

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan penelitian deskriptif. Penelitian deteksi bakteri *Escherichia coli* dilakukan melalui metode TPC (*Total Plate Count*) dan uji identifikasi bakteri *Escherichia coli*. Metode TPC (*Total Plate Count*) dilakukan dengan menanam suspensi bahan uji pada media selektif EMB untuk kemudian dihitung dengan menggunakan *Colony Counter*. Setelah dihitung, kemudian dilanjutkan dengan uji identifikasi dengan menggunakan uji gula – gula, TSIA, SIM dan SC. Data perhitungan disajikan dalam bentuk *total colony*. Masing-masing perlakuan dianalisis dengan duplo (pengukuran berulang pada contoh yang sama).

#### **B. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung pada bulan Desember 2012 sampai Januari 2013.

#### **C. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi**

Populasi dari penelitian ini adalah cendol yang dijual di pasar tradisional kota Bandar Lampung.

## 2. Sampel

Penentuan jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan metode *consecutive sampling* yaitu pasar tradisional besar yang menjual cendol di Kota Bandar Lampung.

## D. Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini adalah cendol, bakteri *Escherichia coli*, serta batas maksimum angka kuman dalam makanan.

## E. Definisi Operasional

**Tabel 2. Definisi Operasional Penelitian**

Variabel	Definisi Operasional	Skala
<b>Cendol</b>	jenis makanan tradisional yang bahan baku utamanya berupa tepung hunkwee dan tepung beras memiliki tekstur yang kenyal.	-
<b>Bakteri <i>Escherichia coli</i></b>	Bakteri dengan gram negatif batang, Uji TSIA lereng/Dasar : Kuning/kuning, menghasilkan gas, dapat memfermentasi glukosa, sukrosa, laktosa, maltosa, manito.	Nominal
<b>Batas maksimum angka kuman dalam makanan</b>	Batas maksimum angka kuman dengan metode TPC (37°C, 24 jam) adalah $1 \times 10^4$ koloni/gram	Rasio

## F. Bahan dan Alat Penelitian

### 1. Bahan Uji

Bahan penelitian adalah makanan berupa cendol yang dijual dipasar pasar yang ada di Kota Bandar Lampung.

## 2. Media yang digunakan

- a. Agar EMB (*Eosin methylene Blue*).
- b. Agar TSI (*Triple Sugar Iron*).
- c. SIM (*Sulfur, Indol, Motility*).
- d. SC (*Simon Citrat*).
- e. Media gula-gula yang terdiri dari bakto - pepton, BTB(*Brom Timol Blue*) dan gula. Jenis gula yang dipakai adalah glukosa, laktosa, maltosa, manitol, sukrosa.

## 3. Alat Penelitian

Alat- alat yang dipakai adalah inkubator, autoklaf, rak dan tabung reaksi, gelas ukur, labu erlenmeyer, pipet hisap, pipet ukur, pinset, cawan petri, kapas, lampu spirtus, ose serta peralatan lain yang lazim dipergunakan di Laboratorium Mikrobiologi.

## G. Prosedur Kerja

### 1. Pengambilan Sampel

Sampel dibeli langsung dari penjual cendol yang ada di pasar Kota Bandar Lampung, lalu disimpan dalam wadah yang steril, kemudian dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk dilakukan pemeriksaan yaitu hitung jumlah bakteri dan deteksi bakteri *Escherichia coli*.

## 2. Preparasi Sampel

Setelah dikeluarkan dari wadahnya, bahan (cendol) ditumbuk sampai halus atau homogen dengan menggunakan mortar dan stamper. Pada dasarnya, preparasi sampel dilakukan secara aseptis yaitu dengan menggunakan alat yang steril.

## 3. Metode TPC (*Total Plate Count*)

Uji Angka Lempeng Total atau disebut juga TPC (*Total Plate Count*) menggunakan media padat dengan hasil akhir berupa koloni yang dapat diamati secara visual berupa angka dalam koloni (cfu) per ml/g atau koloni/100ml. Prinsip pengujian Angka Lempeng Total menurut metode Analisis Mikrobiologi (MA PPOM 61/MIK/06) yaitu pertumbuhan koloni bakteri aerob mesofil setelah cuplikan diinokulasikan pada media lempeng agar dengan cara tuang dan diinkubasi pada suhu yang sesuai. Pada pengujian Angka Lempeng Total menggunakan PDF (*Pepton Dilution Fluid*) sebagai pengencer sampel dan menggunakan PCA (*plate Count Agar*) sebagai media padatnya. Digunakan juga pereaksi khusus Tri Phenyl Tetrazalin Chlotide 0,5 % (TTC). Dalam penelitian ini digunakan agar EMB (*Eosin methylene Blue*) sebagai media padatnya dikarenakan media ini selektif terhadap bakteri gram negatif terutama *Escherichia coli*.

