

III. METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan 24 April – 10 Mei 2024 dengan menggunakan sampel daging ayam yang diperoleh dari pasar Babaan atau Pesapen Surabaya. Penelitian *Total Plate Count* dan kandungan *Salmonella* sp. pada daging ayam yang diberi simplisia daun kecombrang (*Etlingera elatior*) yang akan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan utama penelitian ini adalah 500 gram daging ayam yang diperoleh dari pasar Babaan atau Pesapen Surabaya. Bahan yang digunakan adalah simplisia daun kecombrang (*Etlingera elatior*) sebanyak 250 gram dalam bentuk serbuk, Media *Nutrient Agar* (NA) dan NaCl untuk uji TPC. *Tetrathionate Broth*, *iodine*, *Salmonella Shigella Agar*, Kristal Violet, Lugol, Safranin, Alkohol 70%, media *Triple Sugar Iron Agar*, media SIM, *Urea agar*, dan *Simmon Citrate Agar*, *MR-VP Broth* uji kandungan *Salmonella* sp, KOH 3%, *reagen Kovac*, dan oil emersi.

3.2.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan yaitu gloves, masker, mikroskop, incubator, pisau, talenan, cawan petri, tabung reaksi, objek glass, labu erlenmayer 250 ml, gelas ukur 25 dan 50 ml, rak tabung reaksi, pipet tetes, pinset batang pengaduk,

Bunsen, autoklaf, aluminium foil, cortex, spuit 1cc, *cotton swab*, sumbat karet, karet gelang, kapas, bak pewarna, ose jarum, bulat, toples, kertas/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 kandungan *Salmonella sp* pada daging ayam.

3.3.1 Variabel Penelitian

Variable dalam penelitian ini terdiri dari :

1. Variabel kendali : Suhu saat penyimpanan daging ayam dalam berbagai perlakuan saat penelitian, waktu (jam) penyimpanan dari setiap perlakuan dalam penelitian.
2. Variabel terikat : Daging ayam bagian paha diberi simplisia daun kecombrang
3. Variabel bebas : Total bakteri dan cemaran *Salmonella sp* pada daging ayam.

3.3.2 Teknik Pengambilan Sampel

Pada penelitian ini menggunakan tektik *Simpel Random Sampling*. Sampel didapatkan dari populasi daging ayam di pasar Babaan atau Pesapen Surabaya. Sampel dalam penelitian ini yang telah diperoleh pada daging ayam kemudian diteliti dengan rumus pengulangan (Kusriningrum, 2019).

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

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

$$= 4n-5 \geq 15$$

$$= 4n \geq 15+5$$

$$= 4n \geq 20$$

$$= n \geq 5 \text{ Pengulangan}$$

Keterangan :

n : banyak perlakuan

t : jumlah perlakuan

Perhitungan diatas $n \geq 5$ maka penelitian memiliki 5 kali pengulangan. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 500 gram daging ayam yang diperoleh secara acak dari populasi, sehingga didapatkan 25 sampel dari empat perbandingan daging sapi dari pasar Babaan atau Pesapen Surabaya, penelitian ini menggunakan lima perlakuan yang terdiri dari :

- 1) P0 daging ayam 25 gram yang tidak diberi simplisia daun kecombrang dan tanpa proses penyimpanan (sebagai kontrol).
- 2) P1 daging ayam 25 gram yang tidak diberi simplisia daun kecombrang dengan lama penyimpanan 1 jam.
- 3) P2 daging ayam 25 gram yang diberi simplisia daun kecombraang 25 gram dengan lama penyimpanan 1 jam
- 4) P3 daging ayam 25 gram yang diberi simplisia daun kecombraang 25 gram dengan lama penyimpanan 2 jam
- 5) P4 daging ayam 25 gram yang diberi simplisia daun kecombraang 25 gram dengan lama penyimpanan 3 jam

