

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada analisis cemaran bakteri *Salmonella sp* adalah penelitian deskriptif yang bertujuan untuk memberikan gambaran mengenai fenomena yang ingin diteliti yakni bakteri *Salmonella sp* pada sampel ikan tuna beku yang diuji pada bulan Februari-Maret 2024. Metode yang digunakan adalah metode analisis kualitatif laboratorium yaitu menentukan ada tidaknya cemaran bakteri *Salmonella sp* pada sampel ikan tuna beku.

3.2. Populasi dan Sampel

3.2.1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini yaitu ikan tuna beku dari *PT. X* yang akan diujikan pada Laboratorium *PT. A*.

3.2.2. Sampel

Sampel yang digunakan yaitu ikan tuna beku yang diuji di Laboratorium *PT. A* pada bulan Februari-Maret 2024.

3.3. Waktu dan Tempat Penelitian

Kegiatan penelitian ini dilakukan pada bulan Februari hingga Maret 2024 di Laboratorium *PT. A*.

3.4. Bahan dan Alat

a. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu sampel ikan tuna beku, Alkohol 70%, Alkohol 95%, Solus *Salmonella sp* test kit, Media *Buffered Peptone Water* (BPW), Akuades, dan *Rappaport Vassiliadis Soya Broth* (RVS).

b. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah bunsen, korek api, gelas plastik, gunting, plastik *stomacher*, talenan, penggiling adonan, autoklaf, botol duran 1000 ml, neraca digital, gelas ukur 1000 ml, gelas beaker, spatula, sendok, nampan, botol duran 250 ml, inkubator, sterilisator dan ozon, tabung reaksi dengan penutup, rak tabung reaksi, *vortex*, *tube*, *water bath*, *pipettor 1000 µl*, *pipette tips 1000 µl*, *pipettor 100 µl*, *pipette tips 100 µl*, *wells* isi 12, rak well, *Microplate Reader*.

3.5. Variabel Penelitian

3.5.1. Variabel Independen (Variabel Bebas)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ikan tuna beku dari produsen/industri/pelanggan yang digunakan sebagai sampel.

3.5.2. Variabel Dependen (Variabel Terikat)

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu bakteri *Salmonella sp* yang terkandung pada ikan tuna beku.

3.6. Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi (Batasan)	Metode/Alat Pengukuran	Skala Pengukuran	Hasil Ukur
Cemaran bakteri <i>Salmonella sp</i>	Bakteri <i>Salmonella sp</i> merupakan bakteri patogen yang ada pada ikan tuna beku yang di uji di PT. A pada bulan Februari hingga Maret 2024	Test KIT	Nominal	Memenuhi syarat apabila kandungan bakteri <i>Salmonella sp</i> negatif/25 g. (SNI 4110: 2020 tentang Persyaratan Mutu dan Keamanan Ikan Beku)

3.7. Prosedur Penelitian

3.7.1. Persiapan Sampel

Pada penelitian ini, digunakan sampel komposit. Satu komposit terdiri dari maksimal empat sampel, dimana masing-masing sampel ditimbang 25 gram secara aseptis.

3.7.1.1. Pembuatan Media

a). *Buffered Peptone Water (BPW)*

Larutan stok BPW dibuat dengan cara melarutkan 18 gram media BPW dalam 1000 ml akuades, kemudian diaduk hingga homogen. Larutan stok BPW kemudian diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

b). *Rappaport Vassiliadis Soya Broth (RVS)*

Pembuatan media RVS dilakukan dengan cara menimbang media RVS sebanyak 27,11 gram di atas neraca analitik. Kemudian dilarutkan dengan akuades sebanyak 1000 ml hingga homogen. Setelah media terlarut, media kemudian dipindah pada

tabung reaksi sebanyak 10 ml, kemudian ditutup dengan rapat. Setelah itu media diinkubasi di dalam autoklaf pada suhu 115°C selama 15 menit.

3.7.2. Pengkayaan

- 1). 25 gram sampel ditambahkan dengan 225 ml BPW.
- 2). Suspensi sampel dalam BPW diinkubasi dengan inkubator pada suhu $37 \pm 1^\circ\text{C}$ selama 24 jam.
- 3). Dari sampel yang telah ditambahkan media BPW, dipindahkan sebanyak 100 μl ke 10 ml *Rappaport Vassiliadis Soya Broth* (RVS) dan diinkubasi selama 16-18 jam di *waterbath* pada suhu $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.7.3. Inaktivasi Panas Setelah Pengkayaan

- 1) Setelah sampel selesai diinkubasi, sampel kemudian dipindahkan sebanyak 1-2 ml aliquot (hindari partikulat) ke dalam tube.
- 2) Aliquot dipanaskan hingga 85-100°C selama 15-20 menit di dalam tube. Setelah pemanasan, sampel didinginkan hingga mencapai suhu ruang (18-25°C). Pendinginan dapat dipercepat dengan menempatkan tube dalam air selama 5 menit.

