

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan metode deskriptif, yaitu untuk mengetahui ada atau tidaknya kandungan *Escherichia coli* pada susu kedelai yang dijual di area jalan Sutorejo Surabaya.

3.2. Populasi dan Sampel

3.2.1. Populasi

Populasi penelitian ini adalah susu kedelai yang diambil dari tiga (3) penjual susu kedelai di area jalan Sutorejo Surabaya, yaitu susu kedelai yang dikemas dalam botol yang tidak bermerek dari hasil produksi perorangan, bukan pabrik.

3.2.2. Sampel

Sampel yang akan diperiksa sebanyak tiga puluh (30) botol susu kedelai yang diambil dari tiga (3) penjual susu kedelai, yang masing – masing penjual diambil sepuluh (10) botol susu kedelai dan diberi label dari masing – masing penjual tersebut.

3.3. Lokasi dan waktu Penelitian

Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Balai Riset Standarisasi Industri Surabaya, waktu penelitian dilakukan mulai bulan Mei sampai dengan bulan Juni 2013.

3.4. Tahapan Penelitian

3.4.1. Pemeriksaan *Escherichia coli* Metode APM (Angka Paling Mungkin)

1. Prinsip

Pertumbuhan *Escherichia coli* yang ditandai oleh terbentuknya gas di dalam tabung durham setelah diinkubasikan dalam pembenihan yang cocok pada suhu 44⁰ C selama 24 sampai 48 jam, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada table APM.

2. Alat

- a. Alat homogenisasi (blender)
- b. Penangas air 44⁰-45⁰C
- c. Incubator 36 ± 1⁰C
- d. Pipet ukur 1 ml, 10 ml
- e. Sengkelit (ose)
- f. Labu Erlenmeyer
- g. Tabung reaksi (150 x 15 mm)

3. Bahan dan Media

a. Bahan

Susu kedelai

b. Media

1. *Escherichia Coll Broth (EC Broth)*
2. *Brilliant Green Lactose Bile (BGLB) Broth 2%*
3. *Mac Conkey Broth*
4. *Eosin Methylene Blue (EMB) Agar*

5. *Violet Red-Bile Agar (VRBA)*
6. *Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP) Medium*
7. *Trypton Broth*
8. *Simmons Citrate Agar atau Koser Citrat*
9. *Nutrien Agar (Agar-agar)*

c. **Pereaksi**

1. *Pereaksi Kovacs*
2. *Larutan Methyl Red*
3. *Pereaksi Voges Proskauer*
4. *Pereaksi untuk pewarna Gram*
5. *Pereaksi Indole*
6. *Larutan alfa-naftol*
7. *Larutan kalium hidroksida 40%*
8. *Koser's Citrat medium*

4. **Prosedur Pemeriksaan *Escherichia coli***

- a. Masukkan satu (1) sengkeli (1 loopful) biakan yang positif gas pada LST (*Lauryl Sulfate Tryptose*) Broth dari pengujian angka paling mungkin bakteri coliform ke dalam tabung berisi *EC broth* yang di dalamnya terdapat tabung durham terbalik.
- b. Inkubasi dalam penangas air pada suhu 44-45⁰C selama 24-48 jam.
- c. Catat tabung yang di dalamnya terbentuk gas (*Escherichia Coli* dianggap positif jika di dalam tabung durham terbentuk gas).

