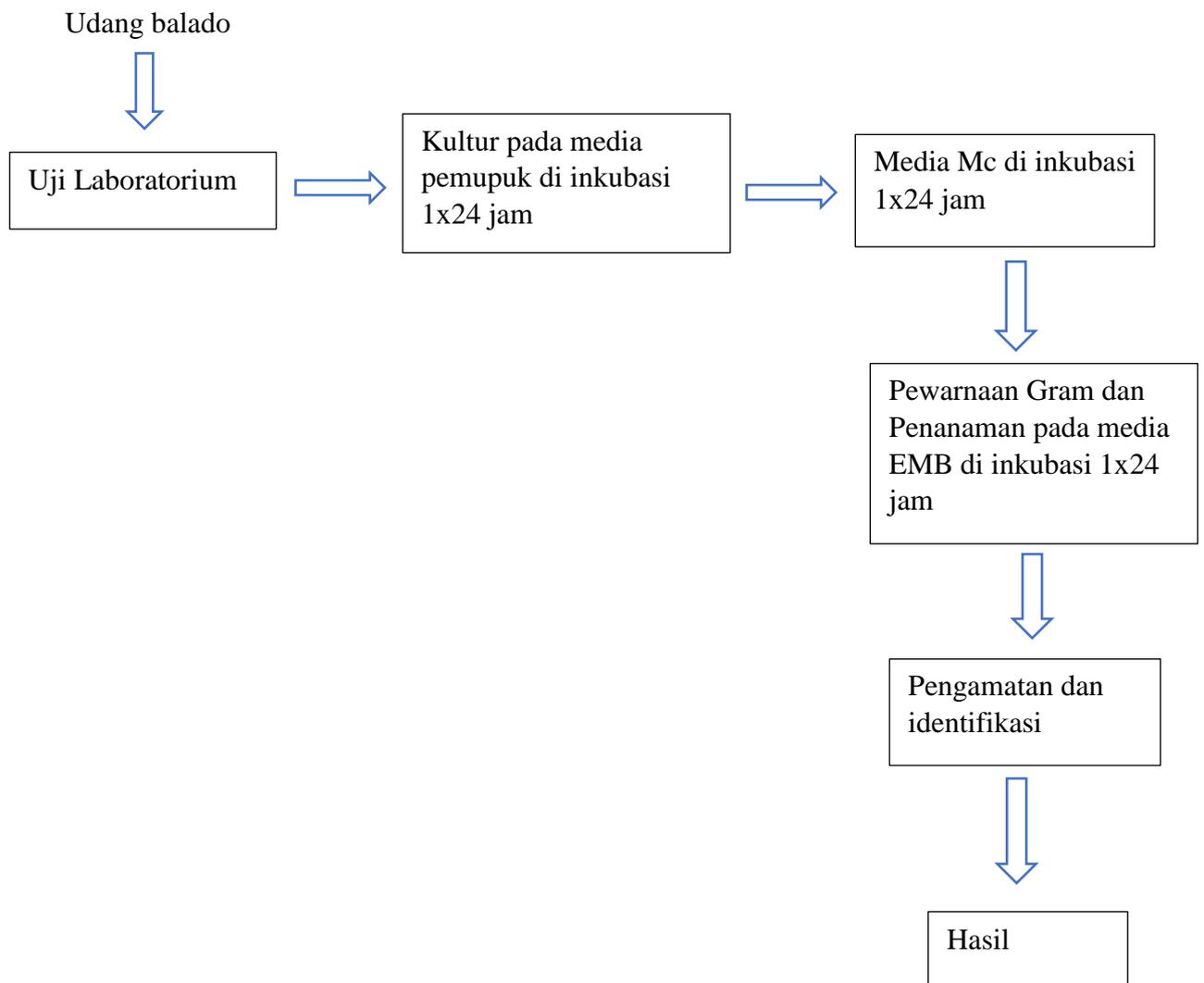


BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Atau Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif kualitatif.

Rancangan sampel penelitian udang balado



3.2 Populasi Dan Sampel

3.2.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah 3 rumah makan padang di daerah Mulyosari

3.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah udang balado sebanyak 30 sampel yang di ambil dari 3 rumah makan padang daerah Mulyosari

3.2.3 Teknik Sampling

Teknik sampling yang digunakan pada penelitian ini adalah purposive sampling (purposive sampling adalah metodologi pengambilan sampel secara acak dimana kelompok sampel telah dipilih dan sudah memenuhi kriteria khusus untuk bahan penelitian yang dibutuhkan bagi peneliti).

