

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian deskriptif yaitu untuk mengetahui ada atau tidaknya bakteri *Escherichia coli* pada petis ikan tongkol di pasar Tanjung Bumi, Bangkalan Madura.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah petis ikan tongkol yang dijual di pasar Tanjung Bumi, Bangkalan Madura.

3.2.2 Sampel penelitian

Sampel yang diambil adalah tiga puluh sampel petis dari penjual petis ikan tongkol yang dijual di pasar Tanjung Bumi, Bangkalan Madura yang diambil secara acak atau random.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi penelitian

Lokasi penelitian ini dilakukan di laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Ilmu Kesehatan Prodi D3 Analis Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya Jalan Sutorejo no 59 Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Desember 2016 sampai dengan bulan Juli 2017, sedangkan waktu pemeriksaan bakteri *Escherichia coli* pada petis ikan tongkol dilakukan pada bulan Mei 2017.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli*

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

Bakteri *Escherichia coli* dalam penelitian ini menurut Sandra,(2013) di kategorikan :

a. Positif (+), bila :

1. Pada media *Eosin Methylene Blue* (EMB) terbentuk koloni yang berwarna metalik green
2. Dilakukan reaksi indol terbentuk cincin merah
3. Pada uji *metil red* terbentuk cincin merah
4. Pada gula – gula akan berwarna kuning karena bakteri mampu memfermentasi gula-gula tersebut.
5. *Voges prosteur* akan terbentuk warna merah
6. *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) hasilnya berwarna kuning pada bagian lereng maupun dasar dan bagian dasar akan terdapat warna hitam karena memproduksi H₂S dan terbentuk gas bagian dasar.
7. Motil akan terbentuk kabut pada area tusukan
8. *Simon Citrat* (SC) akan berubah warna menjadi biru tua.

b. Negatif (-), bila :

1. Pada media *Eosin Methylene Blue* (EMB) terbentuk koloni yang tidak berwarna metallic green
2. Pada uji indol tidak terbentuk cincin berwarna kuning
3. Pada uji *metil red* terbentuk cincin kuning
4. Pada gula – gula akan berwarna biru kehijauan tidak berubah menjadi kuning.
5. *Voges prosteur* setelah ditambah KOH 40 % dan alpha-naphthol 5% tidak akan berubah warna menjadi merah
6. Motil akan tidak terbentuk kabut pada area tusukan
7. *Simon Citrate* (SC) warna akan tetap hijau.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Pengumpulan data berdasarkan observasi atau pengamatan melalui uji laboratorium, kemudian dilihat ada tidaknya pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada sampel penelitian.

3.6 Tahapan Penelitian

3.6.1 Pembuatan Media

3.6.1.1 Alat

Pada pembuatan media alat yang digunakan menurut Sugianto,(2012) yaitu:

1. Erlenmeyer
2. *hot plate*
3. gelas ukur
5. pipet Pasteur
6. *beaker glass*
7. tabung gula-gula

- | | |
|---------------------|----------------------|
| 4. spatula | 8. tabung Durham |
| 9. Petridish | 14. filler |
| 10. kertas pH | 15. <i>autoclave</i> |
| 11. rak tabung | 16. pipet ukur 10 mL |
| 12. neraca analitik | 17. gelas arloji |
| 13. kain kasa | |

3.6.1.2 Bahan

Pada pembuatan media bahan yang digunakan menurut Sugianto,(2012) yaitu :

- | | |
|---|---------------------------|
| 1. <i>Eosin Methylene Blue</i> (EMB) | 6. <i>metil red</i> |
| 2. Bouillon | 7. <i>Voges proskauer</i> |
| 3. Gula-gula | 8. <i>Simon citrate</i> |
| 4. Indol | 9. Urea |
| 5. <i>Triple Sugar Iron Agar</i> (TSIA) | 10. Motil. |

3.6.1.3 Prosedur Pembuatan Media

Proses pembuatan media menurut Sugianto,(2012) yaitu :

1. *Eosin Methylene Blue* (EMB)
 - a. Media *Eosin Methylene Blue* (EMB) ditimbang sebanyak 16,2 gram.
 - b. Dilarutkan dengan 450 mL *aquadest* aduk hingga larut, kemudian panaskan diatas *hot plate* hingga larut sempurna.
 - c. Media *Eosin Methylene Blue* (EMB) yang sudah larut dengan sempurna ditunggu sampai suam-suam lalu di ukur pHnya $7,4 \pm 0,1$,

apabila pH terlalu tinggi ditambahkan HCl , jika pH kurang ditambah NaOH.

