

III. METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 12 sampai 26 Februari 2023 dengan menggunakan daging sapi yang di peroleh dari pasar Dukuh Kupang Surabaya. Penelitian *Total Plate Count* dan kandungan *Salmonella sp.* pada daging sapi yang diberi simplisasi bunga Kecombrang (*Etlingera elatior*) 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 daging sapi bagian paha atau thigh yang diperoleh dari pasar Dukuh Kupang Surabaya. Bahan lainnya adalah simplisasi bunga kecombrang (*Etlingera elatior*) Sebanyak 250 gram, 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, cawan petri, tabung reaki, object glass, labu erlenmayer 250 ml, gelas ukur 25 ml dan 50 ml, rak tabung reaksi, pipet tetes, pinset, batang pengaduk,

bunsen, autoklaf, aluminium foil, vortex, spuit 1 cc, *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 sapi.

3.3.1 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini terdiri dari variabel terikat yaitu total bakteri dan kandungan *Salmonella sp.* Variabel bebas yaitu daging sapi dan variabel kendali yaitu suhu penyimpanan daging dalam berbagai perlakuan saat penelitian, lama penyimpanan (jam) penelitian.

3.3.2 Teknik Pengambilan Sampel

Penelitian ini menggunakan teknik *Simpel Random sampling*. Sampel didapatkan dari populasi daging sapi di pasar Dukuh Kupang Surabaya. Sampel dalam penelitian ini yang telah diperoleh pada daging sapi kemudian diteliti dengan rumus pengulangan (Kusriningrum, 2019).

$$\begin{aligned}
 t(n-1) &\geq 15 \\
 t(n-1) &\geq 15 = 5(n-1) \\
 &= 5n-5 \geq 15 \\
 &= 5n \geq 15+5 \\
 &= 5n \geq 20 \\
 &= n \geq 4 \text{ Pengulangan}
 \end{aligned}$$

Keterangan :

n : Banyak perlakuan

t : Jumlah perlakuan

Berdasarkan perhitungan diatas $n \geq 4$ maka penelitian memiliki 5 kali pengulangan. bahan utama penelitian ini adalah 1 kg daging sapi yan diperoleh secara acak dari populasi, sehingga didapatkan 25 sampel dari lima perbandingan daging sapi dari pasar dukuh kupang surabaya, penelitian ini menggunakan lima perlakuan yang terdiri dari :

- 1) P0 daging sapi yang tidak diberi simplisasi bunga kecombrang dan tanpa proses penyimpanan (sebagai kontrol).
- 2) P1 daging sapi yang diberi simplisasi bunga kecombrang dengan lama penyimpanan 1 jam.
- 3) P2 daging sapi yang diberi simplisasi bunga kecombrang dengan lama penyimpanan 2 jam.
- 4) P3 daging sapi yang diberi simplisasi bunga kecobrang dengan lama penyimpanan 3 jam.
- 5) P4 daging sapi yang diberi simplisasi bunga kecombrang dengan lama penyimpanan 4 jam.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan Simplisasi Bunga Kecombrang

Untuk memisahkan bunga kecombrang dari batang, bagian bunga yang sudah kering, dan kotoran, sampel disortasi basah dan kering. Setelah itu, sampel dirajang tipis dan dikeringkan dengan menggunakan oven . Pengeringan oven pada wadah dengan suhu 50°C selama 150 menit hingga merata. ketika bunga telah

kering selanjutnya di bunga dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi bubuk simplisia yang siap digunakan (Soemarie *et al.*, 2019).

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 (Vishal & Shukshith, 2016). Setelah diperoleh daging dari pasar dukuh kupang sebanyak 3 kilo, daging kemudian di potong dan di bagi kedalam 5 wadah steril yang sudah disiapkan untuk selanjutnya diberi perlakuan. masing masing wadah yang sudah diberi lebel P1, P2, P3 dan P4 kemudian dilumuri simplisia bunga kecombrang hingga merata dan sampel siap untuk dilakukan pengujian sesuai dengan waktu penyimpanannya.