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan Simplisia

Tahap pengeringan termasuk salah satu yang berpengaruh terhadap mutu simplisia. Pengeringan yaitu cara untuk mengurangi kadar air dengan bantuan energi panas alami (sinar matahari) atau buatan (alat pengering) (Effendi, 2012). Sebanyak 2,5 kg daun kecombrang yang telah dikumpulkan kemudian dilakukan

proses disortasi (basah dan kering). Setelah itu dilakukan proses pengeringan. Hasil dari pengeringan tersebut mengalami penyusutan simplisia sebesar 10% sehingga didapatkan berat daun kecombrang sebanyak 250 gram. Standar susut pengeringan simplisia yang baik adalah $\leq 10\%$, sedangkan susut pengeringan simplisia sebesar 10%. Pengeringan menggunakan oven dengan suhu 50°C menghasilkan simplisia yang lebih baik dari pengeringan alami, dalam proses pengeringan yang tepat dapat membantu mempertahankan kandungan kimia aktif dalam tumbuhan. (Caesarika dkk, 2018).

Effendi (2012) menyatakan bahwa simplisia daun kecombrang kering lebih efektif karena dalam proses pengeringan dapat mengkonsentrasikan bahan aktif dalam tumbuhan, sehingga simplisia kering lebih efektif dalam penggunaannya daripada tumbuhan kecombrang yang segar, mengingat bahwa Tumbuhan segar rentan terhadap kontaminasi mikroba, termasuk bakteri dan jamur, yang dapat menyebabkan kerusakan atau degradasi kandungan kimia yang diinginkan.

3.4.2 Persiapan Penelitian

Sebelum dilakukannya pengujian, dilakukan persiapan penelitian dengan membersihkan peralatan 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 (Vishal & Shukshith, 2016).

3.4.3 Uji Total Plate Count (TPC)

Total Plate Count (TPC) merupakan salah satu cara untuk mempermudah dalam pengujian mikroorganisme dari suatu sampel dan dapat menunjukkan adanya mikroorganisme patogen ataupun non patogen dengan pengamatan secara makroskopis yang kemudian dihitung berdasarkan TPC untuk standart tes pada bakteri (Lada, 2017)

Pengujian *Total Plate Count* (TPC) dimaksudkan untuk mengidentifikasi total bakteri pada daging ayam dengan menggunakan metode tuang (*pour plate*). Cawan petri difiksasi terlebih dahulu lalu suspense dari tabung reaksi pada tabung reaksi no. 2, no. 3, no. 4. Dimasukan ke cawan petri sebanyak 1 ml. *Nutrient agar* yang telah didinginkan hingga suhu 45°C-50°C dituang sekitar 20 ml. Cawan petri jangan sampai terbuka lebar agar terhindar dari pencemaran. Gerakan pada cawan petri memutar secara horizontal, agar media tersebar, lalu biarkan hingga menjadi padat, dan diberi waktu selama 24 jam pada suhu 37°C lalu cawan petri diinkubasi dengan posisi dibalik. Setelah itu amati pertumbuhan kuman yang berbentuk koloni yang berjumlah 30-300 koloni, setelah itu hitung dengan factor pengenceran (Lada, 2017).

Koloni bakteri yang tumbuh pada tiap cawan sampel diitung dengan menggunakan *Colony counter*, jumlah koloni yang terdapat dalam sampel dapat dihitung menggunakan rumus:

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

3.4.4 Uji Cemaran *Salmonella* sp.

Pengujian *Salmonella* sp. dilakukan untuk mengetahui keberadaan bakteri *Salmonella* sp. pada daging ayam. 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. *Tetrathionate* broth mengandung inhibitor yang menghambat pertumbuhan sebagian besar mikroorganisme, kecuali *Salmonella* sp. Ini memungkinkan pertumbuhan *Salmonella* secara selektif, (Apelabi *et al.*, 2015).

Tahap pembuatan media pengayaan selektif dimulai dari pencampuran *Tetrathionate Broth Base* sebanyak 77g dengan NaCl, lalu dipanaskan hingga mendidih, setelah itu didinginkan hingga suhunya mencapai dibawah 45°C agar dapat ditambahkan larutan iodine sebanyak 20 ml, lalu media dibagi dengan takaran 10 ml dalam tabung reaksi. Sebanyak 1 gram daging ayam yang menjadi sampel pengujian *Salmonella* sp., daging ayam dihaluskan terlebih dahulu, lalu dimasukkan ke dalam *Tetrathionate Broth* yang telah dibuat, setelah itu dihomogenkan hingga tercampur sepenuhnya, dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. setelah itu sampel yang telah diinkubasi diambil dengan menggunakan ose untuk digores secara kuadran pada *Salmonella Shigella Agar* (SSA) (Bakara *et al.*, 2014).