- d. *Eosin Methylene Blue* (EMB) disterilkan menggunakan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm.
- e. Media yang telah disterilkan dituang kedalam Petridish masing-masing di isi sebanyak 15 mL

2. *Voges proskauer* (VP)

- a. Ditimbang komposisi pembuatan *Voges proskauer* (VP) yaitu Pepton 0,05 gram, K₂HPO₄ 0,05 gram, Glukosa 0,05 gram.
- b. Semua komposisi yang telah ditimbang dicampur ke dalam Erlenmeyer lalu dilarutkan dengan *aquadest* 90 mL.
- c. Dipanaskan diatas *hot plate* hingga larut sempurna.
- d. *Voges proskauer* (VP) yang telah larut ditunggu hingga suam-suam lalu di ukur pHnya 7,1
- e. Media *Voges proskauer* (VP) yang telah selesai dituang kedalam tabung yang telah disediakan, masing-masing di isi sebanyak 3 mL setiap tabung.
- f. Semua tabung ditutup dengan kasa, lalu dibungkus dengan koran
- g. Media yang sudah dituang kedalam tabung disterilkan menggunakan *autoclave* pada 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.
- h. Media siap untuk digunakan.

3. *Metil Red* (MR)

- a. Ditimbang komposisi pembuatan *Metil Red* (MR) yaitu Pepton 0,05gram, K₂HPO₄ 0,05 gram, Glukosa 0,05 gram.

- b. Semua komposisi yang telah ditimbang dicampur ke dalam Erlenmeyer lalu dilarutkan dengan *aquadest* 90 mL.
- c. Dipanaskan diatas *hot plate* hingga larut sempurna.
- d. *Metil Red* (MR) yang telah larut ditunggu hingga suam-suam lalu di ukur pHnya 7,1
- e. Media *Metil Red* (MR) yang telah selesai dituang kedalam tabung yang telah disediakan, masing-masing di isi sebanyak 3 mL setiap tabung.
- f. Semua tabung ditutup dengan kasa, lalu dibungkus dengan koran
- g. Media yang sudah dituang kedalam tabung disterilkan menggunakan *autoclave* pada 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.
Media siap untuk digunakan.

4. *Simon Citrat* (SC)

- a. *Simon citrat* (SC) ditimbang sebanyak 2 gram.
- b. dilarutkan dengan 90 mL *aquadest* aduk hingga larut, kemudian dipanaskan diatas *hot plate* hingga larut sempurna.
- c. *Simon citrat* (SC) yang sudah larut ditunggu sampai suam-suam lalu di ukur pHnya 6,8 – 7,0 jika terlalu rendah teteskan NaOH 0,1 N, jika terlalu tinggi teteskan HCl 0,1 N dan tambahkan indikator *Brom Timol Blue* (BTB) 0,4% 0,1 mL (1:1)
- d. Dituang ke tabung reaksi sedang, kemudian ditutup bagian atas mulut tabung dengan bulatan kapas dan dibungkus dengan koran.
- e. Disterilkan menggunakan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C, dengan tekanan 1,5 atm.

- f. Miringkan tabung sampai terbentuk lereng saja.
- g. Media siap untuk digunakan.