- d. Lanjutkan penetapan *Escherichia coli* dengan menginokulasikan biakan yang membentuk gas ke perbenihan EMB atau VRBA dalam cawan petri.
- e. Inkubasi pada suhu 35⁰C selama 18-24 jam.
- f. Pilih koloni berwarna merah gelap *Violet Red Bile Agar* (VRBA), yang berdiameter 0.5 mm atau lebih, atau koloni berwarna kilap logam (EMB) dan inokulasikan pada *nutrient agar* miring dalam tabung, inkubasi pada suhu 35⁰C selama 18-24 jam, dan pada waktu yang sama lakukan pewarnaan gram sebagai berikut :

Buat sediaan di atas kaca alas. Keringkan di udara dan fiksasikan dengan panas. Warnai sediaan dengan larutan *crystal violet – ammonium oxalate* selama 1 menit. Cuci dengan air dan tiriskan. Bubuhkan larutan *Lugol (Gram's Iodine)* selama 1 menit. Cuci dengan air kran dan tiriskan. Cuci (hilangkan warna) dengan alcohol 95% selama 30 detik. cuci dengan air kran, tiriskan dan bubuhkan *Hucker's counterstain* (larutan safranin) selama 10-30 detik. Cuci dengan air kran, tiriskan, serap dengan kertas saring, kerinkan dan periksa di bawah mikroskop.
- g. Lakukan pengujian IMVIC (*Indol Merah metal Vogel Proskauer dan Citrat*) dari biakan nutrient agar pada butir f (SNI ssn-012887-1992 Dep.perind 0-5-n, Jakarta 1994).

3.4.2. Pengujian IMVIC (*Indol Merah metal Vogel Proskauer dan Citrat*)

1. Uji Indol

Dari biakan murni *nutrient agar miring*, inokulasikan 1 sengkeli biakan ke dalam *tryptone broth*. Inkubasikan pada suhu 35 \pm 1⁰C, selama 18-

24 jam. Tambahkan 0,2-0,3 ml pereaksi Indol ke dalam masing-masing tabung dan kocok selama 10 menit. Warna merah tua pada permukaan menunjukkan reaksi Indol positif. Warna jingga menunjukkan reaksi Indole negative.

2. Uji Merah Metil (Methyl Red)

Dari biakan murni *nutrient agar* miring, inokulasikan 1 sengkeli biakan ke dalam perbenihan MR-VP. Inkubasikan pada suhu 35⁰C selama 24 jam. Dengan menggunakan pipet, pindahkan 5 ml ke dalam tabung reaksi, tambahkan 5 tetes merah metal dan kocok. Warna kuning menunjukkan reaksi negative, dan warna merah menunjukkan reaksi positif.

3. Uji VP (*Voges Proskauer*)

Dari biakan murni *Nutrient agar* miring, inokulasikan 1 sengkeli biakan kedalam perbenihan MR – VP. Inkubasikan pada suhu 36 ± 1⁰ C, selama 48 jam. Dengan menggunakan pipet, pindahkan 1 ml suspensi ke dalam tabung, tambahkan 0,5 larutan alfa naftol dan 0,2 ml larutan kalium hidroksida dan kocok. Diamkan 2 – 4 jam. Warna merah muda hingga merah tua menunjukkan reaksi positif, warna tidak berubah menunjukkan reaksi negative.

4. Uji Sitrat

Dari biakan murni nutrient agar miring inokulasikan 1 sengkeli biakan ke dalam pembenihan *Simmon citrate* atau *Koser's citrate*. Inkubasikan pada suhu 35⁰ C selama 48 – 96 jam. Warna biru menunjukkan reaksi positif, warna hijau menunjukkan reaksi negative (pada perbenihan Simmon sitrat)

dan adanya kekeruhan pada perbenihan *Koser's citrate* menunjukkan reaksi positif (+).

3.4.3. Hasil dinyatakan sebagai berikut

1. Amati terbentuk tidaknya gas dalam tabung durham. Jika terbentuk gas, dengan menunjukkan ke Tabel Angka Paling Mungkin (tabel II), dapat dinyatakan Angka Paling Mungkin (APM) *Escherichia coli*.
2. Tegaskan hasil uji pewarnaan Gram dan reaksi biokimia. Jika pewarnaan Gram menunjukkan adanya bakteri berbentuk batang dan warna merah muda (gram negative), serta reaksi biokimia menunjukkan uji indol dan merah metal positif, dan uji VP serta uji sitrat negative, dan dapat dinyatakan penegasan adanya *Escherichia coli*.
3. Hitung APM *Escherichia coli* per gram atau milliliter contoh dengan menggunakan tabel II (Baristan, 2013).

