

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2019 di Laboratorium Kesehatan Daerah Medan Jl. Williem Iskandar Pasar V Barat.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah, inkubator, oven, autoklaf, timbangan analitik, tabung reaksi, cawan petri, bunsen, erlemeyer, jarum ose, pipet tetes, gelas ukur 100 ml, Hot plate stirer, rak tabung, spatula, gunting, pinset, batang pengaduk L, mikroskop, objek glass, cover glass, sterofom (kardus), kulkas, dan, freezer, alat tulis, dan kamera.

3.2.2 Bahan

Bahan yang diamati dalam penelitian ini adalah ikan bawal air tawar (*Colossoma marcopomun*). Media yang digunakan dalam penelitian ini yaitu aquades, aluminum foil, Salmonella Shigella Agar (SSA), Buffer Pepton Water (BPW), indol, Methyl Red Voges Proskauer (MR-VP), Triple Sugar Iron Agar (TSIA), Nutrient Agar (NA), Simmons Citrate, Sulfid Indol Motility (SIM), media gula-gula (laktosa, maltosa, sukrosa, glukosa dan manitol), karet gelang, kapas, spiritus, kertas jagung, tisu, kertas label.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan penelitian eksperimen dan rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dan dilakukan dengan 5 perlakuan lama penyimpanan pada suhu ruang (25 – 35 °C), suhu kulkas (10 °C) dan suhu freezer (-2 °C) - 0 °C)

- a. (P0) : Pengukuran Awal (Kontrol)
- b. (P1) : 1 hari penyimpanan

c. (P2) : 2 hari penyimpanan

d. (P3) : 3 hari penyimpanan

e. (P4) : 4 hari penyimpanan

Setiap perlakuan di ulang 3 kali. Variabel yang di ukur adalah jumlah bakteri *Salmonella* sp.pada ikan bawal air tawar(*Colossoma marcopomum*).

Tabel 3.1 Waktu dan suhu penyimpanan Ikan Bawal air tawar (*Colossoma marcopomum*)

| Waktu (P) | Suhu ruang (R) (25 –35) | Suhu kulkas (K) (10) | Suhu freezer (F) (-2) - 0) |
|----------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| P ₀ | P ₀ R | P ₀ K | P ₀ F |
| P ₁ | P ₁ R | P ₁ K | P ₁ F |
| P ₂ | P ₂ R | P ₂ K | P ₂ F |
| P ₃ | P ₃ R | P ₃ K | P ₃ F |
| P ₄ | P ₄ R | P ₄ K | P ₄ F |

3.4 Prosedur Penelitian

a. Sterilisasi Alat dan bahan

Sterilisasi alat dan bahan yang akan dipakai disiapkan terlebih dahulu kemudian disterilisasi. Alat-alat tersebut dicuci dan dikeringkan. Tabung reaksi, gelas ukur, erlenmeyer, cawan petri, pipet, dilindungi dengan cara dibungkus dengan kertas jagung, setelah itu diautoklaf selama 1-2 jam pada suhu 121 . Untuk alat seperti mortal disterilkan didalam oven pada suhu 121 selama 15 menit. Untuk alat – alat dan bahan seperti SSA, BPW, TSIA, dan akuades disterilisasikan didalam autoklaf pada suhu 121 selama 15-20 menit dengan tekanan 15 atm(Prianti,2018).

b. Penyiapan Sampel

Pengambilan sampel ikan bawal pada penelitian ini ambil ditempat budidaya ikan bawal air tawar yang ada di Labuhan Deli sebanyak 3 ekor.

c. Pembuatan Media *Salmonella* sp Agar

Cara pembuatan media SSA, pertama menimbang bubuk 25 gram menggunakan neraca analitik, kemudian masukkan kedalam erlenmeyer

media dilarutkan dengan 1 L aquades. Kemudian larutan diaduk hingga homogen. Larutan dipanaskan menggunakan hot plate stirer sambil mengaduk hingga larut sempurna. Setelah larutan media di sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 selama 15 menit. Media di tuang ke dalam cawan petri steril dalam keadaan masih cair sekitar suhu 45 . Media diberi nama dan tanggal pembuatan. Kemudian membiarkan media dingin dan padat. Setelah itu media tersebut dibungkus dan di simpan dalam lemari es.

d. Pembuatan Media Buffer Pepton Agar (BPW)

Cara pembuatan media BPW, pertama menimbang bubuk 25 gram menggunakan neraca analitik, kemudian masukkan kedalam erlenmeyer media dilarutkan dengan 1 L aquades. Kemudian larutan diaduk hingga homogen. Larutan dipanaskan menggunakan hot plate stirer sambil mengaduk hingga larut sempurna. Setelah larutan media di sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 selama 15 menit. Media di tuang ke dalam cawan petri steril dalam keadaan masih cair sekitar suhu 45 .Kemudian membiarkan media dingin dan padat. Setelah itu media tersebut di simpan dalam lemari es.

