surabaya selama periode 19 Januari 2024 hingga 17 Februari 2024. Untuk mengambil sampel, cotton swab steril dimasukkan ke dalam kloaka dan kemudian diputar dalam kloaka kura-kura darat, kemudian ditempatkan dalam media pembiakan Tetratonate Broth (TB). Sampel yang terkumpul dibawa ke laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner FKH Universitas Wijaya Kusuma Surabaya untuk dilakukan penelitian.

3.3.3 Pembiakan Media Tetrathionate Broth (TB)

Proses pengayaan dilaksanakan dengan sebanyak 1 ml dari masing-masing sampel dimasukkan ke dalam 10 ml media TB dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, sampel ditanam kembali pada media Salmonella Shigella Agar (SSA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Koloni yang dicurigai sebagai *Salmonella* dapat diidentifikasi dengan warna hitam. (NurAziah, *et al.*, 2022).

3.3.4 Isolasi Bakteri *Salmonella Sp.*

Bakteri pada media (TB) di streak ke dalam media selektif SSA. 1 ose suspensi bakteri diambil dan digoreskan ke media SSA dengan teknik goresan kuadran, selama 24 jam media SSA diinkubasi pada suhu 37°C. Koloni hijau metalik dengan titik hitam di tengahnya yang menunjukkan keberadaan *Salmonella sp* menunjukkan hasil positif (Wahyuni, *et al.*, 2023).

Ciri makroskopis pertumbuhan bakteri ini mencakup koloni yang berbentuk bulat, berwarna hitam, permukaannya cembung, tepi koloninya rata, dan konsistensi mucoid. Bintik hitam pada bagian tengah terjadi dikarenakan adanya reduksi telurit yang menghasilkan warna hitam pada koloni. Pada media SSA, berwarna hitam karena kemampuan bakteri untuk mereduksi tiosulfat menjadi sulfat. Sebaliknya, koloni bakteri *Shigella sp.* pada media SSA akan halus, dengan tepi rata, dan tidak memiliki warna khusus (Ulya, *et al.*, 2020).

3.3.5 Pewarnaan Gram

Salmonella sp. yang ditemukan dalam media selektif SSA kemudian diwarnai dengan pewarnaan gram untuk dilakukan pemeriksaan yang lebih akurat. Suatu apusan bakteri dibuat pada object glass dengan menggunakan bakteri yang diambil dari koloni bakteri pada media SSA kemudian dilakukan fiksasi diatas api bunsen. Setelah difiksasi, apusan dilapisi dengan Kristal Violet dan dibiarkan selama satu sampai dua menit sebelum dibilas dengan air mengalir. Setelah dibilas, apusan ditetesi dengan larutan Lugol selama 1 menit, diikuti dengan pencucian menggunakan alkohol 96% untuk menghilangkan semua zat warna kemudian dibilas dengan air yang mengalir. Selanjutnya, zat warna safranin diaplikasikan pada preparat selama 2 menit, kemudian dibilas dengan air yang mengalir dan dibiarkan hingga preparat mengering. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 100x, ditetesi dengan oil emersi, di mana bakteri Gram positif akan berwarna ungu, sedangkan bakteri Gram negatif akan berbentuk batang berwarna merah muda saat diamati menggunakan mikroskop dengan pembesaran 1000x (Virgianti, 2017). Dalam proses pewarnaan Gram, penggunaan alkohol untuk pencucian menyebabkan lemak diekstraksi, mengakibatkan bakteri menyerap zat warna safranin dan menunjukkan warna merah muda (Erina, *et al.*, 2019).

3.3.6 Uji Biokimia

Semua koloni bakteri yang diduga positif bakteri *Salmonella sp* pada media SSA, kemudian diuji kembali untuk konfirmasi dengan metode biokimia termasuk uji TSIA, SIM, SCA, urease, dan MR-VP (NurAziah, *et al.*, 2022).

