

III. METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Desain penelitian pada penelitian ini adalah Deskriptif Laboratorik.

3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret - April 2013. Sterilisasi alat-alat dan penelitian sampel es balok dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah depot-depot es balok yang ada di pasar tradisional Bandar Lampung yang jumlahnya 14 depot yang terdapat pada 7 pasar dari 10 pasar yang ada di Bandar Lampung.

Sampel pada penelitian ini adalah es balok di seluruh depot yang ada di pasar tradisional Bandar Lampung atau dengan metode *Total Sampling*.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian terdiri dari dua jenis, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah es balok, sedangkan variabel terikat pada penelitian ini adalah koloni yang terbentuk pada media agar pembiakan bakteri patogen *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter aerogenes.*, *Proteus sp.*, *Streptococcus β -hemolyticus*.

3.5 Definisi Operasional

Dalam penelitian ini terdapat beberapa istilah yang harus dijelaskan secara eksplisit sehingga tidak menimbulkan salah persepsi dalam pemahamannya, antara lain :

1. Kualitas Es balok

Es balok dapat dibuat dari berbagai macam sumber air. Berdasarkan PERMENKES/492/2010, kualitas air untuk pembuatan segala jenis makanan dan minuman harus memenuhi syarat kimia, fisik, mikrobiologi, serta radioaktifitas (terlampir).

2. Kandungan bakteri patogen

Keberadaan bakteri patogen *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter aerogenes.*, *Streptococcus β -hemolyticus.*, *Proteus sp.* yang terkandung dalam es balok atau air bahan pembuat es balok sehingga es balok tercemar. Kemungkinan penurunan mutu dapat terjadi karena beberapa faktor, seperti faktor

pengangkutan, penyimpanan, pengemasan, pembersihan dan lain sebagainya. Untuk lebih lengkapnya dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi	Hasil	Kriteria Hasil	Skala
1.	Kualitas Es balok	Kualitas produk hasil olahan air yang dibekukan berdasarkan standar PERMENKES / No.492 / 2010	(baik)	0/100 ml sampel	Ordinal
			(buruk)	> 0/100 ml sampel	
2.	Kandungan bakteri patogen	Keberadaan <i>E.coli</i> di dalam es balok yang diperoleh dari pasar tradisional Bandar Lampung	(+)	MPN >0/100ml sampel, tes biokimia positif <i>E.coli</i> , terbentuk koloni bakteri pada EMB.	Ordinal
			(-)	MPN 0/100ml sampel, tes biokimia negatif <i>E.coli</i> , tidak terbentuk koloni bakteri pada EMB	
			(+)	Terbentuk koloni pada media EMB, SIM, Mc'Conkey, TSIA dan SC	Ordinal
			(-)	Tidak terbentuk koloni pada media EMB, SIM, Mc'Conkey, TSIA dan SC	

Keberadaan <i>Klebsiella sp</i> dalam es balok yang diperoleh dari pasar tradisional Bandar Lampung	(+)	Terbentuk koloni pada media EMB, SIM, Mc'Conkey, TSIA dan SC	Ordinal
	(-)	Tidak terbentuk koloni pada media EMB, SIM, Mc'Conkey, TSIA dan SC	
Keberadaan <i>Enterobacter aerogenes.</i> dalam es balok yang diperoleh dari pasar tradisional Bandar Lampung	(+)	Terbentuk koloni pada media EMB, SIM, Mc'Conkey, TSIA dan SC	Ordinal
	(-)	Tidak terbentuk koloni pada media EMB, SIM, Mc'Conkey, TSIA dan SC	
Keberadaan <i>S. β-hemolyticus.</i> dalam es balok yang diperoleh dari pasar tradisional Bandar Lampung	(+)	Terbentuk koloni pada SIM, LAD dan terjadi reaksi pada uji koagulase	Ordinal
	(-)	Tidak terbentuk koloni pada SIM, LAD dan terjadi reaksi pada uji koagulase	

Keberadaan <i>Proteus sp.</i> dalam es balok yang diperoleh dari pasar tradisional Bandar Lampung	(+)	Terbentuk koloni pada media EMB, SIM, Mc'Conkey, TSIA dan SC	Ordinal
	(-)	Tidak terbentuk koloni pada media EMB, SIM, Mc'Conkey, TSIA dan SC	

Sumber : Meutia, 2008

3.6 Bahan Penelitian

Bahan penelitian pada eksperimen adalah es balok yang dibiarkan mencair, yang diambil dari pasar tradisional di Bandar Lampung.

