

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Oktober 2018 di Laboratorium Bakteriologi Analisis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Palembang.

B. Jenis dan Metode Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan Deskriptif Kualitatif. Penelitian menggunakan metode eksperimen. Objek penelitian adalah bubuk cabai yang diambil dari seluruh penjual bubuk cabai di Pasar Sekip Ujung Palembang, yang berjumlah tiga penjual.

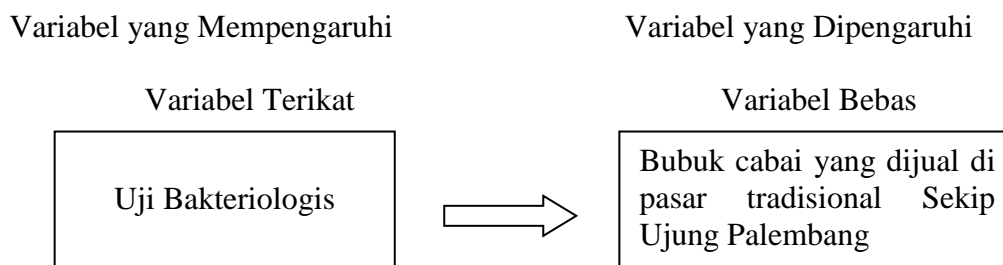
C. Sampel

Teknik sampling dalam penelitian ini menggunakan sampling jenuh sehingga populasi dan sampel dalam penelitian ini bubuk cabai dari tiga penjual yang berjualan di pasar Sekip Ujung Palembang masing-masing sampel di ambil sebanyak 100 gram (Arikunto, 2013).

D. Variabel

Dalam hubungan asimetris peneliti akan menjumpai beberapa variabel, antara lain variabel bebas (*Independent*) dan variabel terikat (*Dependent*). Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi, menjelaskan atau menerangkan variabel yang lain. Variabel terikat adalah variabel yang

dipengaruhi atau diterangkan oleh variabel lain tetapi tidak dapat mempengaruhi variabel yang lain (Yusuf, 2014), adapun hubungan variabel-variabel tersebut adalah:



E. Definisi Operasional Variabel

Setelah peneliti menjelaskan variabel-variabel yang diteliti dalam penelitian ini, selanjutnya dijelaskan mengenai definisi secara operasional untuk memberikan pengertian yang lebih jelas dan lebih terarah dalam pelaksanaan penelitian. Adapun definisi operasional variabel dalam penelitian ini adalah proses mengisolasi bakteri pada bubuk cabai dari Pasar tradisional Sekip Ujung Palembang.

Bubuk cabai merupakan substrat yang sesuai untuk pertumbuhan dan perkembangan bakteri karena cabai mengandung karbohidrat, protein dan lemak. Spesies bakteri yang mengontaminasi cabai yaitu *Staphylococcus aureus*, Coliform dan Coli fecal dan *Salmonella* sp. (Mirawati *dkk*, 2013). Uji bakteriologis dilakukan dengan perhitungan ALT untuk jumlah koloni, kultur bakteri gram negatif dan pewarnaan Gram serta uji biokimia.

Interprestasi hasil pada Media Brain Heart Infusion (BHI) yaitu Positif (+): terjadi kekeruhan pada Media Brain Heart Infusion (BHI). Negatif (-):

tidak terjadi kekeruhan pada Media Brain Heart Infusion (BHI) (Yunus *dkk*,2017).

Interpretasi hasil kultur bakteri pada Mac Conkey (MC) Agar, pembenihan ini bersifat selektif untuk hasil gram negatif, baik Enterobacteriaceae maupun yang non fermented basil gram negatif, sedangkan bakteri lain umumnya tidak tumbuh/tumbuh dengan tidak subur. Koloni yang memfermentasi laktosa berwarna merah bata dan dikelilingi oleh endapan garam empedu (Larasati, 2014).

Interprestasi hasil pada pewarnaan Gram yaitu Positif (+) ditemukan bakteri Gram negatif berbentuk batang berwarna merah. Negatif (-) tidak ditemukan bakteri Gram negatif berbentuk batang berwarna merah (Yunus *dkk*,2017).