3.3.6.1 Uji *Triple Iron Agar* (TSIA)

Untuk mengidentifikasi bakteri *Salmonella sp.* jarum ose steril digunakan untuk mengambil isolat, kemudian digoreskan pada media agar miring TSIA dalam tabung reaksi. Isolat yang akan dipilih dipindahkan ke media agar miring TSIA dengan menggores bagian miringnya dan menusuk bagian tegaknya. Setelah itu, inkubasi dilakukan selama 13-24 jam pada suhu 37°C, lalu perubahan warna media diamati. Karakteristik koloni bakteri *Salmonella sp.* terlihat perubahan warna pada bagian tegaknya yang menjadi kuning dengan atau tanpa warna hitam (H₂S), sementara bagian miringnya tetap berwarna merah tanpa perubahan (Witari dan Nurika., 2016).

3.3.6.2 Uji *Simmon's Citrate Agar* (SCA)

Uji Simmon's Citrate Agar (SCA) ose disterilkan kembali menggunakan api bunsen, ose yang sudah disterilkan digunakan untuk mengambil koloni, inokulasikan pada media agar miring SCA, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, dan koloni bakteri yang tumbuh diamati secara visual. Perubahan warna pada media SCA menunjukkan hasil positif identifikasi. Selanjutnya, perubahan warna pada specimen diamati. Perubahan warna media dari hijau ke biru menunjukkan hasil positif (Rahmiati, *et al.*, 2019).

3.3.6.3 Uji Urease

Uji Urease ini bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri yang memiliki enzim urease. Koloni yang diduga bakteri *Salmonella sp.* koloni pada media SSA diambil dengan menggunakan ose kemudian Isolat koloni ditempatkan pada media urease dalam tabung reaksi vertikal dengan garis zigzag di bagian miring dan bagian

bawah. Setelah itu, selama 24 jam, isolate dalam tabung diinkubasi pada suhu 37°C. Adanya bakteri *Salmonella sp.* ditandai dengan hasil negatif yaitu menunjukkan tidak ada perubahan warna, sedangkan hasil positif menunjukkan perubahan warna media dari kuning menjadi merah jambu (Safitri, *et al.*, 2019).

3.3.6.4 Uji Sulfide Indole Motility (SIM)

Uji Sulfide Indole Motility (SIM) ose disterilkan kembali menggunakan api bunsen, ambil bakteri dari media SSA lalu tanam pada media SIM dengan cara menusukkan ose kedalam media SIM kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Adanya cincin berwarna merah pada media SIM setelah reagen Kovacs diberikan menunjukkan bahwa terbentuk indol. Adanya perubahan warna media menjadi hitam, menunjukkan adanya reduksi sulfur. Pertumbuhan di sekitar tusukan ose menunjukkan gerakan atau motilitas bakteri (Wenas, *et al.*, 2020).

Penambahan reagen Kovacs menyebabkan indol bereaksi, membentuk senyawa berwarna merah di permukaan media agar. Pembentukan warna merah yang terjadi setelah menambahkan reagen Kovacs menunjukkan bahwa bakteri yang diuji menunjukkan hasil positif dari uji indol. Sebaliknya, jika tidak terbentuk senyawa berwarna merah, menunjukkan bahwa bakteri yang diuji negatif terhadap uji indol (Wenas, *et al.*, 2020).