3.7 Alat-alat dalam Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah alat-alat laboratorium mikrobiologi, seperti lemari pengering (inkubator), autoklav, rak dan tabung reaksi, beker glass, pipet hisap, pipet ukur, pinset, cawan petri, lidi kapas steril, lampu spiritus, ose, serta peralatan lain yang digunakan di laboratorium mikrobiologi.

3.8 Media yang digunakan

Media pertumbuhan bakteri yang digunakan dalam penelitian ini :

1. LBSS
2. LBTS
3. BGLB
4. EMBA
5. Media gula-gula : Glukosa, Laktosa, Manitol, Maltosa, Sukrosa.
6. Agar SIM
7. Agar Mc'Conkey
8. LAD
9. TSIA
10. Agar SC

3.9 Prosedur Penelitian

Sebelum melakukan penelitian, semua alat-alat yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu dengan menggunakan autoklav. Es balok dibiarkan mencair pada suhu ruangan yang dimasukkan kedalam tempat kemudian ditutup rapat untuk mencegah kontaminasi. Setelah es balok mencair, air sampel dari es balok tersebut ditempatkan kedalam beker glass sebanyak 100 ml.

Pada penelitian ini menggunakan metode *Most Probable Number* (MPN) untuk mengetahui jumlah perkiraan terdekat dari bakteri *Escherichia coli*. Metode MPN adalah metode yang digunakan untuk menguji ada atau

tidaknya bakteri *Escherichia coli* terdiri dari tiga tahap, yaitu uji pendugaan (*Presumptive Test*), uji konfirmasi (*Confirmed Test*), dan uji kelengkapan (*Completed Test*).

1. Tahap I *Presumptive Test*

Spesimen cair ditaman pada:

Lima buah tabung berisi LBTS (tiap tabung berisi 5 ml), kemudian masing-masing diisi air sampel 10 ml. Tabung berikutnya satu buah tabung berisi LBSS (isi sebanyak 10 ml), diisi air sampel 1 ml. Tabung terakhir satu buah tabung berisi LBSS (isi sebanyak 10 ml), tabung dengan diisi 0.1 ml air sampel.

Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 3.2 Presumptive Test

No	Media	Jumlah Tabung	Jumlah	
			Media (ml)	Sampel Air (ml)
1	<i>Lactose Broth Triple Strength</i>	5	5	10
2	<i>Lactose Broth Single Strength</i>	1	10	1
3	<i>Lactose Broth Triple Strength</i>	1	10	0.1

Sumber : Meutia, 2008

Tabung-tabung tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 - 48 jam. Tabung-tabung yang menghasilkan gas dilanjutkan dengan uji

penegasan (*Confirmed test*). Apabila tabung tidak menghasilkan gas, diinkubasi satu kali lagi selama 24 jam, bila tetap tidak menghasilkan gas maka dianggap negatif dan tidak perlu uji lanjutan.

2. Tahap II *Confirmed test*

Dari tabung pada *presumptive test* yang menghasilkan gas, diambil sedikit dengan mencelupkan ose ke dalamnya kemudian tanam pada tabung BGLB, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.

Tabung-tabung yang menghasilkan gas dicatat dan dicocokkan dengan tabel MPN untuk menentukan jumlah terdekat bakteri *coliform* (khususnya *Escherichia coli*) yang terkandung dalam sampel.

3. Tahap III *Complete test*

Tabung BGLB yang menghasilkan gas, dicelupkan dengan ose, kemudian hasil tersebut ditanamkan pada agar EMB dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah sampel diinkubasi dan apabila pada media EMBA berubah warna menjadi hijau metalik, menandakan positif suspect *Escherichia coli*.

