

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

3.1.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah diskriptif dengan tujuan untuk mengidentifikasi bakteri *Escherichia coli* pada es batu yang dijual di warung daerah Sutorejo Surabaya.

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi Penelitian

Es batu yang dijual di warung – warung yang menjual es batu di daerah Sutorejo Surabaya.

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah 30 es batu yang diperoleh dari warung – warung yang menjual es batu di daerah Sutorejo Surabaya. Sampel yang digunakan adalah 30 sampel.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analisis Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2014 sampai dengan Juni 2015, sedangkan waktu pemeriksaan dilakukan pada bulan Maret sampai dengan April 2015.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Kandungan *Escherichia coli* pada es batu yang dijual di warung daerah Sutorejo Surabaya.

3.4.2 Definisi Operasional

Kandungan *Escherichia coli* penelitian dibagi menjadi dua yaitu positif terkandung *Escherichia coli* pada es batu, dan negatif tidak terkandung *Escherichia coli* pada es batu. Didapatkan hasil prosentase es batu yang positif dan negatif yang terkandung bakteri *Escherichia coli*, karena dilakukan uji Laboratorium.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan sebagai berikut :

1. Sampel es batu diambil di warung-warung di daerah Sutorejo Surabaya secara acak.
2. Es batu di cairkan pada suhu kamar di dalam laboratorium Mikrobiologi dan tetap dalam kondisi pada wadah es batu.
3. Ambil cairan es batu menggunakan pipet steril tanam pada media Boillon dan di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C di inkubator. Pada hari ke dua dengan penanaman pada media EMB di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C di inkubator. Pada hari ke tiga koloni yang tumbuh pada media EMB di tanam pada media IMVIC dan TSIA di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C di inkubator. Hari ke empat untuk pengamatan hasil dari penanaman.

4. Prosentase positif dan negatif es batu yang terkandung bakteri *Escherichia coli* di dapatkan dari data hasil penelitian

3.5.1 Prinsip Pemeriksaan

Es batu dicairkan terlebih dahulu pada suhu kamar, kemudian dipupuk pada media Boillon cair di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Perlakuan tersebut diamati terjadinya kekeruhan. Apabila terjadi kekeruhan dilanjutkan dengan penanaman pada media EMB. Bakteri *Escherichia coli* tumbuh tidaknya ditandai adanya koloni yang tumbuh pada media EMB yang mengkilat seperti logam setelah di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Untuk menegaskan adanya pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dilanjutkan dengan uji penegasan koloni yang tumbuh di EMB di tanam pada indol / air pepton, VP, MR, Simon Sitrat dan TSIA. Perlakuan tersebut akan di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati hasil positif atau tidaknya kandungan bakteri *Escherichia coli* pada es batu.

3.5.2 Alat - alat

Timbangan, gelas arloji, tabung reaksi, ose bulat, ose jarum, beaker glass, api spirtus, kaki tiga, gelas ukur, pengaduk, erlenmeyer, cawan petri disk, autoclave, rak tabung, pipet ukur, pipet tetes.

3.5.3 Bahan Pemeriksaan

Es batu.

3.5.4 Reagen dan Media Pemeriksaan

Boillon, indol/air pepton, EMB agar, Simon Sitrat, VP, MR, aquadest, NaCl, kovac, KOH 10%, TSIA, air daging, K₂HPO₄, glukosa.

3.5.5 Prosedur Pembuatan Media Boillon (Nutrient Broth)

1. Melakukan perhitungan media Boillon (Nutrient Broth)

Membuat Boillon untuk 30 erlenmeyer @ 10 ml.

Komposisi :

$$\text{Air Daging (Beef Ekstrak)} \frac{3}{1000} \times 300 = 0,9 \text{ gr}$$

$$\text{Pepton} \frac{10}{1000} \times 300 = 3 \text{ gr}$$

$$\text{NaCl} \frac{5}{1000} \times 300 = 1,5 \text{ gr}$$

2. Dari ketiga komposisi tersebut dimasukkan dalam beakerglass 500ml.
3. Dilarutkan dengan aquades 300 ml.
4. Dipanaskan dengan alat pemanas (bunsen) hingga larut sempurna.
5. Ambil media setelah larut sempurna dan mendidih.
6. Diamkan media sampai suam – suam kuku.
7. Di pH 7,2 – 7.4.
8. Dituang pada 30 erlemmeyer @ 10 ml.
9. Erlenmeyer yang sudah di isi dengan media Boillon ditutup dengan kapas kasa bersih.
10. Disterilisasi menggunakan autoclave dengan suhu 121°C, waktu 15 menit.