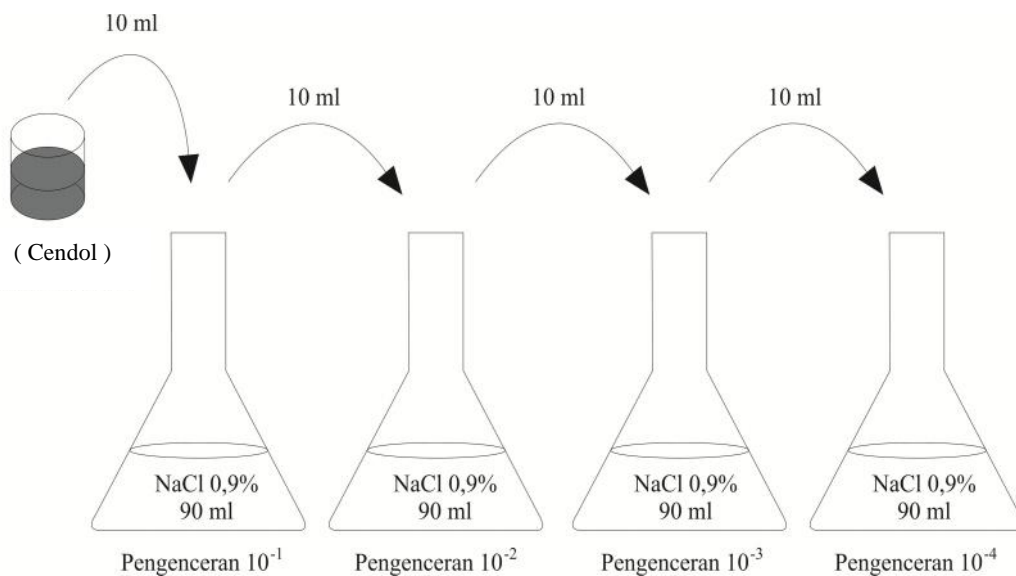
### a. Pengenceran Sampel

Metode yang digunakan untuk pengenceran ini adalah metode cawan tuang (*Pour Plate*) yaitu teknik lain yang dapat digunakan untuk mendapatkan koloni murni mikroorganisme. Kelemahan metode ini adalah membutuhkan waktu dan bahan yang lama dan banyak, akan tetapi tidak memerlukan keterampilan tinggi. Biakan campuran diencerkan dengan menggunakan medium agar yang telah dicairkan dan didinginkan. Pengenceran dilakukan dalam beberapa tahap hingga diperoleh koloni tunggal.

- Masukkan NaCl Fisiologis 0,9% ke dalam masing-masing labu *Erlenmeyer* dengan ketentuan sebagai berikut : satu tabung pertama diisi dengan 10 mL NaCl dan tiga tabung berikutnya masing-masing diisi dengan 9 mL NaCl Fisiologis 0,9%.
- Gerus sumber isolat/ sampel dengan bantuan NaCl Fisiologis steril di atas Mortar Keramik steril,
- Timbang 10 gram sampel (di atas aluminium foil), kemudian masukkan ke dalam labu *Erlenmeyer* sebentar agar suspensi homogen.
- Ambil sebanyak 1 mL suspensi dari tabung dengan menggunakan Pipet Volumetrik steril, kemudian masukkan ke dalam labu *Erlenmeyer* selanjutnya, sebentar agar suspensi homogen ditambahkan pelarut Na Cl 0,9 % sebanyak 90 ml, dikocok baik – baik sehingga menjadi pengenceran  $10^{-1}$ . Kemudian diambil 10 ml

dari larutan tersebut dan ditambahkan NaCl 0,9% sampai volume mencapai 100 ml.