Interprestasi hasil pada uji biokimia dilakukan beberapa tahap pengujian yakni uji Motilitas untuk mengeahui kemampuan pergerakan bakteri. Uji indole dengan cara mengamati perubahan warna yang terjadi setelah perubahan warna yang terjadi setelah penambahan reagen kovacs ke dalam media *Tryptone Soya Broth* (TSB) yang telah diinokulasi isolat bakteri selama 1-2 hari. Uji VP (Vogest Proskouer) untuk menguji adanya 2,3 butadianol yang dihasilkan oleh bakteri gram dengan cara penambahan reagen 5% α -naphthol di dalam ethyl alcohol absolut dan 40% KOH-Creatine. Uji urease untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghidrolisa urea menjadi amoniak karena adanya bakteri yang dapat mensintesa enzim urease dengan cara menginokulasikan isolat bakteri pada media urea dengan suhu 35°C selama 2-4 jam. Uji ONPG (ortho-Nitraphenil-

β -galactoside adalah uji untuk menunjukkan adanya enzim β -galactoside untuk membedakan fermentasi lactosa dari non-fermentasi lactosa organisme dengan menggunakan kultur dari media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) yang mengandung *lactosa* pada suhu 36°C selama 20 menit sampai dengan 1 jam dengan terbentuknya warna kuning pada media tabung apabila reaksi positif. Uji Simmon's Citrate dilakukan dengan cara biakan bakteri diinokulasi ke dalam medium Simmon's Citrate Agar dengan cara goresan menggunakan jarum ose steril selama 1-4 hari, untuk menguji kemampuan bakteri dalam menggunakan sitrat sebagai sumber karbon utama bagi bakteri (Hasanah *dkk*, 2012).

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah cawan petri, *dry heat oven*, *colony counter*, autoklaf, aluminium *foil*, gelas ukur, erlenmeyer, corong penyaring, kertas saring, neraca analitik, jarum ose, jarum *noodle* tabung reaksi, rak tabung reaksi, bunsen, spatula, pinset, mikroskop, objek glass, pipet tetes, kamera, kapas dan alat tulis.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah bubuk cabai, Aquadest, *Buffered Pepton Water* (BPW), *Plate Count Agar* (PCA), *Mac Conkey* (MC) Agar, Kristal Violet, Lugol, Alkohol 70%, Alkohol, Safranin, Emersi Oil, Motility, Glucosa, Lactosa, Mannitol, Maltosa, Sucharosa, Indol, TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), Urea, Methyl Red,

Vogest Proskouer, Simmon's Citrate, kontrol, Lysin Decarboxilase, Arginin Dehidrolase, Ornithin Decarboxilase, Vhenil Alanin, Kovacs, Methyl Red, Naphtol, KOH, FeCL₃ dan Varathane.

G. Prosedur Penelitian

Adapun prosedur penelitian yang akan dilakukan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Sterilisasi Alat (Lestari *dkk*, 2016):

Sterilisasi alat digunakan sebelum alat digunakan, yaitu dengan cara semua alat yang akan digunakan untuk isolasi (cawan petri, gelas ukur, erleneyer, corong penyaring, jarum ose, pinset dan tabung reaksi) dibungkus menggunakan aluminium *foil* dan disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm. Sedangkan alat yang tidak tahan terhadap panas tinggi disterilisasi dengan alkohol 70%.

2. Uji Angka Lempeng Total (ALT) (SNI, 2008):

a) Penyiapan Sampel Uji

Kemasan plastik sampel bubuk cabai yang akan dibuka dibersihkan dengan kapas beralkohol 70% kemudian dibuka secara aseptis di dekat nyala api spiritus.

b) Pembuatan media *Plate Count Agar* (PCA)

Secara aseptis diambil 6 gram *Plate Count Agar* (PCA) ke dalam labu ukur 500 ml, lalu ditambahkan 300 ml aquades dan dihomogenkan kemudian disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm.