3.3 Lokasi Dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi D3 Teknologi Laboratorium Medis Universitas Muhammadiyah Surabaya

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2022 sampai akhir bulan Juni 2023

3.4 Variabel Dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel penelitian adalah ada tidaknya kontaminasi bakteri *Escherichia coli* pada udang balado yang dijual di rumah makan padang didaerah Mulyosari

3.4.2 Definisi Operasional

Bakteri *Escherichia coli* bisa menjadi patogen atau bisa menyebabkan penyakit jika jumlahnya melebihi dari normal tujuan penelitian ini untuk Mengidentifikasi bakteri *Escherichia coli* pada udang balado yang dijual di rumah makan padang di daerah mulyosari.

Dengan kategori sebagai berikut:

1. Pada Media *Bouillon*

(+) Media akan berubah menjadi keruh

(-) Media tidak akan berubah menjadi keruh

2. Pada Media *Mac Conkey Agar*

(+) Media akan berubah warna menjadi merah muda karena bakteri dapat memfermentasi laktosa menjadi asam dengan adanya indikator netral red

(-) Media akan berubah warna menjadi kuning karena bakteri tidak memfermentasi laktosa

3. Pada Media *Eosin Methylene Blue Agar*

(+) Menghasilkan warna hijau metalik karena bakteri tersebut memfermentasi laktosa

(-) Media akan berwarna coklat karena bakteri tersebut tidak memfermentasi laktosa

3.5 Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data dilakukan dengan kultur pada media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMB) dan pada media akan berubah warna menjadi hijau metalik jika hasil positif karena bakteri *Escherichia coli* dapat memfermentasi laktosa yang mengakibatkan peningkatan kadar asam dalam media.

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yang harus steril adalah Tabung Lb1, Gelas arloji, Spatula atau batang pengaduk, cawan Petri, Gelas ukur 100 ml, *Beaker glass*, Erlenmeyer, Mortar. Alat yang digunakan dalam penelitian yang tidak harus steril adalah Rak tabung, Obyek glass, Kertas pH, Neraca digital, Kasa asbes, Kaki tiga, Pipet Pasteur, Api spirtus, Kasa, Kapas, Korek api, Kompor elpiji, *Autoclave*, Mikroskop, studio mini foto.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah Larutan HCl 0,1 N, Larutan NaOH 0,1 N, *Aquadest*, *Beef extract*, *Peptone from meat*, *Media Mac Conkey*, *Media Eosin Methylene Blue*, pewarnaan Gram, spirtus.

3.5.3 Cara Sterilisasi Alat Menggunakan Autoclave

1. Membuka tutup *autoclave* dan keluarkan saringan dari dalam *autoclave*
2. Menambahkan air (*aquadest*) sampai batas

3. Memasukkan kembali saringan kedalam *autoclave*
4. Memasukkan media atau alat yang telah dibungkus koran (dengan cara memotong koran menjadi empat bagian kemudian ambil satu koran dan masukkan tiga cawan Petri dan bungkus dengan melipat dua bagian ke atas lalu lipat ke dua ujung koran kebawah). Kemudian sterilkan ke *autoclave*
5. Menutup *autoclave* dan kencangkan semua sekrup secara silang dengan memutaranya searah jarum jam
6. Kemudian membuka katup uap dan nyalakan kompor dengan api sedang
7. Setelah katup uap mengeluarkan uap lalu tutup katup uap tersebut
8. Kemudian ditunggu hingga suhu mencapai 121 °C
9. Jika suhu melebihi 121°C maka harus distabilkan suhu tersebut dengan cara membuka tutup uap secara perlahan hingga suhu stabil mencapai angka 121°C
10. Kemudian tunggu sampai 15 menit dan matikan kompor
11. Membuka katup uap hingga suhu turun menjadi 0°C
12. Jika suhu sudah turun maka buka sekrup dari *autoclave* dengan cara silang
13. Setelah itu keluarkan semua alat atau media yang telah disterilkan tersebut

(Astuty and Angkejaya, 2022),

3.5.4 Prosedur Pembuatan Media

A. Pembuatan media *bouillon* (media pemupuk)

1. Menyiapkan alat dan bahan, bersihkan semua alat yang akan digunakan
2. Melakukan perhitungan untuk jumlah tabung yang akan dibuat

Pelarut: $35 \times 5 = 175$ ml aquadest

Penimbangan: $\frac{8}{1000} \times 175 = 1,4$ gr

3. Melakukan penimbangan untuk setiap bahan dengan neraca digital
4. Memindahkan media dari gelas arloji ke beaker glass
5. Melarutkan menggunakan aquadest sebanyak 150 ml (telah di ukur dengan gelas ukur)
6. Memanaskan atau mendidihkan di atas api spirtus sampai benar-benar homogen dan larut dengan sempurna
7. Kemudian angkat beaker glass dan di suam-suam
8. Melakukan uji pH menggunakan kertas pH (apabila pH terlalu asam tambahkan NaOH, apabila terlalu basa tambahkan HCl)
9. Jika pH sudah 7,2 tuang larutan media ke setiap tabung dengan volume yang sama
10. Setelah itu tutup dengan kapas kasa dan beri label nama (identitas)
11. Melakukan sterilisasi menggunakan *autoclave* pada tekanan 1 atm pada suhu 121 °C selama ± 15 menit
12. Meletakkan media pada rak tabung dengan posisi tegak