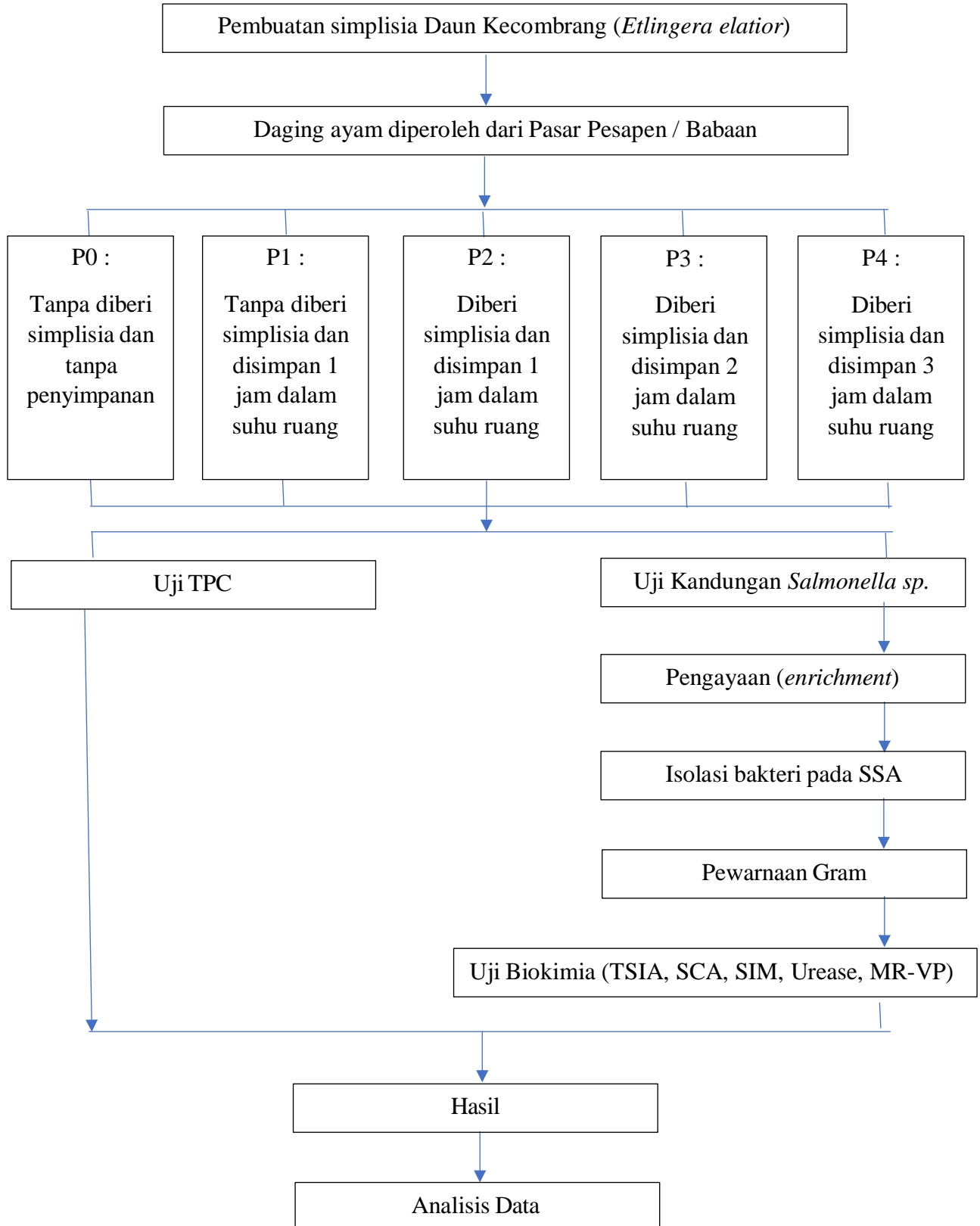
Cawan yang positif *Salmonella sp.*, diambil isolat koloni yang terpisah untuk dilakukan pewarnaan gram. Pewarnaan gram tersebut merupakan tahap awal karakterisasi dan identifikasi isolate bakteri. Tahapannya yaitu preparate ulas yang sudah difiksasi diatas bunsen diberikan pewarnaan kristal violet selama satu menit, setelah itu bilas dengan air menggunakan pipet tetes. Setelah itu preparate juga diberikan iodine dan didiamkan selama 1 menit, lalu bilas Kembali dengan air. Selanjutnya tahap terakhir preparate ditetesi pewarna safranin dan dibiarkan selama 30 detik, kemudian bilas lagi menggunakan air dan keringkan dengan kertas penghisap. Setelah itu preparate diberi minyak emersi, kemudian diamati menggunakan mikroskop (Suryanti *et al.*, 2018). Jika pada uji pewarnaan diketahui terdapat ciri-ciri atau indikasi biakan *Salmonella sp.*, maka akan dilanjutkan dengan uji biokimia, yaitu :

1. Uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), dilakukan menggunakan cara diinokulasikan tegak lurus pada bagian *butt* dan cara goresan sinambung pada bagian *slant*. Setelah itu biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati perubahan warna media. Ciri bakteri *Salmonella sp.* yaitu bagian tegaknya terjadi perubahan berwarna kuning dengan atau tanpa warna hitam (H₂S) , dan bagian yang miring berwarna merah atau tidak berubah.
2. Uji *Sulfida Indole Motility* (SIM), dilakukan menggunakan cara diinokulasikan ke dalam media *Sulfida Indole Motility* (SIM) lalu diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Hasil uji indole dilakukan dengan menambahkan 10 tetes *reagen kovac*. Jika hasilnya positif akan ditandai

dengan cincin merah di permukaan media, sedangkan jika negative akan ditandai dengan tidak terbentuknya cincin merah di permukaan media.

3. Uji Urease dilakukan menggunakan media biakan isolate bakteri yang disebut dengan *Urea Base Agar*. Uji Urease ini dilakukan dengan cara koloni diambil dari positif SSA menggunakan ose lalu diinokulasikan ke media SCA dengan cara digores pada media agar miring, setelah itu diinkubasi pada temperature 37°C selama 24 jam. Jika hasilnya positif akan berwarna pink sampai merah pada media, sedangkan jika hasilnya negative akan ditandai dengan warna kuning pada media.
4. Uji *Simmon Citrate Agar* (SCA), uji ini dilakukan dengan cara koloni diambil dengan jarum ose dan diinokulasikan ke media SCA lalu digoreskan pada media agar miring, setelah itu diinkubasi dengan temperature 37°C selama 24 jam. Jika hasilnya positif akan ditandai dengan adanya pertumbuhan koloni yang diikuti dengan perubahan warna.
5. Uji *Methyl Red-Voges Proskauer*, uji ini dilakukan dengan cara koloni diambil dengan jarum ose dan diinokulasikan ke media MR-VP lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Tambahkan tiga tetes reagen MR ke dalam media untuk melakukan uji MR. Jika hasilnya positif akan mengalami perubahan warna media menjadi merah yang artinya terbentuk asam. Selanjutnya, uji VP dilakukan dengan cara menambahkan tiga tetes KOH 3% dan lima tetes alfa-naftol, lalu dihomogenkan dan didiamkan. Jika hasilnya positif ditandai dengan difusi warna merah dalam media dan jika hasilnya negative akan ditandai dengan warna kuning pada media.

3.5 Kerangka Operasional



3.6 Analisis Data

Data yang telah didapat setelah penelitian terdapat daging ayam yang diberi simplisia daun kecombrang (*Etlintera elatior*) dan telah didiamkan dalam suhu ruangan dengan waktu satu jam, dua jam, tiga jam, lalu dibandingkan dengan daging ayam yang tidak diberi simplisia daun kecombrang (*Etlintera elatior*), kemudian dilakukan perbandingan peninjauan menggunakan metode deskriptif untuk uji kandungan bakteri *Salmonella sp.* Metode Analysis of Variant (ANOVA) pada uji *Total Plate Count* (TPC).