3.5.6 Pembuatan Media *Eosin Methylene Blue* (EMB)

1. Melakukan penimbangan media EMB (Eosin Methylin Blue)
Membuat media EMB untuk 30 plate @15 ml.
Komposisi EMB 36 gr per liter $\frac{36}{1000} \times 450 = 16,2$ gr.
2. Masukkan media EMB ke dalam erlenmeyer.
3. Ditambahkan aquades 450 ml.
4. Larutkan media menggunakan pemanas (bunsen) sampai larut sempurna dan mendidih.
5. Diaduk perlahan selama pemanasan.
6. Angkat media EMB setelah larut sempurna dan mendidih dari pemanas.
7. Diamkan hingga suam – suam.
8. Media EMB di pH 7,2.
9. Media ditutup menggunakan kapas kasa bersih.
10. Sterilisasi menggunakan autoclave dengan suhu 121°C dan waktu 15 menit.
11. Setelah srerilisasi tuang ke dalam 30 cawan petridisk steril @15 ml.

3.5.7 Prosedur Pembuatan Media VP dan MR

1. Melakukan penimbangan media VP dan MR.
Membuat media VP dan MR untuk 60 tabung @ 3 ml.
Komposisi media VP dan MR:

$$\text{Pepton } \frac{0,5}{100} \times 180 = 0,9 \text{ gr.}$$

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 \frac{0,5}{100} \times 180 = 0,9 \text{ gr.}$$

$$\text{Glukosa } \frac{0,5}{100} \times 180 = 0,9 \text{ gr.}$$

2. Masukkan komposisi media VP dan MR ke dalam beaker glass.
3. Dilarutkan dengan aquades 180 ml.
4. Dipanaskan menggunakan pemanas (bunsen) sampai larut sempurna dan mendidih.
5. Angkat media VP dan MR jika sudah larut sempurna dan mendidih.
6. Diamkan sampai suam - suam.
7. Media VP dan MR di pH 7,1
8. Masukkan ke dalam 60 tabung @ 3 ml.
9. Tutup menggunakan kapas kasa bersih.
10. Sterilisasi menggunakan autoclave dengan suhu 121°C dan waktu 15 menit.

3.5.8 Prosedur Pembuatan Media Air Pepton atau Indol

1. Melakukan Penimbangan Media Air Pepton / Indol

Membuat media Air Pepton / Indol untuk 30 tabung @ 3ml.

Komposisi media Air Pepton / Indol:

$$\text{Pepton } \frac{10}{1000} \times 90 = 0,9 \text{ gr}$$

$$\text{NaCl } \frac{5}{1000} \times 90 = 0,45 \text{ gr}$$

2. Masukkan komposisi media Air Pepton atau Indol ke dalam beaker glass.
3. Larutkan dengan 90 ml aquadest.
4. Larutkan menggunakan pemanas (bunsen) sampai larut sempurna dan mendidih.

5. Angkat media Air Pepton atau Indol yang sudah larut sempurna dan mendidih.
6. Diamkan sampai suam – suam.
7. Media Air Pepton atau Indol di Ph 7,2 – 7,4.
8. Tuangkan pada 30 tabung @ 3 ml.
9. Tutup menggunakan kapas kasa bersih.
10. Sterilisasi menggunakan autoclave dengan suhu 121°C dan waktu 15 menit.

