

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 22 - 26 Januari 2024 dengan menggunakan daging sapi yang diperoleh dari pasar Dukuh Kupang Surabaya. Penelitian *Total Plate Count* dan adanya *Salmonella sp* pada daging sapi yang di beri simplisia batang serai (*Cymbopogon Citratus*) akan dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya.

#### **3.2 Materi dan Metode**

##### **3.2.1 Bahan Penelitian**

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah daging sapi 500 gram yang diperoleh dari pasar Dukuh Kupang Surabaya. Bahan lainnya adalah batang serai (*Cymbopogon Citratus*) sebanyak 5 kg, Media Nutrient Agar (NA) dan NaCl untuk keperluan Uji TPC. *Tetrationate Broth*, *Iodine*, *Salmonella shigella Agar*, *Kristal Violet*, *Lugol*, *Safranin*, *Alkohol 70%*, *Media Tripel Sugar Iron Agar*, *Media SIM*, *Urea Agar*, dan *Simmon Citrate Agar*, *MR-VP Broth* Untuk uji Kandungan *Salmonella sp*, *KOH 3%*, *Reagen Kovac*, dan *oil emersi*.

##### **3.2.2 Alat Penelitian**

Peralatan yang digunakan adalah gloves, masker, mikroskop, inkubator, pisau, talenan, blender, cawan petri, tabung reaksi, objek glass, labu erlenmayer 250 ml, gelas ukur 25 ml dan 50 ml, rak tabung reaksi, pipet tetes, pinset, batang pengaduk, bunsen, ose bulat, vortex, spuit 1 cc, *cotton swab*, sumbat karet, karet gelang, kapas, bak pewarna, ose jarum, bulat, toples, kertas atau kain saring.

### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental laboratoris dengan desain rancangan acak lengkap (RAL). Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah total bakteri dan adanya *Salmonella sp* pada daging sapi.

#### 3.3.1 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini terdiri dari :

1. Variabel bebas : daging sapi
2. Variabel terikat : Total bakteri dan adanya *Salmonella sp* pada daging sapi.
3. Variabel kendali : Suhu saat penyimpanan daging sapi dalam berbagai perlakuan saat penelitian, waktu (jam) penyimpanan dari setiap perlakuan dalam penelitian.

#### 3.3.2 Teknik Pengambilan Sampel

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan menggunakan 4 kelompok perlakuan yaitu P0, P1, P2, P3 . Sampel didapatkan dari populasi daging sapi di pasar Dukuh Kupang Surabaya. Sampel dalam penelitian ini mendapat 6 kali ulangan, ulangan sebanyak 6 kali diperoleh dari rumus Federer.

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

Keterangan : t adalah perlakuan sedangkan n adalah ulangan

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(4-1)(n-1) \geq 15$$

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 15+3$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 18/3$$

$$n \geq 6$$

Berdasarkan perhitungan diatas  $n \geq 6$  maka penelitian memiliki 6 kali pengulangan. Bahan utama penelitian ini adalah 500 gram daging sapi yang diperoleh satu tempat yang sama dan pemotongan daging untuk keempat perlakuan diiris dengan berat 25 gram, sehingga didapatkan 24 sampel daging sapi dari pasar dukuh kupang surabaya, penelitian ini menggunakan empat perlakuan yang terdiri dari :

- 1) P0 daging sapi yang tidak diberi simplisia batang serai dan tanpa proses penyimpanan (sebagai kontrol).
- 2) P1 daging sapi yang diberi simplisia batang serai dengan lama penyimpanan 1 jam.
- 3) P2 daging sapi yang diberi simplisia batang serai dengan lama penyimpanan 2 jam.
- 4) P3 daging sapi yang diberi simplisia batang serai dengan lama penyimpanan 3 jam.