13. Media yang sudah jadi siap untuk digunakan atau disimpan. Media pemupuk siap pakai dapat disimpan pada suhu kamar, kecuali selenite broth disimpan pada suhu 2-8 °C

B. Pembuatan media *Mac conkey*

1. Menyiapkan alat dan bahan, bersihkan dan sterilkan petri yang akan digunakan
2. Melakukan perhitungan media Mac conkey sesuai jumlah petri yang dibuat

Pelarut: $35 \times 15 = 525$ ml aquadest

Penimbangan: $\frac{50,0}{1000} \times 525 = 26,25$ gr

3. Melakukan penimbangan dengan neraca digital
4. Memindahkan media dari gelas arloji ke Erlenmeyer
5. Melarutkan dengan aquadest sesuai volume yang akan dibuat (telah diukur dengan gelas ukur)
6. Memanaskan atau mendidihkan di atas api spiritus sampai benar-benar larut sempurna
7. Mengangkat Erlenmeyer dan di suam-suam
8. Melakukan uji pH menggunakan kertas pH media (apabila pH terlalu asam tambahkan NaOH, apabila terlalu basa tambahkan HCl)
9. Jika pH sudah 7,3 tutup Erlenmeyer dengan kapas kasa dan beri label nama (identitas)
10. Melakukan sterilisasi menggunakan *autoclave* pada tekanan 1 atm pada suhu 121 °C selama ± 15 menit

11. Media yang sudah jadi siap untuk digunakan atau disimpan. Apabila segera digunakan, tuangkan media dari Erlenmeyer ke petri dengan volume 15-20 ml, ratakan membentuk pola angka delapan secara perlahan
12. Menunggu media sampai padat
13. Media siap pakai dapat disimpan pada suhu 2-8°C atau suhu kamar dan selalu dibuat setiap hari

C. Pembuatan media *Eosin Methylen Blue* (EMB)

1. Menyiapkan alat dan bahan, bersihkan dan sterilkan alat terutama petri yang akan digunakan
2. Melakukan perhitungan media EMB sesuai jumlah petri yang akan dibuat

$$\text{Pelarut: } 35 \times 15 = 525 \text{ ml}$$

$$\text{Penimbangan: } \frac{35,96}{1000} \times 525 = 2 \text{ gr}$$

3. Melakukan penimbangan media dengan neraca digital
4. Memindahkan media dari gelas arloji ke Erlenmeyer
5. Melarutkan menggunakan aquadest sesuai volume yang akan dibuat (telah diukur dengan gelas ukur)
6. Memanaskan atau mendidihkan di atas api spirtus sampai benar-benar larut sempurna
7. Mengangkat Erlenmeyer dan di suam-suam
8. Melakukan uji pH menggunakan kertas pH media (apabila pH terlalu asam tambahkan NaOH, apabila terlalu basa tambahkan HCl)

9. Jika pH sudah 7,4 tutup Erlenmeyer dengan kapas kasa dan beri label nama (identitas)
10. Melakukan sterilisasi menggunakan *autoclave* pada tekanan 1 atm pada suhu 121 °C selama \pm 15 menit
11. Media yang sudah jadi siap untuk digunakan atau disimpan. Apabila segera digunakan, tuangkan media dari Erlenmeyer ke petri dengan volume 15-20 ml, ratakan membentuk pola angka delapan secara perlahan
12. Menunggu media sampai padat
13. Media siap pakai dapat disimpan pada suhu 2-8°C
(Artanti, 2018)

3.5.5 Prosedur Pewarnaan Gram

- 1) Diflaming obyek glass di atas api bunsen sebanyak 3 kali agar bebas dari lemak
- 2) Mengambil sampel secara steril dengan cara media dibuka di depan api bunsen dan mengambil sampel menggunakan ose yang telah di pijarkan di atas api bunsen
- 3) Membuat sediaan dengan cara melingkar diatas obyek glass dengan diameter 2-3 cm
- 4) Menunggu preparat sampai kering
- 5) Memfiksasi preparat di atas api spirtus sebanyak 3 kali
- 6) Meletakkan preparat pada jembatan pewarnaan
- 7) Menggenangi preparat dengan Kristal Violet 0,5% dan tunggu selama 1 menit