- c) Homogenasi Sampel Bubuk Cabai dengan *Buffered Pepton Water* (BPW)

Sebanyak 3 buah labu ukur 200 ml disiapkan, secara aseptis diambil sebanyak 20 gram sampel ke dalam labu ukur 200 ml, lalu ditambahkan 180 ml *Buffered Pepton Water* (BPW) dan dihomogenkan hingga diperoleh pengenceran 10^{-1} .

- d) Pengenceran sampel

Sebanyak 1 ml pengenceran 10^{-1} dari hasil homogenisasi pada penyiapan sampel diambil dan dimasukkan ke dalam tabung pertama yang telah diisi 9 ml BPW hingga diperoleh pengenceran 10^{-2} . Selanjutnya dibuat pengenceran hingga 10^{-4} .

- e) Homogenasi Pengenceran Sampel dengan *Buffered Pepton Water* PCA

- f) Dari tiap pengenceran dipipet 1 ml suspensi ke dalam cawan petri steril secara *triplo*. Dalam setiap cawan petri dituangkan sebanyak 15 ml media PCA. Cawan petri digoyang dengan hati-hati agar sampel tersebar merata. Dilakukan pula uji kontrol untuk mengetahui sterilitas media dan pengencer. Uji sterilitas media dilakukan dengan cara menuangkan media PCA dalam cawan petri dan biarkan memadat. Uji sterilitas pengencer dilakukan dengan cara menuangkan media PCA dan 1 ml pengencer BPW lalu dibiarkan memadat. Seluruh cawan petri diinkubasi terbalik pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Jumlah koloni yang tumbuh diamati dan dihitung.

g) Perhitungan Angka Lempeng Total (ALT)

Perhitungan Angka Lempeng total dalam 1 ml contoh dengan mengkalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan dengan faktor pengenceran yang digunakan.

3. Inokulasi sampel bubuk cabai pada Media *Brain Heart Infussion* (BHI) (Yunus *dkk*, 2017):

a) Pembuatan Media *Brain Heart Infussion* (BHI)

Pembuatan Media *Brain Heart Infussion* (BHI) dengan cara media BHI sebanyak 4,44 gram dimasukkan kedalam erlenmeyer 250 mL dan dilarutkan dengan aquadest sebanyak 120 mL, buat sesuai kebutuhan dan ukur pH dengan indikator pH 7,4 \pm 0,2. Selanjutnya dipanaskan sampai larut dengan baik, setelah itu, disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

b) Inokulasi Sampel pada Media *Brain Heart Infussion* (BHI)

Dilakukan dengan cara sampel bubuk cabai ditimbang sebanyak 20 gram dan ditambahkan dengan aquadest sebanyak 180 mL aquadest, lalu di homogenkan dan di isolasi pada media *Brain Heart Infussion* (BHI) dengan perbandingan 9:1 dimana 9 ml untuk media Brain Heart Infusion (BHI) dan 1 ml untuk sampel. Selanjutnya diinkubasi media tersebut selama 1x24 jam pada suhu 37°C di inkubator. Jika terjadi kekeruhan pada Media *Brain Heart Infussion* (BHI) dilanjutkan pada media selektif yaitu media *Mac Conkey* (MC) Agar.

4. Inokulasi Bakteri Pada Media *Mac Conkey* (MC) (Hatmaningtyas, 2013).

Dilakukan dengan cara bakteri tersangka pada media *Brain Heart Infusion* (BHI), diambil dengan menggunakan ose yang sudah di fiksasi. Diinokulasikan pada media *Mac Conkey* (MC) tersebut selanjutnya diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C di inkubator. Koloni *Klebsiella* sp. pada media *Mac Conkey* tampak berwarna merah muda *mukoid*.

5. Pewarnaan Gram (Sahputra *dkk*, 2016):

Gelas obyek dibersihkan dengan alkohol 70% dan diberi aquades, secara aseptik diambil 1 ose biakan bakteri, diratakan pada kaca obyek dengan diameter kira-kira 1 cm, lalu difiksasi di atas nyala api. Selanjutnya ditetesi dengan larutan kristal violet dan didiamkan selama selama 1-2 menit, dibilas dengan air mengalir, ditetesi dengan larutan lugol, dan didiamkan selama 1 menit. Kemudian ditetesi dengan larutan alkohol 96% dan didiamkan selama 10 detik, dibilas dengan air yang mengalir. Ditetesi dengan safranin, didiamkan selama 1 menit, lalu bilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya, diamati pada mikroskop, dengan penambahan emersi oil dan dilakukan pemeriksaan menggunakan perbesaran 10x100. Bakteri Gram positif akan berwarna violet dan bakteri Gram negatif akan berwarna merah.