### **3.4 Prosedur Penelitian**

#### **3.4.1 Pembuatan Simplisia Batang Serai**

Pengeringan adalah salah satu proses pasca panen yang paling penting dalam pembuatan simplisia. Ini juga mempengaruhi kualitas produk dari segi warna dan senyawa aktif yang terkandung dalam bahan (Katna, 2008). Pengeringan bisa

dilakukan dengan bantuan energi panas alami (cahaya matahari) atau buatan (alat pengering) (Effendi, 2012). Batang serai yang telah terkumpul sebanyak 5kg kemudian dilakukan perajangan, perajangan dilakukan untuk mempermudah proses pengeringan. Perajangan dapat dilakukan dengan pisau, dengan alat mesin perajang khusus sehingga diperoleh irisan tipis atau potongan dengan ukuran yang dikehendaki (Rivai, 2014). Lalu dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 150°C dengan waktu 50 menit (Dharma *et al.*, 2020). Setelah di keringkan lalu di blender hingga halus sebanyak 500 gram. Kemudian simplisia serai ditaburkan ke setiap perlakuan sebanyak 0,5 gram.

### **3.4.2 Persiapan Penelitian**

Sebelum dilakukannya pengujian peralatan dicuci terlebih dahulu, berbahan kaca seperti *Object glass*, tabung reaksi, cawan petri agar bersih lalu dikeringkan kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Shukshith *et al.*, 2016).

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

Pengujian *Total Plate Count* (TPC) dimaksudkan untuk mengidentifikasi total bakteri pada daging sapi dengan menggunakan metode tuang (*pour plate*).

#### **1. Pengenceran Sampel**

Setelah semua alat diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, lanjutkan prosedur pengenceran. Menyiapkan tabung reaksi sebanyak 5 buah, susun berderet dan ditandai dengan kertas label no 1-5. Sampel daging sapi dipotong dan ditimbang sebanyak 1 gram. Menggunakan mortir untuk menggerus sampel daging

dan diencerkan dengan aquades steril 1 cc, kemudian menggunakan spuit 1 cc diambil suspensi dan dimasukkan kedalam tabung no 1(pengenceran  $10^{-1}$ ). Menggunakan pipet steril untuk mengambil 1 ml air gerusan daging dimasukkan dalam tabung reaksi no.2 yang telah terisi 9 ml cairan aquades steril (pengenceran  $10^{-2}$ ). Larutan dari pengenceran pertama diambil 1 ml dengan menggunakan pipet lalu masukan pada tabung reaksi berikutnya dan homogenkan (pengenceran  $10^{-3}$ ). Begitu pula dengan tabung reaksi no. 4 sehingga didapatkan pengenceran  $10^{-4}$ , dan dilakukan hal yang sama sehingga didapatkan pengenceran  $10^{-5}$  ( Lestari , *et al.*, 2019).

## 2. Penanaman dan Perhitungan Bakteri

Suspensi sampel ditanam dibawah agar nutrient dengan metode tuang (*pour plate*), dilakukan fiksasi cawan petri terlebih dahulu kemudian suspensi dari tabung reaksi (tabung reaksi no.4 dan no.5) sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam cawan petri. Media nutrient agar yang telah didinginkan sampai suhu  $45^{\circ}\text{C}$ - $50^{\circ}\text{C}$  dituangkan kira-kira 20 ml. Cawan petri diusahakan tidak dibuka lebar agar terhindar dari pencemaran. Gerakan cawan petri memutar secara horizontal, agar media tersebar rata, lalu dibiarkan hingga media padat. Selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  cawan petri diinkubasi dengan cara dibalik posisinya. Kemudian diamati pertumbuhan kuman yang berbentuk koloni dengan jumlahnya 30-300 koloni, lalu dihitung dengan factor pengenceran (Lada, 2017).

Koloni bakteri yang tumbuh pada tiap cawan sampel dihitung dengan menggunakan *Colony counter*, jumlah koloni mikroba yang dianalisis ialah rentang

antara 30-300 koloni cfu/g. Rumus jumlah koloni yang terdapat dalam sampel dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\text{koloni gr} = \sum \text{koloni per cawan} \times \frac{1}{\text{Pengenceran}} \text{ (Azizah \& Soesetyaningsih, 2020).}$$

#### 3.4.4 Uji Adanya *Salmonella sp*

Strerilisasi cawan petri menggunakan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit (Shukshith *et al.*, 2016). Tahap pengujian *Salmonella sp* dimulai dari tahap pengayaan (*Enrichment*) pada media selektif, yaitu *Tetrathionate Broth* (TTB) agar dapat memperbanyak biakan murni dari bakteri *Salmonella sp.* (Apelabi *et al.*, 2015). Sebanyak 1 gram daging sapi yang menjadi sampel pengujian *Salmonella Sp.*, dihaluskan terlebih dahulu, lalu dimasukkan ke dalam *Tetrathionate Broth*, kemudian dihomogenkan hingga tercampur sepenuhnya, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C.