3.4.3 Uji Total Plate Count (TPC)

Pengujian *Total Plate Count* (TPC) dimaksudkan untuk mengidentifikasi total bakteri pada daging sapi dengan menggunakan metode *Spread plate*. Timbang daging sebanyak 1 gram lalu tumbuk hingga hancur menggunakan mortar dan stemper lalu ditambahkan aquadest steril secukupnya.

Pembuatan pengenceran dilakukan dengan mengambil 1 gram daging sapi yang telah di tumbuk ke dalam tabung reaksi pertama yang berisi 9 ml aquadest steril sehingga terbentuk pengenceran 10^{-1} . Pengenceran kedua dilakukan dalam tabung reaksi kedua yang berisi 9 ml aquadest steril sehingga terbentuk pengenceran 10^{-2} . Pengenceran dilanjutkan dengan cara yang sama hingga diperoleh pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} dan 10^{-5} . Dari pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} Sebanyak

0,1 ml diinokulasikan ke dalam media *Nutrient agar* dalam cawan petri. Setelah itu diratakan dengan menggunakan batang kaca bengkok, Media didiamkan hingga memadat dan berbentuk agar. Cawan petri diinkubasikan dalam inkubator dengan posisi terbalik pada suhu 37° selama 24 jam.

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 Kandungan *Salmonella sp.*

Pengujian *Salmonella sp.* dilakukan untuk mengetahui keberadaan bakteri *Salmonella sp.* Pada daging sapi. Pengujian diawali dengan sterilisasi semua alat, karena proses penelitian harus dilakukan dalam kondisi steril agar tidak terkontaminasi oleh bakteri lain.

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). Pembuatan media pengayaan selektif dimulai dari tahap pencampuran *Tetrathionate Broth Base Sebanyak 77kg dengan NaCl*, Kemudian dipanaskan hingga mendidih, lalu didinginkan hingga suhunya menjadi dibawah 45°C untuk dapat ditambahkan larutan iodine sebanyak 20ml, kemudian media dibagi dalam takaran 10ml dalam tabung reaksi. sebanyak 1 gram daging sapi yang menjadi sampel pengujian

Salmonella sp. dihaluskan terlebih dahulu , lalu dalam *Tetrathionate Broth* yang telah dibuat, kemudian dihomogenkan hingga tercampur sepenuhnya, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Setelah Proses inkubasi selesai, sampel 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 berbentuk cembung dengan pinggiran rata dan bulat, serta ditandai dengan terjadinya warna media, yaitu pada *butt* atau dasar menjadi kuning, dan merah pada slant. fermentasi glukosa oleh bakteri ini merupakan faktor terjadinya perubahan warna. Hasil positif bakteri *Salmonella sp.* dapat ditunjukkan dengan pembentukan ruang udara di bawah media sehingga terangkat ke atas (Kartika *et al.*, 2014).

3.4.5 Pewarnaan gram

Cawan yang positif *Salmonella sp.* diambil isolasi koloni terpisahannya untuk dilakukan pewarnaan gram. Tahap awal identifikasi dan karakterisasi isolasi bakteri adalah pewarnaan gram. Setelah preparat ulas diletakkan di atas bunsen, diberikan pewarnaan kristal violet selama satu menit, kemudian bilas dengan pipet tetes. Selanjutnya, preparat ditambahkan iodine dan diamkan selama satu menit. Selanjutnya, ditambahkan alkohol 96% selama satu menit, dan bilas lagi dengan air. Terakhir, pewarnaan safranin diteteskan pada preparat dan dibiarkan selama 30 detik, kemudian dibilas lagi dengan air. Setelah preparat kering, minyak emersi ditambahkan dan kemudian diamati dengan mikroskop. (Suryanti *et al.*, 2018). Pada pewarnaan gram, bakteri positif akan berwarna violet, sedangkan bakteri gram

negatif berwarna merah (Rokhim, 2023). Apabila pada uji pewarnaan diketahui terdapat bakteri *Salmonella sp.* maka akan dilanjutkan dengan uji biokimia.