Koloni dugaan adanya *Escherichia coli* yang didapat dari uji MPN Complete test, dilakukan uji biokimia. Ose digoreskan pada koloni *suspect Escherichia coli* kemudian ditanamkan pada tabung-tabung untuk uji biokimia (glukosa, sukrosa, maltosa, laktosa, manitol, SIM, Simmons Citrate), lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Dalam uji biokimia, suspect *Escherichia coli* menunjukkan uji glukosa positif, sukrosa positif, maltosa positif, manitol positif, serta uji laktosa positif dan dapat pula negatif. Pada uji SIM, produksi H₂S negatif, uji indole positif motilitas dapat positif atau negatif. Untuk uji SC, hasilnya menunjukkan negatif.

Selain menggunakan media agar EMB untuk mendeteksi adanya bakteri gram negatif, dalam penelitian ini juga digunakan media TSIA untuk mendiferensiasikan bakteri golongan famili *Enterobacteriaceae* serta gram negatif lainnya serta digunakan media agar Mc'Conkey.

Untuk mengantisipasi adanya kontaminasi dari bakteri golongan gram positif, dalam penelitian ini juga dilakukan beberapa pengujian. Pengujian untuk mendeteksi adanya gram positif adalah dengan menggunakan media *Blood Agar Plate* atau Lempeng Agar Darah (LAD).

Tabel 3.3 Interpretasi Positif Kontaminasi pada Uji Biokimia

No.	Bakteri	Uji Biokimia								
		Glu	Suk	Mal	Man	Lak	H ₂ S	Ind	M	C
1	<i>Escherichia coli</i>	+	+/-	+	+	+/-	-	+	+	-
2	<i>Salmonella sp.</i>	+	-	+	+	-	+	-	+	+/-
3	<i>Shigella sp.</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-
4	<i>Klebsiella sp.</i>	+	+	+	+/-	+	-	-	-	+
5	<i>Enterobacter sp.</i>	+	+	+	+	+	-	-	+	+
6	<i>Streptococcus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	<i>Proteus sp.</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	+/-

Sumber : MacWilliam, Maria. P. Sturm, L. Tasha. 2013

Keterangan :

Glu = Glukosa	H ₂ S = Sulfur production
Suk = Sukrosa	Ind = Reaksi indole
Mal = Maltosa	M = Motilitas
Man = Manitol	C = Citrate
Lak = Laktosa	

Tabel 3.4 Interpretasi Positif Kontaminasi pada Media Agar

No.	Bakteri	Media Agar				
		EMB	MC	LAD	TSIA	
					Lereng	Dasar
1	<i>Escherichia coli</i>	Hijau metalik	Merah bata	Negatif	Kuning	Kuning
2	<i>Salmonella sp.</i>	Tidak berwarna	Tidak berwarna	Negatif	Merah	Kuning
3	<i>Shigella sp.</i>	Tidak berwarna	Tidak berwarna	Negatif	Merah	Kuning
4	<i>Klebsiella sp.</i>	Pink mukoid	Pink mukoid	Negatif	Kuning	Kuning
5	<i>Enterobacter aeruginosa</i>	Tidak berwarna	Putih mukoid	Negatif	Kuning	Kuning
6	<i>Streptococcus sp.</i>	-	-	Putih, hemolisis	-	-
7	<i>Proteus sp.</i>	Tidak berwarna	Merah muda	Negatif	Merah	Kuning

Sumber : Allen, Mary. E. Buxton, Rebecca. Cheeptham, N. 2013

Keterangan :

EMB = Eosin Methylene Blue Agar

MC = Mc'Conkey Agar

LAD = Lempeng Agar Darah

TSIA = Triple Sugar Iron Agar

3.10 Analisis Data

Dari data yang diperoleh, dilakukan perhitungan prevalensi sampel yang memiliki kadar MPN 0/100 ml dan > 0/100ml sampel, serta menghitung keberadaan *Escherichia coli* dalam Es balok (Meutia, 2008).

a. Persentase es batu dengan bakteri *coliform* >0/100 ml sampel $= \frac{\text{Jumlah sampel MPN} > 0/100 \text{ ml}}{\text{Jumlah sampel yang diperiksa}} \times 100\%$

b. Persentase es batu dengan bakteri *coliform* 0/100 ml sampel $= \frac{\text{Jumlah sampel MPN } 0/100 \text{ ml}}{\text{Jumlah sampel yang diperiksa}} \times 100\%$

c. Persentase es batu dengan *E.coli* $= \frac{\text{Jumlah sampel positif } E.coli}{\text{Jumlah sampel yang diperiksa}} \times 100\%$