Setelah hasil inkubasi daging pada media *Tetrathionate Broth* diambil dengan menggunakan ose untuk digores secara kuadran pada *Salmonella Shigella Agar*. Bakteri *Salmonella sp.* yang tumbuh pada permukaan media SSA ditandai dengan koloni bulat, warna bening ada titik hitam ditengah.

Koloni terpisah dari hasil SSA diambil untuk dilakukan pewarnaan gram. Pada pewarnaan gram, bakteri positif akan berwarna violet sedangkan bakteri gram negatif berwarna merah (Rokhim, 2023). *Salmonella sp* dipewarnaan gram menunjukkan gram negatif. *Salmonella sp* ditandai dengan bentuk batang dan berwarna merah (White *et al.*, 2000). Apabila pada uji pewarnaan diketahui positif

*salmonella* maka dilanjut dengan uji biokimia. Menurut (Safitri *et al.*, 2019) metode uji biokimia yaitu :

- Uji TSIA (Triple Sugar Iron Agar)

Koloni *Salmonella sp.* yang ditanam pada media SSA dipindahkan ke media agar TSIA dalam tabung reaksi dengan menggunakan jarum ose untuk menusuk bagian yang tegak dan menggores bagian yang miring, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 hingga 48 jam. *Salmonella sp* menyebabkan bagian yang miring berubah menjadi berwarna merah (alkalis dan bagian yang tegak menjadi kuning (acid), kemudian ditemukan adanya sulfida yang mengikat dengan atau tanpa warna hitam (H<sub>2</sub>S).

- Uji SIM (*Sulfide Indol Motility*)

Koloni *Salmonella sp.* pada media SSA dimasukkan ke media SIM dalam tabung reaksi. Setelah inkubasi, 0,2 hingga 0,3 ml reagen Kovacs ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Tidak adanya cincin merah pada permukaan media menunjukkan hasil uji indole positif terhadap *Salmonella sp.* Hasil positif ditandai dengan pertumbuhan bakteri yang menyebar, maka bakteri tersebut dinyatakan bergerak (motil). Jika pertumbuhan bakteri tidak menyebar dan hanya dihasilkan satu garis, maka dianggap non-motil (Sudarsono, 2008).

- Uji Urease

Koloni *salmonella sp* pada media SSA dikeluarkan dari media, digoreskan pada permukaan Urea Agar miring dengan menggunakan ose, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil negatif menunjukkan

adanya bakteri *Salmonella sp*, artinya warna tidak berubah dari kuning menjadi merah muda (tetap kuning).

- Uji SCA

Koloni *Salmonella sp*. pada media SSA diambil dan distreak ke dalam Simmon sitrat dengan menggunakan jarum ose, lalu diinkubasi pada suhu 35 °C. Tumbuhnya koloni dan adanya perubahan warna dari hijau menjadi biru adalah tanda hasil uji positif.

- Uji MR (Uji Methyl Red)