3.3.6.5 Uji Methyl Red (MR)

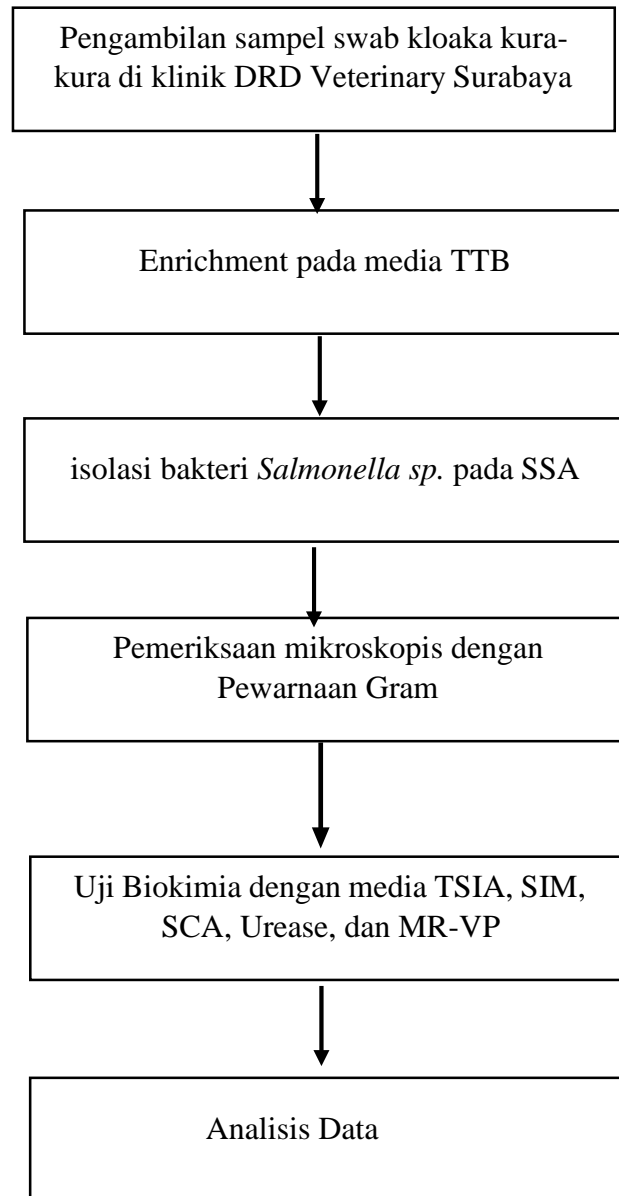
Uji biokimia Methyl Red (MR) digunakan untuk mengukur kemampuan organisme untuk menghasilkan dan mempertahankan tingkat asam yang stabil sebagai hasil dari fermentasi glukosa (Safitri, *et al.*, 2019). Panaskan ose bulat.

Selanjutnya, ambil koloni yang diduga bakteri *Salmonella sp.* Kemudian masukkan kedalam tabung reaksi yang berisi larutan MR. Tabung kemudian dikocok agar koloni tersebar merata, lalu di masukkan inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Perhatikan apakah terjadi perubahan warna dalam tabung reaksi setelah menambahkan 1 ml reagen Methyl Red. Jika warna media berubah menjadi merah, ini menunjukkan hasil positif yang mengindikasikan pembentukan asam. (Situmorang *et al.*,2020)

3.3.6.6 Uji Voges Proskauer (VP)

Tujuan dari uji biokimia Voges-Proskauer (VP) adalah untuk menguji apakah organisme memiliki kemampuan untuk mengubah asam menjadi 2,3-butanediol dan acetoin (Khair *et al.*,2021). Tempatkan ose bulat di atas api bunsen, kemudian ambil koloni yang dicurigai sebagai bakteri *Salmonella sp.* Masukkan koloni ke dalam tabung reaksi yang berisi uji VP dan untuk menyebarkan koloni secara merata tabung dikocok. Kemudian, inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Amati perubahan dengan menambahkan 0,2 ml KOH 40% dan 0,6 ml Alpha Naphthol ke dalam tabung reaksi. Hasil positif ditunjukkan oleh pembentukan cincin berwarna merah muda (Hidayah *et al.*, 2022).

3.4 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Operasional Penelitian

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisa dengan metode deskriptif kualitatif dengan menyajikan hasil isolasi dan identifikasi bakteri *Salmonella sp* yang diambil dari sampel swab kloaka kura-kura darat.