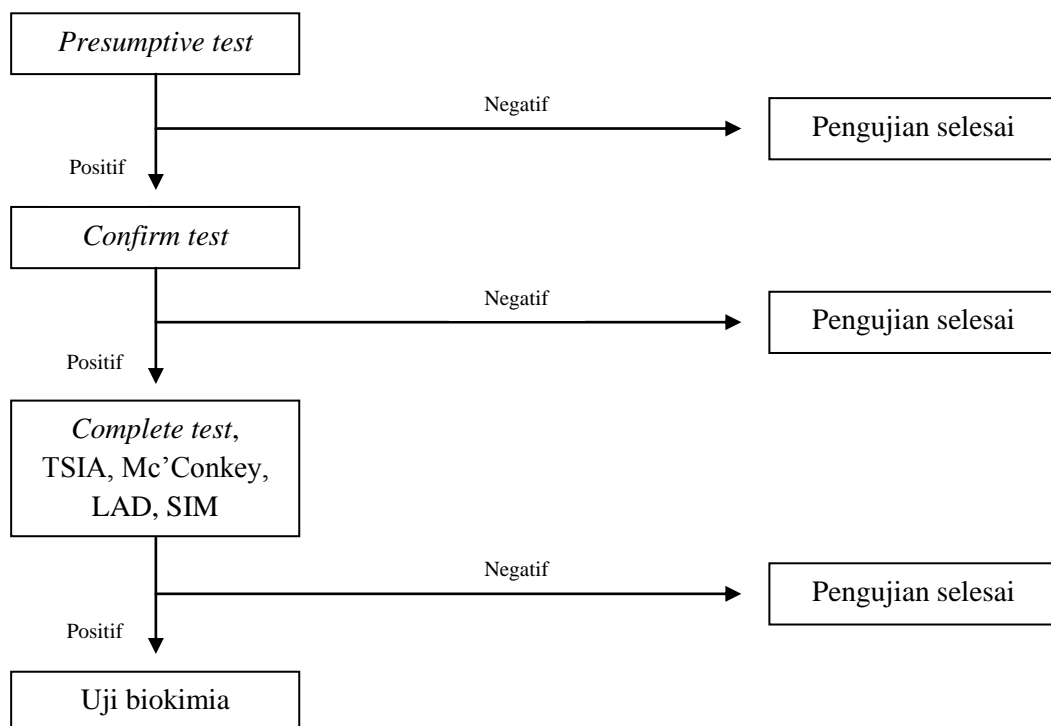
Analisis data dengan rumus diatas hanya pada bakteri *Escherichia coli* saja, untuk analisis data pada bakteri patogen lain hanya diinterpretasikan melalui hasil pertumbuhan koloni pada media agar.

3.11 Alur Penelitian

Alur penelitian dalam penelitian ini adalah yang pertama harus dilakukan adalah sterilisasi alat. Selagi menunggu alat-alat selesai disterilisasi, siapkan es balok yang diperoleh dari depot, biarkan mencair. Setelah es balok mencair didalam box, ambil kira-kira 100ml sampel air dari es balok tersebut.

Setelah sampel siap, lakukan uji pertama MPN, *presumptive test*. Apabila presumptive test positif, lakukan uji berikutnya yaitu MPN confirm test. Apabila presumptive test negatif, pengujian sampel selesai. Bila confirm test positif, lanjutkan pada uji MPN complete test, uji TSIA, uji Mc'Conkey, LAD dan uji SIM. Apabila pengujian menunjukkan hasil test negatif, pengujian sampel selesai. Selanjutnya uji terakhir, dengan complete test apabila menunjukkan hasil yang positif, dilakukan pengujian dilanjutkan dengan uji biokimia atau uji gula-gula.

Bila semua pengujian menunjukkan hasil, dilakukan pengumpulan hasil dan melakukan interpretasi hitung angka MPN dengan rumus penghitungan MPN.



Gambar 3.1 Skema Alur Penelitian