3.5.9 Prosedur Pembuatan Media Simon Sitrat

1. Melakukan penimbangan media simon sitrat.
Membuat media simon sitrat 30 tabung @ 3 ml.
Perhitungan media simon sitrat $\frac{22,5}{1000} \times 90 = 2,025$ gr.
2. Dituang media ke dalam beaker glass dan ditambahkan 90 ml aquadest.
3. Panaskan menggunakan alat pemanas (bunsen) hingga larut sempurna dan mendidih.
4. Angkat beaker glass yang berisi media, dan diamkan sampai suam – suam.
5. Cocokkan pH dengan kertas pH, pH yang diinginkan adalah 7,8.
6. Kemudian media dituang dalam 30 tabung, yang masing – masing berisi 3 ml media.
7. Masing – masing media ditutup menggunakan kapas kasa.

8. Disterilisasi menggunakan autoclave dengan suhu 37°C dan waktu selama 15 menit.
9. Setelah disterilisasi, media dimiringkan membentuk lereng dan berbentuk agar.

3.5.10 Pembuatan media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)

1. Melakukan penimbangan media TSIA.

Membuat media TSIA sejumlah 30 tabung @ 3 ml.

Perhitungan media TSIA $\frac{65}{1000} \times 30 = 1,95$ gr.

2. Melarutkan media dengan aquadest sebanyak 90 ml, lalu memanaskannya sampai media larut.
3. Tunggu suam – suam.
4. pH sampai 7,4.
5. Tuangkan media kedalam tabung @ 3 ml, tutup dengan kasa.
6. Sterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121°C, selama 15 menit.
7. Miringkan tabung media sehingga media membentuk lereng dan ditunggu sampai memadat didalam tabung.

3.5.11 Prosedur Pemeriksaan

1 .Hari Pertama

Bahan dibiakkan pada media pemupuk.

Prosedur :

- a. Disiapkan sampel dan erlenmeyer yang berisi media Boillon.

- b. Dipipet 90 ml sampel air dari es batu kemudian dicampurkan dengan 10 ml media Boillon.
- c. Dikocok sampai homogen.
- d. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

1. Hari Kedua

Dari media pemupuk bahan diinokulasikan pada media Differensial EMB.

Prosedur :

- a. Media boillon yang telah berisi sampel dikeluarkan dari incubator, kemudian menyiapkan media EMB.
- b. Sampel pada media Boilon dikocok kemudian diambil sebanyak satu mata ose dan ditanam pada media EMB.
- c. Setelah ditanam pada media EMB kemudian diinkubasi menggunakan inkubator pada suhu 37°C dan waktu 24 jam.

2. Hari Ketiga

Penanaman pada media IMViC dan TSIA.

Prosedur :

- a. Dikeluarkan media EMB dari inkubator dan menyiapkan media IMViC dan TSIA.
- b. Dari media EMB dicari koloni yang bersifat metallic sheen kemudian diambil dengan menggunakan ose.
- c. Koloni tersebut ditanam pada media IMViC dan media TSIA menggunakan ose.

- d. Diinkubasi menggunakan inkubator pada suhu 37°C dan waktu 24 jam.

3. Hari Keempat

Pengamatan hasil pada media IMViC dan TSIA.

a. Pada media VP

Apabila ditambah dengan 3 tetes reagent alpha naftol dan 1 tetes KOH tidak terbentuk cincin merah.

b. Pada media MR

Apabila ditambah \pm 3 tetes reagen MR akan terbentuk warna merah.

c. Pada media Simon Sitrat

Media tetap berwarna hijau atau hasilnya negatif.

d. Pada media Air Pepton / Indol

Apabila ditambah \pm 3 tetes reagen covac maka terbentuk cincin merah.

e. Pada media TSIA

Pada media TSIA akan terbentuk :

- Lereng : acid
- Dasar : acid
- H₂S : -
- Gas : +

MR - : terbentuk cincin kuning pada tes Metyl Red.

6. Simon Sitrat + : berubah warna menjadi biru pada media Simon Sitrat.

Simon Sitrat - : tetap berwarna hijau pada media Simon Sitrat.

7. \sqrt : terdapat bakteri *Escherchia coli*.

8. \times : tidak terdapat bakteri *Escherchia coli*.

3.6 Metode Analisis Data

Data yang telah di peroleh dari hasil penelitian dikelompokkan dan dianalisa data kemudian ditabulasikan secara diskriptif yang hasil pemeriksaan dengan menghitung presentase positif dan negatif kandungan bakteri *Escherchia coli* pada es batu.