

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian *Ex Post Facto* dengan metode deskriptif. Penelitian ini dilakukan dengan pemeriksaan laboratorium terhadap total *coliform* dengan metode MPN (*Most Probable Number*) pada objek teliti ikan Betok (*Anabas testudineus* Bloch) dan metode Angka Lempeng Total (ALT) untuk total bakteri serta data yang didapat selanjutnya dianalisis berdasarkan literatur.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 7 bulan yaitu dari bulan Desember 2014 sampai dengan bulan Juni 2015. Tempat penelitian adalah di Kali Kepiting Sutorejo Kota Surabaya untuk pengambilan ikan Betok (*Anabas testudineus* Bloch), kemudian di Laboratorium Biologi UM Surabaya untuk pengambilan daging ikan Betok, selanjutnya dilakukan pemeriksaan kualitas di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Kota Surabaya (Provinsi) dan di Laboratorium Kesehatan Dinas Kesehatan Surabaya (Kota).

C. Subjek dan Objek Penelitian

Subjek penelitian adalah total bakteri dan bakteri *coliform* yang berada dalam ikan Betok (*Anabas testudineus* Bloch), sedangkan objek penelitian adalah ikan Betok (*Anabas testudineus* Bloch) yang berasal dari

Kali Sutorejo Surabaya dari 3 titik kali, yaitu dari titik 0 meter (lampu merah Mulyorejo), 650 meter berikutnya (depan kampus Universitas Muhammadiyah Surabaya) dan 1300 meter (depan pasar Kalisari). (Peta Lokasi Titik Sampling Terlampir).

Objek teliti ikan yang tertangkap di setiap lokasi segera dimasukkan ke dalam ember, objek teliti diperoleh dengan cara memancing dan membeli pada orang yang telah menangkap ikan Betok. Ukuran panjang ikan yang akan digunakan sebagai objek teliti 10-15 cm yang sesuai dengan ukuran ikan konsumsi. Objek teliti ditransportasikan ke laboratorium yang sudah dipersiapkan sebelumnya.

D. Teknik Pengumpulan Data dan Instrumen Penelitian

1. Teknik Pengumpulan Data

Pengumpulan data bertujuan untuk mendapatkan data-data yang diperlukan untuk keperluan penelitian. Data-data yang diambil terdiri dari :

- a. Mengunjungi dan mengobservasi Kali Kepiting Sutorejo Kota Surabaya untuk melakukan penelitian.
- b. Pengambilan objek teliti ikan Betok yang berada di Kali Kepiting Sutorejo Surabaya yaitu dari 3 titik kali, yaitu dari A; titik 0 meter (lampu merah mulyorejo), B; 650 meter berikutnya (depan kampus Universitas Muhammadiyah Surabaya) dan C; 1300 meter berikutnya (depan pasar kalisari) dengan pada tahap pertama (ALT dan MPN), masing-masing titik diambil ikan Betok sebanyak 10 ekor dengan total semua menjadi 30 ekor ikan Betok. Sedangkan pada tahap kedua (Uji

penegasan *E.coli*), masing-masing titik diambil ikan Betok sebanyak 5 ekor dengan total semua menjadi 15 ekor ikan Betok. Berikut foto lokasi pengambilan objek teliti :



(A)



(B)



(C)

Gambar 3.1. Lokasi Pengambilan Objek Teliti

Keterangan : (A) titik 0 meter (lampu merah mulyorejo)
(B) 650 meter berikutnya (depan kampus UM Surabaya)
(C) 1300 meter berikutnya (depan pasar kalisari)

- c. Pemeriksaan Total Bakteri dan *coliform* pada objek teliti ikan Betok (*Anabas testudineus* Bloch) Di Kali Kepiting Sutorejo Surabaya di laboratorium.