6. Uji Biokimia (Arini dan Wulandari, 2017):

Uji Biokimia dilakukan dengan menggunakan media Motility, Glukosa, Lactosa, Mannitol, Maltosa, Sucharosa, Indol, TSIA, Urea, Methyl Red, Vogest Proskouer, Simmon's Citrat, Control, Lysin

Decarboxilase, Arginin Dehidrolase, Ornithin Decarboxilase dan Vhenil Alanin.

Uji biokimia dilakukan dengan cara mengambil bakteri, mensterilkan tangan menggunakan sabun anti septik, mensterilkan jarum ose loop dan jarum ose *noodle* dengan cara dipanaskan di atas api bunsen sampai ujung jarum ose *noodle* memerah, mengambil sampel bakteri. Medium TSIA, Urea, Simmon's Citrat dan Vhenil Alanin, mensterilkan jarum *noodle* dengan cara memfiksasi ujungnya, mengambil tabung yang berisi bakteri dan mensterilkan mulut tabung dengan menggunakan api bunsen, mengambil bakteri dengan cara memasukkan jarum needle ke dalam tabung yang berisi sampel bakteri, mengambil tabung reaksi berisi medium TSIA, Urea, Simmon's Citrat dan Vhenil Alanin dan mensterilkan mulut tabung dengan menggunakan api bunsen, memasukkan bakteri ke medium TSIA dengan cara inokulasi yaitu jarum tegak menusuk media sampai menembus bawah tabung dan mensterilkan mulut tabung kembali dengan menggunakan api bunsen lalu menutup mulut tabung dengan kapas. Inokulasi bakteri pada medium Urea, Simmon's Citrat dan Vhenil Alanin dengan prosedur yang sama.

Pada media Motility, Glukosa, Lactosa, Mannitol, Maltosa, Sucharosa, Indol, Methyl Red, Vogest Proskouer, Control, Lysin Decarboxilase, Arginin Dehidrolase dan Ornithin Decarboxilase. Mensterilkan jarum ose dengan cara memfiksasi ujungnya mengambil tabung yang berisi bakteri dan mensterilkan mulut tabung dengan menggunakan api bunsen, mengambil bakteri dengan cara memasukkan

jarum ose ke dalam tabung yang berisi sampel bakteri, mengambil tabung reaksi berisi media Motility, kemudian mensterilkan mulut tabung dengan menggunakan api bunsen, memasukkan bakteri ke medium dengan cara hanya dioleskan di dalam media Motility, mensterilkan mulut tabung kembali dengan menggunakan api bunsen lalu menutup mulut tabung dengan kapas. Inokulasi bakteri pada media Glukosa, Lactosa, Mannitol, Maltosa, Sucharosa, Indol, Methyl Red, Vogest Proskouer, Control, Lysin Decarboxilase, Arginin Dehidrolase dan Ornithin Decarboxilase dengan prosedur yang sama. Lysin Decarboxilase, Arginin Dehidrolase dan Ornithin Decarboxilase masing-masing ditambahkan 4 tetes Varathan.

H. Teknik Pengumpulan Data

Sugiyono (2011), menyatakan bahwa teknik pengumpulan data adalah langkah strategis dalam penelitian, data hasil observasi langsung ke lokasi penjual cabai bubuk di pasar tradisional Sekip Ujung Palembang serta data yang diperoleh dari hasil pemeriksaan laboratorium terhadap bubuk cabai.

I. Teknik Analisis Data

Data kualitatif mengenai kandungan bakteri dan Angka Lempeng Total (ALT) pada bubuk cabai akan dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel distributif dan dinarasikan berdasarkan kepustakaan yang relevan dengan mengacu pada standar mutu *Rempah-Rempah Bubuk* SNI 01-3709-1995