e. Pembuatan Media Triple Sugar Iron Agar (TSIA)

Cara pembuatan media TSIA, pertama menimbang bubuk 25 gram menggunakan neraca analitik, kemudian masukkan kedalam erlenmeyer media dilarutkan dengan 1 L aquades. Kemudian larutan TSIA diaduk hingga homogen. Larutan dipanaskan menggunakan hot plate stirer sambil mengaduk hingga larut sempurna, lalu larutan dituang ke dalam tabung raksi sebanyak 2 ml.Tabung-tabung yang telah terisi dengan larutan ditutup menggunakan kapas. Kemudian di sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, media di dinginkan pada posisi miring, setelah padat lalu di simpan dalam lemari es. Media diberi label nama dan tanggal pembuatan.

f. Uji *Salmonella* sp.

Sampel ikan bawal di ambil dari yang tiga perlakuan yaitu suhu ruang, suhu kulkas, dan suhu freezerkemudian ditimbang sebanyak 25 gram dan

dimasukkan ke dalam plastik klip. Kemudian tambahkan 225 ml BPW dihomogenkan ke dalam plastik klip lalu di haluskan menggunakan bag mixer. Lalu di inkubasi di suhu ruang (37°C), suhu kulkas (10°C), suhu freezer ($-2-0^{\circ}\text{C}$) selama 4 hari. Kemudian 225 ml BPW dari tiga perlakuan penyimpanan hari pertama dimasukan kedalam enam tabung reaksi, yang masing-masing diisi 9 ml BPW. Ikan bawal yang telah halus dimasukan kedalam BPW, kemudian dimasukan kedalam tabung reaksi pertama. Dilakukan pengenceran 10^{-1} hingga 10^{-6} . Kemudian sampel diambil dengan ose cincin steril sebanyak 1 ose sampel kemudian ditanamkan pada media *Salmonella* sp. *Shigella* Agar (SSA) dengan teknik goresan zig-zag dan tetap berada dekat dengan lampu spiritus. Cawan petri yang berisi sampel diinkubasi pada inkubator pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam. Setelah itu, dihitung jumlah koloni pada media selektif SSA tersebut. Cara kerja untuk penyimpanan hari kedua, ketigadan keempat sama dengan hari pertama.

Untuk media SSA dilihat ada tidaknya pertumbuhan bakteri *Salmonella* sp kemudian jika ada pertumbuhan bakteri, dilanjutkan dengan reaksi biokimia TSIA. Mengambil biakan yang tumbuh pada media selektif SSA dengan menggunakan ose steril lurus, kemudian tusuk bagian tengah pada media TSIA, tarik hingga kepermukaan dengan goresan zig-zag, kemudian tutup dengan kapas dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hal ini dapat dilihat dari kode ketentuan (SNI-01-2332.2-2006).

3.5 Perhitungan Jumlah Koloni Bakteri

Setelah akhir masa inkubasi, koloni yang terbentuk dihitung. Perhitungan jumlah koloni dilakukan dengan menggunakan alat hitung coloni counter. Untuk menghitung koloni bakteri digunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Koloni} = \text{jumlah koloni percawan} \times \frac{1}{\text{faktor pengencer}}$$

Sumber rumus: (Fardiaz, 1989)

3.6 Teknik Analisis Data

Data hasil pengamatan angka lempeng total bakteri dianalisis secara statistik dengan analisis ANOVA (uji F taraf 5%), dengan kriteria pengujian :

1. Hipotesa Nihil (H_0) :Tidak ada pengaruhwaktu dan suhu ruang, suhu kulkas, suhu freezer terhadap kelimpahan bakteri *Salmonella* sppada ikan bawal air tawar (*Colossoma marcopomum*)
2. Hipotesis Alternatif (H_a) : Ada pengaruhwaktu dan suhu ruang, suhu kulkas, suhu freezer terhadap kelimpahan bakteri *Salmonella* sppada ikan bawal air tawar (*Colossoma marcopomum*)
 1. Jika $F_{hitung} \leq F_{tabel}$ pada taraf 5%, maka H_0 diterima
 2. Jika $F_{hitung} \geq F_{tabel}$ pada taraf 5%,maka H_a diterima dan H_0 ditolak

Jika data yang menunjukkan perbedaan pada hasil $F_{hitung} \geq F_{tabel}$, dilakukan dengan uji lanjut menggunakan uji Post Hock.