3.4.6 Uji TSIA

Untuk menguji TSIA, isolat bakteri diinokulasi pada media Triple Sugar Iron Agar (TSIA). Ini dilakukan dengan memasukkan isolat bakteri tegak lurus pada bagian butt dan menggores sinambung pada bagian slant. Selama 24 jam setelah viakan diinkubasi selama 37°C, warna media dapat diamati. Jika bagian slant media berwarna merah dan bagian butt berwarna kuning, isolat bakteri dapat memfermentasikan glukosa. Jika bagian *slant* dan *butt* media berwarna kuning, isolat bakteri dapat memfermentasikan laktosa, sukrosa, dan glukosa. (Kursia *et al.*, 2020).

3.4.7 Uji Indol

Uji indol dilakukan dengan isolasi bakteri yang dimasukkan ke dalam motilitas Sulfida Cindole (SIM), yang kemudian disimpan selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil uji diamati dengan menambahkan 10 tetes reagen kovac. Terbentuknya lapisan berwarna merah di atas biakan menunjukkan hasil uji motilitas. Ini dilakukan dengan menginokulasikan suhu koloni isolat bakteri ke dalam media SIM, kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37° Celcius. Bakteri yang berkembang di sekitar tusukan menunjukkan hasil yang negatif, tetapi bakteri yang menyebar di media menunjukkan hasil yang positif.

3.4.8 Uji SCA

Koloni diambil dari SSA positif dengan ose, diinokulasikan ke media SCA dengan digores pada media agar miring, dan diinkubasi selama 24 jam pada 37°C. Hasil uji positif menunjukkan pertumbuhan koloni, sedangkan hasil uji negatif tidak menunjukkan perubahan warna. (Abrori *et al.*, 2022).