5. *Triple Sugar Iron Agar (TSIA)*

- a. Media *Triple Sugar Iron Agar (TSIA)* ditimbang sebanyak 7,8 gram.
- b. Dilarutkan dengan 120 mL *aquadest* aduk hingga larut, kemudian dipanaskan diatas *hot plate* hingga larut sempurna.
- c. *Triple Sugar Iron Agar (TSIA)* yang sudah larut ditunggu sampai suam-suam lalu di ukur pHnya $7,4 \pm 0,2$ (7,2 – 7,6) jika terlalu tinggi teteskan HCl 0,1 N, jika terlalu rendah teteskan NaOH 0,1 N.
- d. Dituang ke tabung reaksi sedang, kemudian tutup bagian atas mulut tabung dengan bulatan kapas dan dibungkus dengan koran.
- e. Disterilkan menggunakan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C , dengan tekanan 1,5 atm.
- f. Miringkan tabung hingga terbentuk lereng dan dasar.
- g. Media siap untuk digunakan.

6. Bouillon

- a. Ditimbang komposisi pembuatan media bouillon yaitu, *Beef extract* 0,3 gram, *pepton from meat* 0,9 gram, NaCl 1% 0,5 gram.
- b. Semua komposisi yang telah ditimbang dicampur ke dalam *Erlenmeyer* lalu dilarutkan dengan *aquadest* 90 mL.
- c. Dipanaskan diatas *hot plate* hingga larut sempurna.
- d. Bouillon yang telah larut ditunggu hingga suam-suam lalu di ukur pHnya mencapai 6,8 – 7,2.

- e. Bouillon yang telah selesai dituang kedalam tabung, kemudian tuang masing-masing 3 mL setiap tabung.
- f. Semua tabung ditutup dengan kasa, lalu bungkus dengan koran
- g. Media yang sudah dituang kedalam tabung disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.
- h. Media siap digunakan.

7. Indol

- a. Media Air Pepton ditimbang sebanyak 2,3 gram.
- b. Dilarutkan dengan 90 mL *aquadest* aduk hingga larut, panaskan diatas *hot plate* hingga larut sempurna.
- c. Media indol yang sudah larut ditunggu sampai suam-suam lalu di ukur pHnya 7,0 – 7,4, jika terlalu tinggi teteskan HCl 0,1 N, jika terlalu rendah teteskan NaOH 0,1 N.
- d. Dituang ke tabung reaksi sedang, tutup bagian atas mulut tabung dengan bulatan kapas dan dibungkus dengan koran.
- e. Disterilkan menggunakan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C, dengan tekanan 1,5 atm.
- f. Media siap untuk digunakan.

8. Urea

- a. Ditimbang *Urea Agar Base* 2,1 gram lalu dilarutkan dalam 100 mL *aquadest*, di ukur pHnya 6,6 -7,0 lalu disterilkan,
- b. Ditimbang *Urea Harnstoof* 2 gram dilarutkan dalam 10 mL *aquadest* steril, dikerjakan dalam keadaan steril.
- c. Dicampurkan *Urea Harnstoof* kedalam *urea agar base* dalam keadaan steril.

- d. Masukkan kedalam tabung yang sudah steril dan dimiringkan hanya terdapat lereng.
- e. Media Urea memadat dan siap digunakan.

9. Motil

- a. Komposisi pembuatan motil ditimbang yaitu pepton from meat 0,5 gram, NaCl 0,5 gram, agar-agar 0,5 gram.
- b. Semua komposisi yang telah ditimbang dicampurkan ke dalam *Erlenmeyer* lalu dilarutkan dengan *aquadest* 90 mL.
- c. Dipanaskan diatas *hot plate* hingga larut sempurna.
- d. Motil yang telah larut ditunggu hingga suam-suam lalu di ukur pHnya mencapai $7,6 \pm 0,2$
- e. Dituang ke tabung reaksi sedang, tutup bagian atas mulut tabung dengan bulatan kapas dan dibungkus dengan koran.
- f. Sterilkan diautoclave selama 15 menit pada suhu 121°C , dengan tekanan 1,5 atm.
- g. Media siap untuk digunakan.

10. Gula-gula

Media gula-gula terdiri dari 5 macam yaitu: Glukosa, Sukrosa, Laktosa, Maltosa, Manosa.