3.7.4. Pengujian dengan ELISA

- 1) Test kit dikeluarkan dari *chiller* setidaknya 1 jam sebelum digunakan agar suhu reagen mencapai suhu ruang (18-25°C). Disiapkan jumlah sumur (*wells*) yang diperlukan untuk pengujian. Kemudian diambil jumlah strip yang diperlukan dari kantong kemasan dan ditempatkan ke bingkai (*wells holder*) yang sudah disiapkan. Strip yang tidak digunakan harus dikembalikan ke kantong kemasan dan disimpan pada suhu 2-8°C.
- 2) *Wash Buffer* disiapkan dengan cara sebagai berikut:
Ditambahkan sebanyak 10 ml (1 botol) *Washing Buffer* konsentrat dengan 240 ml akuades kemudian dihomogenkan.

- 3) Sumur (*wells*) pertama dibiarkan pada strip kosong sebagai blanko untuk mengukur absorbansi substrat.
- 4) Sumur kedua sebanyak 100 µl kontrol negatif (label hijau pada test kit) ke dalam sumur (*wells*) kedua.
- 5) Sumur ketiga sampai dengan sumur ke-sebelas ditambahkan sebanyak 100 µl dari masing-masing sampel secara terpisah ke dalam sumur (*wells*) yang sudah diurutkan pada strip.
- 6) Sumur kedua belas ditambahkan sebanyak 100 µl kontrol positif (label merah pada test kit) ke dalam sumur (*wells*) ketiga.
- 7) *Wells* diinkubasi pada suhu $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 30-35 menit.
- 8) Semua cairan yang ada pada sumur (*wells*). dibuang Dicuci sumur (*wells*) sebanyak 5 kali dengan *Wash Buffer*.
- 9) *Conjugate* (label oranye pada test kit) ditambahkan sebanyak 100 µl dalam sumur (*wells*), kecuali pada sumur (*wells*) blanko.
- 10) *Wells* kembali diinkubasi pada suhu $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 30-35 menit.
- 11) Kemudian semua cairan dibuang, dan dibilas kembali menggunakan *Wash Buffer* sebanyak 5 kali.
- 12) *Substrate* (label biru pada test kit) diambil sebanyak 100 µl ke dalam semua sumur (*wells*), termasuk ke dalam sumur (*wells*) blanko.
- 13) Semua sumur (*wells*) diinkubasi kembali pada suhu ruang $18-25^{\circ}\text{C}$ dalam kondisi gelap.
- 14) Setelah diinkubasi, reaksi dihentikan dengan cara menambahkan 100 µl *Stop Solution* (label kuning pada test kit) ke semua sumur (*wells*) termasuk blanko. *Stop Solution* akan menyebabkan warna biru pada well berubah menjadi kuning.
- 15) Pembacaan optik well dilakukan dalam waktu 10 menit pada Panjang gelombang 450 nm menggunakan *Microplate Reader*. Sebelum membaca, gelembung udara diperiksa, jika ada gelembung udara dipecahkan dengan ujung tips yang masih baru.

3.8. Pengolahan, Penyajian dan Analisis Data

Pada penelitian analisis kandungan cemaran bakteri *Salmonella sp* menggunakan metode ELISA untuk mengetahui banyaknya kandungan bakteri yang terkandung pada ikan tuna beku. Data yang diperoleh pada penelitian ini disajikan dalam bentuk tabel. Dimana pada standar test kit ELISA, sampel kriteria kontrol dinyatakan valid jika:

- 1) Absorbansi kontrol positif > 500
- 2) Absorbansi kontrol negatif < 0.100

sedangkan kriteria untuk sampel, yaitu:

- 1) Absorbansi < 0.200 dinyatakan negatif
- 2) Absorbansi > 0.200 dinyatakan positif.

Tabel 3. 2 Tabel penyajian data

W	ID	Abs	Intrp

Keterangan:

- W : Wells
ID : Identity
Abs : Absorbansi
Intrp : Interpretasi