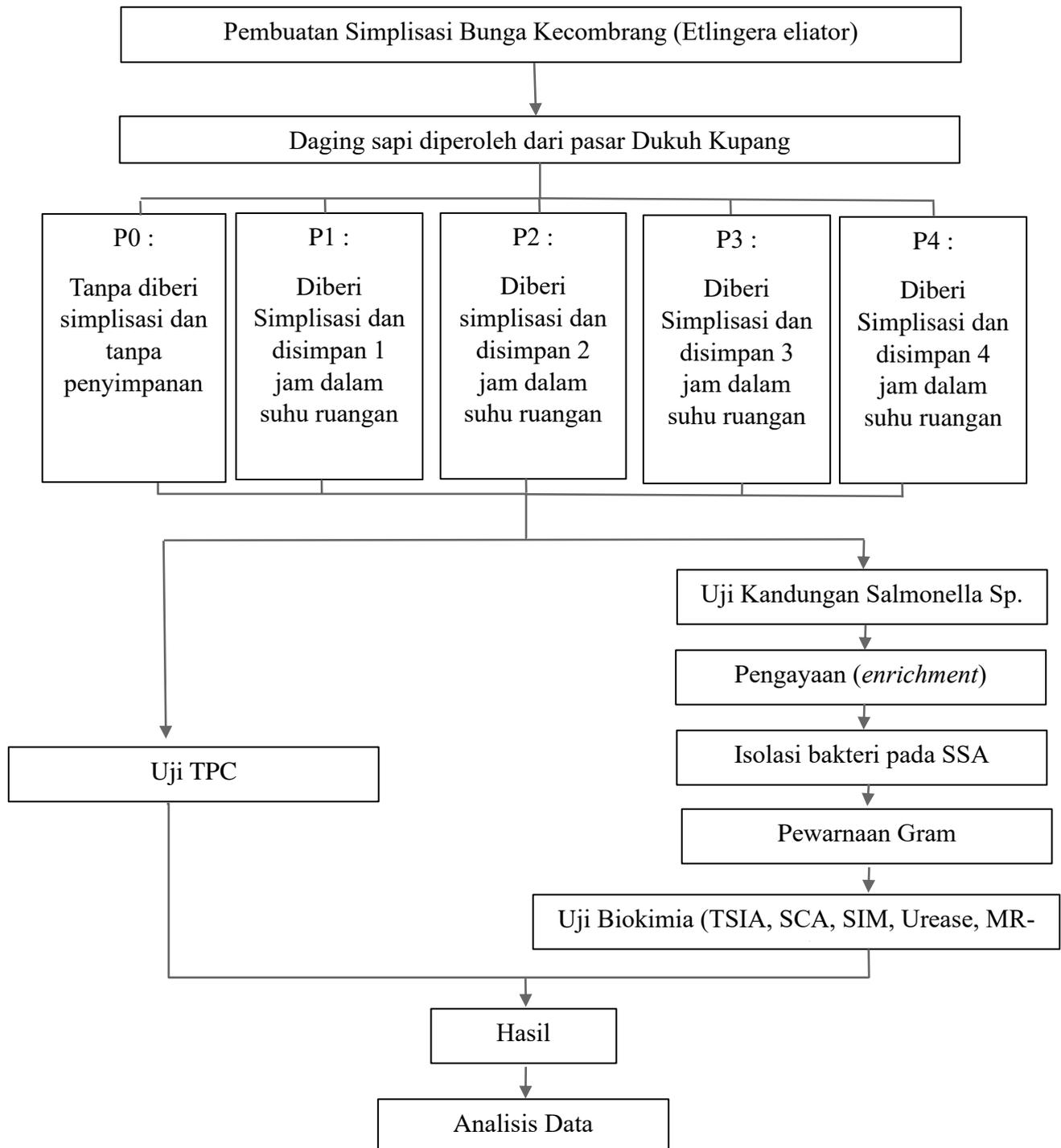
3.4.9 Uji Urease

Uji Urease dilakukan dengan koloni ose yang diambil dari positif SSA. Koloni ini kemudian diinkubasi ke media SCA dengan digores pada media agar miring dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°. Hasil uji positif ditandai dengan warna pink hingga merah pada media, sedangkan hasil uji negatif ditandai dengan warna kuning tetap pada media. (Abrori *et al.*, 2022).

3.4.10 Uji MR-VP

Uji MR-VP menggunakan isolat bakteri yang diinkubasi ke dalam media MR-VP. Media ini kemudian disimpan pada suhu 37° C selama 48 jam. Untuk melakukan pengamatan magnetik resonansi (MR), tiga tetes reagen MR ditambahkan ke dalam media. Untuk melakukan uji VP, tiga tetes KOH 3% dan lima tetes alfanol ditambahkan, dan media dikocok selama 30 detik. *Salmonella sp.* biasanya menunjukkan hasil uji VP negatif, yang berarti bahwa media tidak mengalami perubahan warna; sebaliknya, uji MR menunjukkan hasil positif dengan difusi warna merah ke dalam media, dan uji MR negatif dengan difusi warna kuning. Perubahan warna pink menjadi merah delima menunjukkan bahwa terbentuk asam. (Abrori *et al.*, 2022)

3.5 Kerangka Oprasional



3.6 Analisa data

Data yang telah didapatkan setelah proses penelitian terhadap daging sapi yang diberi simpliasi bunga kecombrang (*Elingera elatior*) dan didiamkan dalam suhu ruangan dengan waktu satu jam, dua jam, tiga jam empat jam dan dibandingkan dengan daging sapi tanpa diberi ekstrak bunga kecombrang (*Elingera eliator*), kemudian dilakukan perbandingan peninjauan dengan metode deskriptif untuk uji kandungan bakteri *Salmonella sp.* Metode *Analysis of Variant* (ANOVA) yang dilanjutkan dengan uji Non parametrik pada metode pengolahan data Kruskal-Wallis dan Mann-Whitney digunakan dalam analisis data pada uji *Total Plate Count* (TPC).