3.4.4. Metode Penyaringan (Membran Filter)

Untuk contoh air minum dan air minum dalam kemasan (air yang telah diproses).

1. Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada membrane penyaring setelah diinkubasi pada suhu 44 – 45⁰C dalam media yang sesuai yang dilanjutkan dengan uji penegasan.

2. Alat

Sama seperti pada 3.4.1

3. Media dan Preaksi

- a. M – FC medium atau M – Fc agar

b. Media dan pereaksi pada IMVIC (3.4.2).

4. Prosedur

1. Isolasi *Escherichia coli*

- a. Pasang peralatan penyaringan (filtration unit) dan kerjakan seperti pada butir 1.2.4.
- b. Saring sebanyak 100 ml cuplikan (contoh) melalui membrane penyaring yang diletakkan pada alat penyaringan.
- c. Angkat secara aseptik membrane penyaring dengan menggunakan pinset (forcep) steril.
- d. Letakkan membrane penyaring di atas bantalan (pad) yang telah dijenuhkan dengan 2 ml perbenihan M – FC broth atau di atas perbenihan M – FC Agar dalam cawan petri.
- e. Hitung koloni *Escherichia coli* (yang terbentuk pada membrane penyaring) yang berwarna biru; bakteri bukan *Escherichia coli* berwarna abu-abu sampai krim.

2. Uji Penegasan

Lakukan uji penegasan *Escherichia coli* dengan uji IMVIC seperti diuraikan pada 3.4.2 dari koloni yang terbentuk pada membrane penyaring.

3. Perhitungan

Hitung jumlah *Escherichia coli* dalam contoh setelah uji penegasan dengan rumus (Baristan, 2013).

$$E.coli / 100 = \frac{\text{koloni pada membran} \times 100}{100 \text{ ml contoh yang diperiksa / disaring}}$$

3.5. Variabel Penelitian dan Definisi operasional

3.5.1. Variabel Penelitian

Kandungan *Escherichia coli* yang diperiksa pada sampel susu kedelai yang dijual di area jalan Sutorejo Surabaya.

3.5.2. Definisi operasional

Kandungan *Escherichia coli* dalam penelitian ini diukur berdasarkan positif, (+) : ada kandungan *Escherichia coli* dan negative, (-) : tidak ada kandungan *Escherichia coli* pada setiap sampel susu kedelai.

3.6. Metode Pengumpulan data

3.6.1. Persiapan sampel

Sampel diambil dari tiga (3) penjual susu kedelai yang masing – masing penjual diambil sebanyak sepuluh (10) sampel, sehingga total sampel keseluruhan adalah tiga puluh (30) sampel.

3.6.2. Pengumpulan data

Data diperoleh dari hasil pemeriksaan pada sampel susu kedelai yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Balai Riset Standarisasi Industri Surabaya.

3.6.3. Tabulasi Data

Data hasil pemeriksaan ditabulasikan sebagai berikut :

Table 3.1 Hasil Pemeriksaan *Escherichia coli* pada susu kedelai

No.	Kode Sampel	Tanggal Pemeriksaan	Hasil Pemeriksaan <i>Escherichia coli</i>	
			Positif (+)	Negatif (-)
1.				
2.				
3.				
4.				
5.				
↓				
30.				
Jumlah				

3.7. Teknik analisis data

Teknik analisis data pada penelitian ini adalah, Nominal karena data yang diperoleh berupa keterangan, yaitu ada atau tidaknya kuman *Escherichia coli* pada susu kedelai, yang di bandingkan dengan Standart Nasional Indonesia (SNI), maka dicari persentase susu kedelai yang memenuhi syarat (MS), dan tidak memenuhi syarat (TMS).