2. Instrumen Penelitian

a. Alat-alat penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah alat pancing ikan, *petridish*, pinset steril, timbangan elektrik, kamera, masker, jas lab, sensi glove, autoklaf, inkubator, *laminair air flow*, kertas payung, lumpang alu, blender, kapas, kulkas, ember, cawan perti, timbangan digital, penggaris, pisau, gelas beker, kompor (alat pemanas), erlenmeyer, tabung reaksi, lampu bunsen, rak tabung reaksi, *adjustable pipet*, tip, stirer, alat *colony counter*, *waterbath*, jarum ose, mikroskop, gelas benda, gelas penutup, *sentrifuse*, alat destilasi, buret, gelas ukur, cawan porselin, pipet tetes, dan kertas saring.

b. Bahan-Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan adalah objek teliti ikan Betok, medium *Plate Count Agar* (PCA), aquadest, medium *Lauryl Tryptose Broth* (LTB), medium *Brilliant Green Lactose Bile* (BGLB), medium *Eosin Mtehylen Blue Agar* (EMBA), medium *Brain Heart Infusion* (BHI) *Tryptone Broth*, Reagen Ehrlich, medium MRVP Broth, *Methylen Red*, KOH, Alfanaptol, medium *Simmon Citrat Agar*, *Alkaline Pepton Water* (APW), larutan H₂O₂, medium *Thiosulfate Citrate Bile Saccharose* (TCBS), larutan cat gram A (larutan Cat *Hucker's Crystal Violet*), larutan cat gram B (larutan *Lugol's Iodin*), larutan cat gram C (larutan *Aceton alkohol*), larutan cat gram D (larutan

Cat Safarin), larutan TCA 5%, NaOH 2 M, NaOH 0,01 M, dan HCl 0,01 M, dan indikator PP.

c. Metode Pemeriksaan

Pemeriksaan bakteri menggunakan metode ALT (Angka Lempeng Total) dan Metode MPN (*Most Probable Number*).

E. Prosedur Penelitian

Penelitian yang dilakukan terdiri dari beberapa tahap, yaitu diawali dengan tahap persiapan, kemudian analisis mikrobiologis yang meliputi 1. uji Angka Lempeng Total (ALT) ; 2. uji MPN *Coliform* yang meliputi uji Pendugaan *Coliform*, dan uji Penegasan *Escherichia coli*.

a. Persiapan uji ALT dan MPN

1) Pengambilan objek teliti ikan betok.

Objek teliti ikan betok diambil dari Kali Kepiting Sutorejo Surabaya dengan masing-masing titik lokasi sampling 10 ekor dengan total 30 ekor ikan.

2) Mensterilasi alat yang digunakan yaitu blender dan cawan petri dengan menyemprotkan alkohol 70%.

3) Memblender ikan betok hingga halus 2-3 menit, masing-masing 10 ekor dengan mengambil dagingnya hingga 20 gr dan ditambahkan aquadest 200 ml sehingga diperoleh pengenceran (Homogenat) 10^{-1} dan disimpan dalam lemari es, kemudian ditransportasikan ke Balai Besar Laboratorium Kesehatan Kota Surabaya (Provinsi) dalam waktu kurang dari 24 jam serta di uji dengan pengujian analisis mikrobiologi.

b. Persiapan uji penegasan *Escherichia coli*

- 1) Pengambilan objek teliti ikan betok.

Objek teliti ikan betok diambil dari Kali Kepiting Sutorejo Surabaya dengan masing-masing titik lokasi sampling 5 ekor dengan total 15 ekor ikan.

- 2) Mensterilasi alat yang digunakan yaitu blender dan cawan petri serta lumpang alu dengan menyemprotkan alkohol 70%.