- 8) Membilas preparat yang telah digenangi menggunakan air mengalir
- 9) Kemudian genangi preparat menggunakan lugol selama 1 menit, setelah 1 menit buang lugol
- 10) Menggenangi preparat dengan alkohol 70%, biarkan selama 10-30 detik
- 11) Membilas preparat menggunakan air mengalir
- 12) Menggenangi preparat dengan carbol fuchsin 0,5% selama 1 menit
- 13) Membilas preparat dengan air mengalir
- 14) Mengeringkan preparat dengan cara tegak lurus agar cepat kering

(Amin *et al.*, 2023)

3.5.6 Persiapan Sampel Uji

Membeli udang balado di rumah makan padang daerah Mulyosari kemudian sampel tersebut dimasukkan kedalam plastik dan dihaluskan menggunakan mortal steril dan dikerjakan di depan api spirtus. Kemudian di ambil sampel udang balado yang sudah di haluskan, ambil dengan menggunakan spatula lalu ditimbang sebanyak 2,5 gr dengan menggunakan gelas arloji dan tanam pada media bouillon.

3.5.7 Prosedur Pemeriksaan

A. Pemeriksaan hari pertama

1. Mengambil sampel yang telah di haluskan dan masukkan sampel ke dalam media bouillon sesuai nomer pada sampel dengan cara membuka tutup tabung di depan api spirtus
2. Kemudian tutup kembali tabung dan lakukan cara tersebut dengan berulang
3. Menyimpan media di dalam inkubator selama 1×24 jam dengan suhu 37°C

B. Pemeriksaan hari ke dua

1. Menyalakan api busen dengan korek api
2. Mengeluarkan media bouillon yang telah di inkubasi selama 1×24 jam dengan suhu 37°C
3. Memberi label atau identitas pada media MC sesuai dengan kode sampel yang akan ditanam
4. Memijarkan ose bulat di atas api busen sampai merah membara dan tunggu hingga ose dingin
5. Mengambil sampel ke dalam media bouillon dan inokulasi ke dalam media MC sesuai kode sampel dengan menggunakan metode T (karena dari media cair ke padat)
6. Menginkubasi media MC selama 1×24 jam dengan suhu 37 °C

C. Pemeriksaan hari ke tiga

1. Mengeluarkan media MC dari dalam inkubator
2. Menyalakan api busen dengan korek api

3. Memberi label pada media EMB sesuai kode sampel yang akan ditanam
4. Mengamati media MC yang telah dikeluarkan. Amati morfologi koloni, bentuk koloni: bulat, tepian: rata, elevasi: cembung, tekstur: tidak berlendir, warna koloni: merah muda, sifat fermentasi: fermentasi laktosa. Jika koloni media berwarna merah muda maka ambil satu koloni menggunakan ose bulat yang telah dipijarkan ke api busen dan buat preparat ke atas obyek glass.
5. Melakukan pewarnaan media dengan pewarnaan Gram untuk melihat morfologi bakteri basil Gram negatif (berwarna merah), jika sudah di periksa dan menemukan basil Gram negatif lalu lanjutkan inokulasi ke media EMB
6. Menginokulasi pada media EMB dengan cara mengambil satu koloni warna merah muda dan inokulasi ke media EMB dengan menggunakan metode Y (karena dari media padat ke padat)
7. Melakukan inkubasi selama 1×24 jam dengan suhu 37°C

D. Pemeriksaan hari ke empat

1. Mengambil media yang telah di inkubasi selama 1×24 jam dengan suhu 37°C
2. Mengamati morfologi pada media EMB. Amati morfologi koloni, bentuk koloni: bulat, tepian: rata, elevasi: cembung, tekstur: tidak berlendir, warna koloni: hijau metalik. Jika pada media

mengalami perubahan menjadi hijau metalik maka media tersebut dapat memfermentasi laktosa
(Indrawati, 2017)

3.6 Tabulasi Data

Data yang diperoleh dari hasil identifikasi bakteri *Escherichia coli* pada sampel udang balado kemudian ditabulasikan dalam bentuk tabel, sehingga di peroleh pada tabel 3.1

Tabel 3.1 Hasil identifikasi bakteri *Escherichia coli* pada udang balado

NO	Kode sampel	Hasil Pemeriksaan		Keterangan
		Positif	Negatif	
1.				
2.				
3.				
4.				
5.				
-				
30				

3.7 Teknik Analisa Data

Teknik analisa data menggunakan analisa deskriptif, kemudian hasil disajikan dalam bentuk tabel dan dipersentasikan menggunakan rumus:

$$P = \frac{f}{n} \times 100 \%$$

keterangan;

P = Persentase

F = Responden frekuensi

N = Jumlah data atau sampel