

#### IV. METODOLOGI PENELITIAN

##### A. Bahan dan Alat.

1. Bahan : - paha kodok lokal di Semarang
  - bubuk kaporit
  - air steril
  - air pepton
  - akuades
  - KI (kalium iodida)
  - asam asetat
  - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,1 N (natrium thiosulfat)
  - indikator amylum
  - bahan pengecatan Gram
  - SCB (Selenite Cystein Broth)
  - BSA (Bismuth Sulphite Agar)
  - KIA (Kligler Iron Agar)
  - LIA (Lysine Iron Agar)
  - medium glukosa cair
  - medium laktosa cair
  - medium maltosa cair
2. Alat : - autoklav
  - kapas
  - timbangan
  - gelas arloji
  - erlenmeyer 100 ml, 250 ml
  - buret 50 ml

- bejana/gelas ukur 200 ml, 500 ml, 1000 ml
- tabung reaksi 20 ml, tabung durham
- cawan petri 10 ml
- obyek glas
- mikroskop
- labu takar 100 ml
- pengaduk
- pipet ukur 5 ml
- jarum ose

## B. Prosedur/Cara Kerja.

### 1. Lapangan.

a. Lokasi. Lokasi pengambilan sampel dibagi menjadi beberapa sektor dimana masyarakat biasa memperoleh paha kodok di Kodya Semarang. Daerah Selatan diambil dari sekitar Jatingaleh dan Banyumanik. Daerah Timur diambil di sekitar Jl. Majapahit. Daerah Utara diambil dari daerah pangkal Jl. MT. Haryono dan Gang Baru. Daerah tengah dari sekitar Simpang Lima, sedang daerah Barat diambil dari daerah Karang Ayu.

b. Sampling. Sampel diambil secara acak dari pasar-pasar yang menjual paha kodok atau dari warung/rumah makan yang menyediakan paha kodok yang siap dikonsumsi. Perbedaan antara warung dan pasar dilakukan untuk mengetahui kemungkinan adanya perbedaan kontaminasi bakteri Salmonella sp.

## 2. Laboratorium

Penelitian secara laboratorium dilakukan di laboratorium Bioteknologi PS Biologi - MIPA Universitas Diponegoro..

a. Penentuan kadar klorin. Dilarutkan 1 gram kaporit dalam 1 liter akuades. Kemudian diambil 25 ml dan dimasukkan dalam erlenmeyer, ditambah beberapa tetes asam asetat untuk menurunkan pH antara 3 - 4. Ditambah 1 gram KI dan diaduk. Larutan kemudian dititrasi dengan 0,1 N natrium thiosulfat sampai berwarna kuning muda, kemudian ditetesi indikator amylum sampai warna biru muda. Titrasi dilanjutkan sampai warna biru tersebut hilang. Hasil titrasi dikoreksi dengan penentuan blanko. Rumus untuk menghitung kadar klorin adalah :

$$\text{Cl}_2 \text{ (mg/ml)} = \frac{(A \pm B) \times N \times 35,45}{\text{ml sampel}}$$

keterangan :

A = natrium thiosulfat yang diperlukan untuk titrasi sampel (ml).

B = natrium thiosulfat yang diperlukan untuk titrasi blanko (ml).

N = normalitas natrium thiosulfat.

Setelah diketahui kadar klorin dari larutan kaporit diteruskan dengan pembuatan larutan kaporit dengan kadar 150 ppm, 250 ppm, dan 20 ppm.

b. Perlakuan dengan klorin. Sampel paha kodok dipisahkan dari tulang-tulanganya kemudian dicampur menjadi satu sehingga diharapkan homogen. Sampel kemudian dibagi menjadi lima dan masing-masing diperlakukan dengan merendam dalam larutan : 150 ppm selama 10 menit, 150 ppm selama 15 menit, 250 ppm selama 10 menit, 250 ppm selama 15 menit. Sedang satu lagi sebagai kontrol. Setelah perlakuan, sampel dicuci dengan larutan klorin 20 ppm untuk menurunkan kadar klorin, pencucian dilakukan tiga kali kemudian dicuci lagi dengan air steril. Tiap perlakuan mendapatkan ulangan lima kali.

Penghitungan bakteri *Salmonella sp* (metode MPN).

Dibuat pengenceran 11 gram sampel kedalam 99 ml air pepton 1% . Selanjutnya dibuat pengenceran sampai  $10^{-5}$ . Dari masing-masing pengenceran diambil 5 ml dan diinokulasikan ke dalam 5 ml SCB double strength, untuk tiap pengenceran terdiri tiga tabung. Kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 35 °C. Untuk mengetahui bakteri *Salmonella sp* dari tiap tabung diinokulasikan secara goresan pada medium selektif BSA. Tabung-tabung yang menghasilkan koloni bakteri *Salmonella sp* dicatat dan dicocokkan dengan tabel MPN untuk menentukan jumlah bakteri *Salmonella sp*. Pada tahap ini dilakukan pula kontrol sterilitas medium dan bahan pengencer. Contoh penghitungan bakteri *Salmonella sp* dari gambar 01 adalah :

Pengenceran	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
tabung yang positif	0	1	1	0

Pada tabel MPN urutan 0, 1, 1 menunjukkan angka 3,6.

Maka jumlah bakteri Salmonella sp per gram bahan adalah :

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\text{Angka dari tabel MPN}}{100} \times \text{kebalikan dari pengenceran tengah} \\
 &= \frac{3,6}{100} \times 10^3 \\
 &= 36 \text{ sel } \underline{\text{Salmonella sp}} \text{ per gram}
 \end{aligned}$$

d. Pengujian bakteri Salmonella sp. Koloni bakteri Salmonella sp pada medium BSA ditunjukkan dengan koloni yang khas yaitu berbentuk cembung rendah, sirkuler, diameter 1 - 3 mm dengan pusatnya berwarna hitam, koloni dikelilingi oleh warna metalik. Koloni dengan ciri tersebut di atas selanjutnya diuji dengan medium KIA dan LIA serta medium-medium yang mengandung gula.

### C. Rancangan Percobaan Dan Analisa.

Penelitian ini merupakan percobaan faktorial 2 x 2 dengan menggunakan rancangan acak lengkap. Data yang didapat berupa angka-angka yang menunjukkan jumlah bakteri Salmonella sp yang tersisa setelah perlakuan. Data tersebut dianalisa dengan menggunakan ANOVA (Sokal, 1991).