Memblender ikan betok masing-masing 5 ekor dengan mengambil dagingnya hingga 30 gr hingga halus 2-3 menit kemudian dihaluskan lagi dengan lumpang alu, kemudian ditransportasikan ke Laboratium Kesehatan Dinas Kesehatan Surabaya (Kota) dalam waktu kurang dari 24 jam serta di uji dengan pengujian analisis mikrobiologi.

c. Pemeriksaan bakteri dengan metode ALT (Angka Lempeng Total)

Prosedur Pengujian Mikrobiologi sesuai dengan petunjuk Standar Nasional Indonesia (SNI) 01-2332.3-2006 tentang Cara Uji Mikrobiologi- Bagian 3 : Penentuan Angka Lempeng Total (ALT) pada produk perikanan adalah sebagai berikut :

- 1) Ambil 1 ml homogenant yang sebelumnya sudah dipersiapkan dan masukkan ke dalam 9 ml larutan *Butterfield's phosphate buffered* untuk mendapatkan larutan pengenceran 10^{-2} .
- 2) Lakukan hal yang sama seperti di atas untuk mendapatkan larutan pengenceran 10^{-3} .

- 3) Pipet 1 ml dari setiap pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , dst dan masukkan ke dalam cawan petri steril. Lakukan secara duplo untuk setiap pengenceran.
- 4) Tambahkan 12-15 ml PCA yang sudah didinginkan dalam *waterbath* hingga mencapai suhu $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ke dalam masing-masing cawan yang sudah berisi contoh. Supaya contoh dan media PCA tercampur sempurna lakukan pemutaran cawan ke depan ke belakang dan ke kiri ke kanan.
- 5) Setelah agar menjadi padat, untuk menentukan mikroorganisme *aerob* inkubasi cawan-cawan tersebut dalam posisi terbalik dalam inkubator selama $48 \text{ jam} \pm 2 \text{ jam}$ pada suhu 35°C .
- 6) Pembacaan dan perhitungan koloni pada cawan petri dengan menggunakan *colony counter*.

a) Pembacaan dan Perhitungan Koloni

Jika cawan yang mengandung jumlah 25 koloni – 250 koloni dan bebas *spreader*, maka catat pengenceran yang digunakan dan hitung jumlah total koloni. Perhitungan Angka Lempeng Total sebagai berikut :

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)] \times (d)}$$

Keterangan :

N = jumlah koloni produk, dinyatakan dalam koloni per ml atau koloni per gr;

$\sum C$ = jumlah koloni pada semua cawan yang dihitung;

n_1 = jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung;

n_2 = jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung;

d = pengenceran pertama yang dihitung.

Bila jumlah koloni per cawan lebih besar dari 250 pada seluruh pengenceran maka laporkan hasilnya sebagai terlalu banyak untuk dihitung (TBUD), tetapi jika salah satu pengenceran mempunyai jumlah koloni mendekati 250 laporkan sebagai perkiraan ALT.

Koloni *spreader* dibedakan menjadi 3 tipe :

- (1) Rantai koloni, antara koloni saling menyambung yang disebabkan karena bakteri yang saling mengelompok
- (2) *Spreader* berasal dari lapisan air antara agar dan dasar cawan
- (3) *Spreader* berasal dari lapisan air pada sisi/pinggir cawan atau pada permukaan agar.
 - (a) Jika cawan ditumbuhi *spreader* lebih besar dari 25% maka laporkan sebagai *spreader*.
 - (b) *Spreader* tipe 1, jika hanya ada 1 rantai maka nyatakan sebagai 1 koloni.
 - (c) Jika 1 atau lebih rantai terlihat berasal dari sumber yang berbeda, laporkan masing-masing sumber sebagai 1 koloni.
 - (d) *Spreader* tipe 2 dan 3 umumnya berasal dari koloni yang berbeda dan laporkan masing-masing sebagai 1 koloni.
- (4) Jumlahkan *spreader* dan koloni untuk menghitung "Angka Lempeng Total.

d. Pemeriksaan bakteri dengan metode MPN (*Most Probable Number*)

Metode ini merupakan metode pemeriksaan yang dilakukan untuk menghitung jumlah mikroba di dalam objek teliti berbentuk cair ataupun padat dengan terlebih dahulu membuat suspensi 1:10 dari objek teliti tersebut. Untuk pemeriksaan bakteri *Escherichia coli* dapat dilakukan melalui dua tahap yaitu uji penduga Coliform dan uji penegasan adanya *Escherichia coli* (Fardiaz, 1993 dalam Raza, 2012).