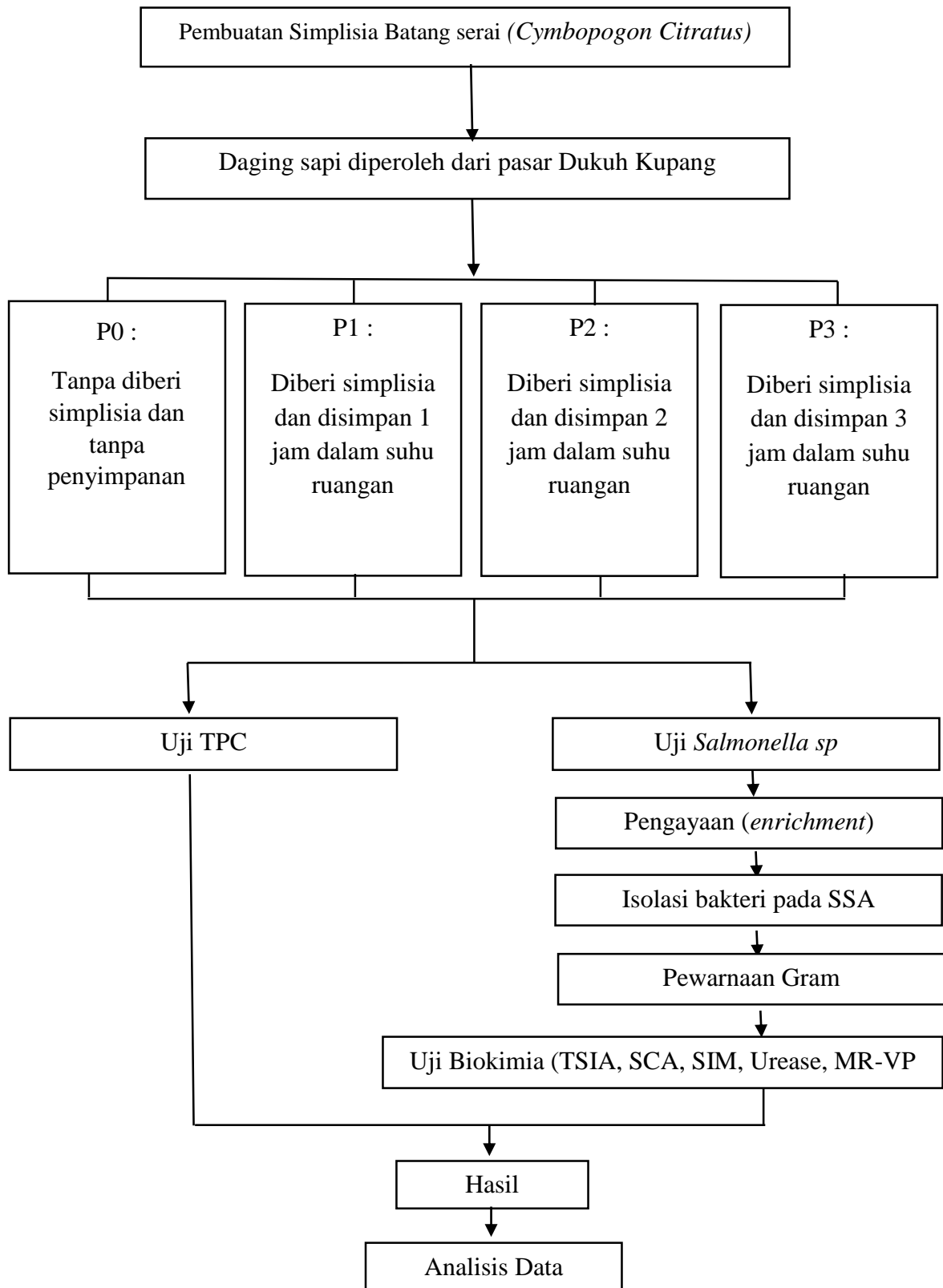
Koloni *Salmonella sp*. pada media SSA diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml media MR dengan menggunakan jarum ose. Tabung kemudian diinkubasi pada suhu 35°C sebelum ditambahkan 5-6 tetes indikator methyl red. Perubahan media menjadi warna merah menunjukkan hasil uji positif.

- Uji VP (Voges Proskauer)

Koloni *Salmonella sp*. diambil dari media SSA dan dipindahkan ke tabung reaksi yang berisi 10 ml media VP dengan menggunakan jarum ose. Tabung reaksi kemudian diinkubasi pada suhu 35°C. Lalu 5 ml VP dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 0,6 ml larutan alfa-naftol dan 0,2 ml KOH 40%. Kemudian dihomogenisasi dan didiamkan. Apabila warnanya tidak berubah dari merah muda menjadi merah, maka hasil uji positif *Salmonella sp*.



### 3.5 Kerangka Operasional



### 3.6 Analisis Data

Data yang telah didapatkan setelah proses penelitian terhadap daging sapi yang di beri simplisia batang serai (*Cymbopogon citratus*) dan didiamkan dalam suhu ruangan dengan waktu satu jam, dua jam, tiga jam, dan dibandingkan dengan daging sapi tanpa diberi simplisia batang serai (*Cymbopogon citratus*), kemudian dilakukan perbandingan peninjauan dengan metode deskriptif untuk uji kandungan bakteri *Salmonella sp.* Metode Analysis of Variant (ANOVA) digunakan dalam analisis data pada uji *Total Plate Count* (TPC).