- a. Ditimbang komposisi Air pepton sebanyak 11,5 gram kemudian larutkan dalam 450 mL *aquadest*.
- b. Ditimbang masing-masing media gula-gula sebanyak 0,9 gram.
- c. Masing-masing media gula-gula dilarutkan dalam 90 mL air pepton, kemudian ditambahkan 0,1 mL BTB 0,4% lalu dihomogenkan.

- d. Dididihkan diatas *Hot plate* sampai larut sempurna.
- e. Ditunggu sampai suam-suam kuku lalu di ukur pHnya sampai $7,2\pm 0,2$, jika terlalu tinggi teteskan HCl 0,1 N, jika terlalu rendah teteskan NaOH 0,1 N.
- f. Tabung gula-gula yang telah di isi tabung durham disiapkan sejumlah yang dibutuhkan.
- g. Masing-masing media gula-gula dimasukkan kedalam tabung tersebut, kemudian beri tutup sesuai dengan warna.
- h. Disterilkan menggunakan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C , dengan tekanan 1,5 atm.
- i. Media siap untuk digunakan.

3.6.2 Penanaman pada Media Pemupuk

3.6.2.1 Alat

Pada penanaman media pemupuk alat yang digunakan yaitu :

- a. Tabung
- b. pipet ukur 10 mL
- c. *Incubator*
- d. Filler
- e. kain kasa
- f. kapas

3.6.2.2 Bahan

Bahan untuk media pemupuk yang digunakan yaitu :

- a. Bouillon
- b. Petis ikan tongkol.

3.6.2.3 Prosedur

- a. Ditimbang 1 gr sampel petis.
- b. Dimasukkan ke dalam media bouillon
- c. Diinkubasi di *incubator* pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.6.3 Penanaman pada Media *Eosin Methylene Blue* (EMB)

3.6.3.1 Alat

Pada penanaman media *Eosin Methylene Blue* (EMB) alat yang digunakan yaitu :

- a. Petridish
- b. ose bulat
- c. *Incubator*.

3.6.3.2 Bahan

Pada penanaman media *Eosin Methylene Blue* (EMB) bahan yang digunakan yaitu :

- a. *Eosin Methylene Blue* (EMB)
- b. Sampel petis ikan tongkol

3.6.3.3 Prosedur

Penanaman pada media *Eosin Methylene Blue* (EMB) menurut Sugianto,(2012) yaitu :

- a. Sampel petis ikan tongkol pada media bouillon dipersiapkan.
- b. Ose bulat dipijarkan sampai merah membara kemudian dinginkan
- c. Ose bulat dicelupkan ke dalam media bouillon yang telah diinkubasi, kemudian digoreskan ose pada media *Eosin Methylene Blue* (EMB) dengan strike T (streil).
- d. Dipanaskan kembali ose bulat lalu dinginkan
- e. Media *Eosin Methylene Blue* (EMB) yang telah ditanami kuman diinkubasi pada suhu 37 ° C selama 24 jam.

3.6.4 Penanaman pada Media Biokimia Reaksi

3.6.4.1 Alat

Pada penanaman media biokimia reaksi alat yang digunakan yaitu :

- | | |
|------------------|---------------------|
| a. Tabung reaksi | c. Ose jarum |
| b. Ose bulat | d. <i>Incubator</i> |

3.6.4.2 Bahan

Pada penanaman media biokimia reaksi bahan yang dibutuhkan yaitu :

- | | |
|-------------------------------|------------------------------|
| a. Media gula-gula | e. <i>Simon citrate</i> (SC) |
| b. Indol | f. Urea |
| c. <i>Metil red</i> (MR) | g. Motil. |
| d. <i>Voges prosteur</i> (VP) | |

3.6.4.3 Prosedur

Penanaman pada media biokimia reaksi menurut Label J,(2010) yaitu :