- Setelah itu sebanyak 10 ml dari larutan tersebut diambil kembali untuk kemudian ditambahkan pelarut NaCl 0,9% sampai volume mencapai 100 ml, dikocok baik - baik sehingga menjadi pengenceran  $10^{-3}$ . Begitu seterusnya sampai pengenceran  $10^{-4}$  (Soemarno, 2000; Munir, 2008).



**Gambar 5. Pengenceran sampel**

#### **b. Penanaman pada EMB (*Eosin Methylrene Blue*)**

Sampel yang telah diencerkan sampai  $10^{-4}$ , diambil sebanyak 1 ml diambil dan ditetaskan pada petri dish, kemudian dituangi media EMB (*Eosin Methylrene Blue*) yang dicairkan. Sampel tersebut diulang

sebanyak dua kali dengan duplo. Setelah media EMB menjadi padat kembali, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam (Soemarno, 2000; Munir, 2008).

### c. Penghitungan Koloni

Setelah 24 jam, seluruh koloni baik yang berwarna hijau metalik (*Escherichia coli*) ataupun yang bukan dihitung. Satuan koloni ditetapkan berdasarkan jumlah koloni per 10 gram sampel. Idealnya jumlah koloni per-petri yang boleh dihitung yaitu antara 30 – 300 cfu (*colony form unit*). Koloni besar, kecil, menjalar dianggap berasal dari satu bakteri. Perhitungan dapat dilakukan secara manual dengan memberi tanda titik dengan menggunakan spidol pada petri disk atau dengan menggunakan *colony counter*. Tiap-tiap petri dish dari pengenceran berbeda dihitung jumlah koloninya kemudian dimasukkan kedalam rumus sebagai berikut:

Angka kuman/*Total Plate Count* (TPC) untuk sampel yang diberikan:

$$= \frac{(a-k) \times b + (a-k) \times b}{2}$$

2

= ....per ml/gram

Keterangan: a=jumlah koloni

b=pengenceran

k=bakteri yang tumbuh pada kontrol

Setelah dilakukan penghitungan, dilanjutkan dengan uji identifikasi bakteri *Escherichia coli*.

#### 4. Identifikasi bakteri *Escherichia coli*

Koloni yang merupakan tersangka *Escherichia coli* dibiakkan pada media TSIA dan gula – gula (glukosa, laktosa, maltosa, manitol, sukrosa, sorbitol, arabinosa). Setelah itu diinkubasi pada suhu 37 C selama 24 jam. Setelah itu dibaca pada pertumbuhan pada media TSIA dan gula – gula kemudian dicocokkan dengan ciri – ciri *Escherichia coli* (Soemarno, 2000 ;Munir, 2008).

- a. TSIA : Dilihat kemampuan *Escherichia coli* (untuk membentuk suasana asam (berwarna kuning) atau basa (berwarna merah) serta pembentukan gasnya. Agar TSI terdiri dari dua bagian yaitu bagian lereng dan dasar agar. Bila lereng dan dasar berwarna kuning, berarti sampel positif mengandung *Escherichia coli*, sebaliknya jika berwarna merah berarti sampel negatif mengandung *Escherichia coli*. Jika terbentuk gas, berarti sampel positif mengandung *Escherichia coli*, dan bila tidak mengandung gas berarti sampel negatif mengandung *Escherichia coli*.
- b. SIM (*Sulfur, Indol, Motility*) : SIM merupakan media untuk membedakan tiga parameter yaitu reduksi sulfur untuk membedakan bakteri enterik, uji indol untuk membedakan family Enterobacteriaceae, uji motilitas untuk membedakan jenis bakteri secara umum. Tujuan utama uji ini adalah untuk membedakan Salmonella dan Shigella. Kandungan Media SIM: Nutrisi (salah satunya pepton yang mengandung asam amino termasuk Triptofan), Iron, dan Natrium