1) Uji Penduga Coliform

Untuk mengerjakan satu objek teliti menurut Fardiaz (1993) dalam Raza (2012), terlebih dahulu dibuat suspensi 1:10 yaitu objek teliti ditimbang 10 gram dan selanjutnya digerus dan ditambahkan 90 ml NaCl fisiologis. Setelah dilakukan pengenceran 10^{-1} , langkah selanjutnya dalam membuat pengenceran 10^{-2} dengan mengambil 1 ml dari pengenceran 10^{-1} lalu dimasukkan pada 9 ml NaCl fisiologis. Dari pengenceran 10^{-2} dibuat pengenceran 10^{-3} dengan mengambil 1 ml dari pengenceran 10^{-2} dan dimasukkan ke dalam 9 ml NaCl fisiologis.

Langkah selanjutnya dilakukan uji pembiakan *Coliform* dengan menggunakan seri sembilan tabung. Setiap tabung reaksi dimasukkan 10 ml BGLB cair dan setiap tabung dimasukkan tabung Durham dengan posisi terbalik. Selanjutnya masukkan 1 ml objek teliti ke dalam 3 tabung pertama dari pengenceran 10^{-1} , 1 ml objek teliti ke dalam 3 tabung kedua dari pengenceran 10^{-2} dan 1 ml ke dalam tiga tabung ketiga dari pengenceran 10^{-3} . Setelah itu, diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C dan diamati tertangkap atau tidaknya gas dalam

tabung Durham. Jika terdapat gas atau keruh, maka diduga terdapat *Coliform* pada tabung.

2) Uji Penegasan *Escherichia coli*

Berdasarkan metode yang diterapkan oleh pihak Laboratorium Kesehatan Dinas Kesehatan Surabaya (Kota) adalah sebagai berikut :

- a) Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan yang sudah steril.
- b) Memasukkan media BHI ke 9 tabung reaksi yang sudah diberi kode objek teliti, dengan masing-masing tabung reaksi diisi sebanyak 10 ml BHI.
- c) Menimbang objek teliti ikan yang sudah disiapkan, yakni masing-masing objek teliti (30 gram), dibagi menjadi 3 bagian dengan masing-masing bagian menjadi 10 gram, sehingga diperoleh 9 objek teliti ikan.
- d) Memasukan masing-masing objek teliti ikan ke 9 tabung reaksi yang sebelumnya berisi 10 ml BHI, kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37⁰ C.
- e) Setelah diinkubasi, maka masing-masing biakan tersebut, ditanam ke media EMBA dengan menggunakan jarum ose dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- f) Kemudian Hasil positif yang menandakan koloni *Escherichia coli* ditandai dengan diameter koloni 2-3 mm, koloni hijau metalik, dan bagian pusat koloninya tampak ungu gelap.

g) Perhitungan MPN mikroba

Berdasarkan kombinasi hasil positif yang diperoleh, selanjutnya disesuaikan dengan nilai MPN pada tabel MPN seri sembilan tabung. Untuk menghitung MPN dapat menggunakan rumus menurut Fardiaz (1993) yaitu :

$$\text{MPN mikroba} = \text{Nilai MPN} \times \frac{1}{\text{Pengenceran tabung yang ditengah}}$$

Data hasil perhitungan jumlah cemaran bakteri *Escherichia coli* disajikan secara deskriptif.

F. Teknik Analisis Data

Kualitas mikrobiologis Ikan Betok (*Anabas testudineus* Bloch) dianalisis secara deskriptif dengan mengacu pada tabel Persyaratan Standar Mutu Ikan Segar SNI (7388 : 2009).