- Indol :koloni bakteri yang diambil akan dieramkan dalam medium air pepton. Yang mengandung asam tryptophan dan kemudian diinkubasi selama semalam dalam suhu 37°C.
- Metil Red* (MR) :bakteri akan diinokulasi dalam medium glucose phosphate broth, yang mengandung glukosa dan buffer phospat yang kemudian diinkubasi dalam suhu 37 ° C selama 48 jam.
- Voges proskauer* (VP) : bakteri yang hendak di tes akan di inokulasi kedalam glucosa peptone broth, diinkubasi dalam suhu 37 ° C selama 48 jam.
- Simon Citrate* (SC) : koloni bakteri diinokulasi kedalam medium biakan Simmon Citrat Agar dan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37 ° C. Jika

bakteri yang diuji dapat menggunakan sitrat maka medium akan berubah warna dari hijau ke biru.

- e. Gula-gula : koloni bakteri yang diambil akan dieramkan dalam medium gula-gula. Yang digunakan untuk mengetahui kemampuan kemampuan kuman dalam memfermentasi, dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
- f. *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) : koloni bakteri yang diambil akan dieramkan dalam medium yang mengandung Glukosa, Sukrosa, dan laktosa, dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
- g. Motil : pada area yang ditusuk akan terdapat kabut.

3.6.5 Uji Penegasan

3.6.5.1 Alat

Pada uji penegasan alat yang digunakan yaitu :

pipet Pasteur.

3.6.5.2 Bahan

Pada uji penegasan bahan yang digunakan yaitu :

- a. Kovac
- b. *Metil Red*
- c. KOH 40%
- d. alpha-naphthol 5 %.

3.6.5.3 Prosedur

Pada uji penegasan menggunakan langkah kerja menurut Label J,(2010) yaitu :

- a. Indol atau air pepton :Setalah diinkubasi tambahkan 3 tetes reagen Kovac's kedalam medium air pepton. Reagen Kovac's mengandung para-

dimethyl aminobenzaldehyde, isoamyl alcohol dan con. HCl. Reagen Erlich lebih sensitif dalam mendeteksi produksi indole dalam lingkungan anaerob. Formasi cincin merah yang terbentuk memberikan hasil positif dalam tes.

- b. *Methyl Red* (MR) : Untuk mengetahui PH dalam medium maka ditambahkan 3 tetes reagen MR. Jika berubah warna menjadi merah maka hasil menunjukkan positif.
- c. *Voges proskauer* (VP) : teteskan 4 tetes KOH 40 % kedalam medium tersebut dan dikocok dan 12 tetes reagen alpha-naphthol 5 %. Warna merah yang terjadi menunjukkan hasil tes yang positif.
- d. *Simon citrate* (SC) : apabila positif warna dari *Simon citrate* (SC) warna media yang berwarna hijau akan berubah menjadi biru tua.
- e. *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) : pada reaksi positif bakteri *Escherichia coli* dapat memfermentasi karbohidrat hasilnya berwarna kuning pada bagian lereng maupun dasar dan bagian dasar akan ada warna hitam karena bakteri *Escherichia coli* memproduksi H₂S dan terbentuk gas bagian dasar.
- f. Gula-gula : pada media gula-gula apabila positif mengandung bakteri *Escherichia coli* pada media Glukosa, Sukrosa, Laktosa, Maltosa, Manos akan berubah warna dari biru kehijauan menjadi kuning.
- g. Motil : pada media motil apabila positif akan ada berka atau kabut putih disekitar tusukan (Label J, 2010).

3.7 Tabulasi Data

Data hasil penelitian yang diperoleh, dapat ditabulasikan seperti Tabel 3.1 dibawah ini

Tabel 3.1 Contoh tabulasi hasil pemeriksaan ada atau tidaknya bakteri *Escherichia coli* pada berbagai macam petis ikan tongkol pada pemeriksaan uji biokimia reaksi.

No	Kode Sampel	Hasil	
		Positif (+)	Negatif (-)
1	A		
2	B		
3	C		
4	D		
5	E		
↓			
30	DD		

3.8 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian bakteri *Escherichia coli* kemudian ditabulasikan dalam bentuk tabel dan disajikan secara persentase (%).