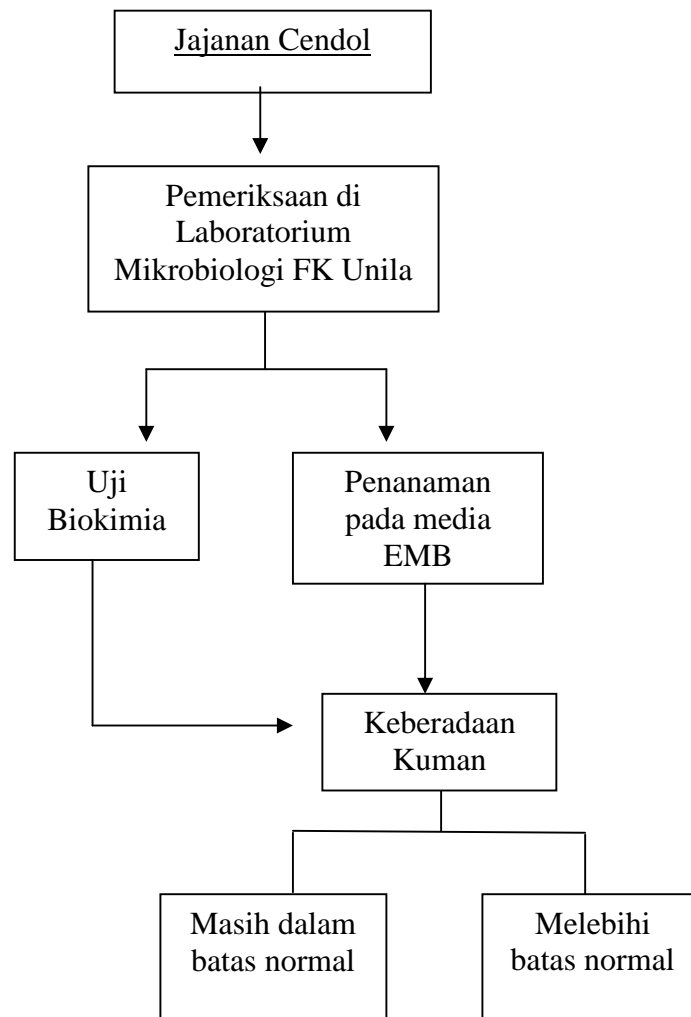
thiosulfat. Prinsip Reduksi Sulfur adalah bakteri dapat mereduksi sulfur menjadi hydrogen sulfide, maka hydrogen sulfide akan bereaksi dengan zat besi (Iron) menjadi ferric sulfide yang mengendap berwarna hitam. Hasil uji reduksi sulfur positif yaitu akan terbentuk warna hitam pada media. Beberapa bakteri menghasilkan enzim tryptophase yang dapat menghidrolisis tryptophan. Hasilnya Indol, Asam Piruvat dan Amonia dengan cara deaminasi. Cara kerjanya yaitu menambahkan reagen Kovac yang mengandung HCl, n-amyl alcohol dan p-dimethylaminobenzaldehyde (DMABA) kedalam medium SIM, maka DMABA akan bereaksi dengan indol, hasilkan senyawa Quinoidal merah. Hasil uji indol positif yaitu pereaksi berubah menjadi merah.

- c. SC (*Simon Citrat*) : Uji sitrat digunakan untuk melihat kemampuan mikroorganisme menggunakan sitrat sebagai satu satunya sumber karbon dan energi. Simons Citrat Agar merupakan medium sintetik dengan Na sitrat sebagai satu satunya sumber karbon,  $\text{NH}_4^+$  sebagai sumber N dan bromthymol blue sebagai indikator pH, sedangkan medium sitrat koser tidak mengandung indikator. Bila mikroorganisme mampu menggunakan sitrat, maka asam akan dihilangkan dari medium biakan, sehingga meenyebabkan peningkatan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru. Perubahan warna dari hijau menjadi biru menunjukkan bahwa, mikroorganisme mampu menggunakan sitrat sebagai satu satunya sumber karbon, sedangkan pada medium sitrat koser kemampuan menggunakan sitrat ditunjukkan oleh kekeruhan yang menandakan adanya pertumbuhan.

d. Gula – gula : Warna asli gula – gula adalah biru sehingga apabila bakteri tersangka positif mengandung *Escherichia coli*, maka media gula – gula akan berubah warna menjadi kuning karena *Escherichia coli* mempunyai kemampuan untuk memfermentasi gula dan membentuk gas.

- Glukosa: Positif (kuning) dengan gas atau positif tanpa gas
- Laktosa : Positif (kuning) atau negatif (biru)
- Manitol : Positif (kuning) atau negatif (biru)
- Maltosa : Positif (kuning) atau negatif (biru)
- Sukrosa : Positif (kuning) atau negatif (biru)

## 5. Skema Prosedur Penelitian



**Gambar 6. Skema Prosedur Penelitian**