

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan di pasar di sekitar kota Bandar Lampung, sebanyak 7 sampel diambil dari pasar tradisional dan 7 sampel diambil dari pasar modern. Penelitian mikrobiologi bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi UPTD Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Lampung pada Desember 2012 sampai Januari 2013.

B. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan Uji

Bahan penelitian adalah daging sapi segar yang dijual di pasar di sekitar Bandar Lampung.

2. Media yang digunakan

1. Agar *MacConkey* (MC)
2. Agar *Triple Sugar Iron* (TSI)
3. Agar *Simmon Citrate* (SC)

4. Agar Urea
5. Agar *Sulfur, Indol, Motility* (SIM)
6. Media gula-gula. Jenis gula yang dipakai adalah glukosa, laktosa, manitol, maltose, dan sukrosa.
7. Larutan NaCl.

3. Alat-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 spiritus

C. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah penelitian deskriptif laboratorik. Penelitian deteksi bakteri *Coliform* dilakukan dengan menanam suspensi bahan uji pada media selektif MC kemudian dilanjutkan dengan uji identifikasi dengan menggunakan tes gula-gula, uji urea, uji sitrat, uji indol dan TSIA.

D. Prosedur Penelitian

1. Pengambilan Sampel

Sampel dibeli langsung dari pasar di sekitar Bandar Lampung. Kemudian disimpan didalam wadah yang steril dan dibawa ke laboratorium mikrobiologi UPTD Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Lampung untuk dilakukan pemeriksaan yaitu hitung jumlah bakteri dan deteksi *Coliform*.

2. Preparasi Sampel

Setelah dikeluarkan dari tempatnya, daging sapi segar ditumbuk sampai halus atau homogen dengan menggunakan mortar dan stamper. Pada dasarnya, preparasi sampel dilaksanakan dengan aseptis, dengan menggunakan alat yang steril.

3. Pengenceran sampel

- a. Sampel diambil secara aseptis, dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer steril dan ditimbang sebanyak 10 gr sampel
- b. Ditambahkan pelarut NaCl 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 hingga pengenceran 10^{-4} (Soemarno, 2000).

4. Penanaman pada *MacConkey* (MC)

Sampel yang sudah diencerkan sampai 10^{-4} , diambil sebanyak 1 ml dan digoreskan ke dalam *petri dish* yang terisi dengan media MC yang telah padat, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Soemarno, 2000).

5. Identifikasi *Coliform*

Koloni yang merupakan tersangka *Coliform* dibiakkan pada media agar TSI dan gula-gula (glukosa, laktosa, manitol, maltosa, sukrosa). Setelah itu, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu dibaca pertumbuhan pada media agar TSI dan gula-gula, kemudian dicocokkan dengan ciri-ciri *Coliform* (Soemarno, 2000).

Agar TSI : dilihat kemampuan bakter-bakteri *Coliform* untuk mengoksidasi hasil fermentasi laktosa atau sukrosa. Jika dapat mengoksidasi bagian lereng akan berubah menjadi merah seperti pada *Proteus sp*, tetapi jika tidak dapat mengoksidasi suasana akan tetap asam sehingga lereng dan dasar tetap berwarna kuning, seperti pada *E.coli* dan *Klebsiella sp*.

Agar SIM : Pada media SIM dilakukan uji sulfur, uji indol, dan uji motilitas. Uji sulfur digunakan untuk melihat kemampuan bakteri untuk mereduksi sulfur. Biakan *E.coli* pada media ini tidak menghasilkan warna hitam karena *E.coli* tidak dapat mereduksi sulfur, begitu juga dengan *Klebsiella sp.* Namun *Proteus sp* dapat mereduksi sulfur sehingga dapat menghasilkan warna hitam. Sedangkan uji indol dilakukan untuk melihat kemampuan bakteri untuk membentuk indol dari asam amino tryptophan. Pembentukan indol dalam media dapat diketahui dengan pemberian larutan kovacs. Terbentuknya cincin berwarna merah menunjukkan hasil yang positif seperti yang terjadi pada bakteri *E.coli*. Pada bakteri *Proteus sp* hasil indol bisa positif dan bisa negatif tergantung dari spesies bakteri itu sendiri, sedangkan pada bakteri *Klebsiella sp* akan menunjukkan hasil indol yang negatif. Uji motilitas dilakukan untuk melihat apakah bakteri yang dibiakkan bersifat motil atau non-motil. Jika bakteri tersebut motil maka akan terbentuk kekeruhan seperti kabut pada media. *E.coli* merupakan bakteri yang motil begitu juga dengan *Proteus sp*, namun *Klebsiella sp* memiliki sifat yang kurang motil atau bahkan non-motil.

Agar SC : Uji sitrat digunakan untuk melihat kemampuan mikroorganisme menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon. Pada *E.coli* tidak terjadi perubahan warna media yang menandakan ketidakmampuan *E.coli* untuk menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Namun pada *Klebsiella sp* dan *Proteus sp* akan terlihat perubahan warna media menjadi biru karena kedua bakteri ini dapat menggunakan sitrat sebagai sumber karbon.

Agar urea : Uji urease digunakan untuk melihat bakteri yang mampu menghasilkan enzim urease. *E.coli* yang tidak dapat menghasilkan enzim urease tidak dapat mengubah media menjadi berwarna pink namun sebaliknya pada *Klebsiella sp* dan *Proteus sp* yang dapat menghasilkan enzim urease akan terjadi perubahan warna media menjadi pink.

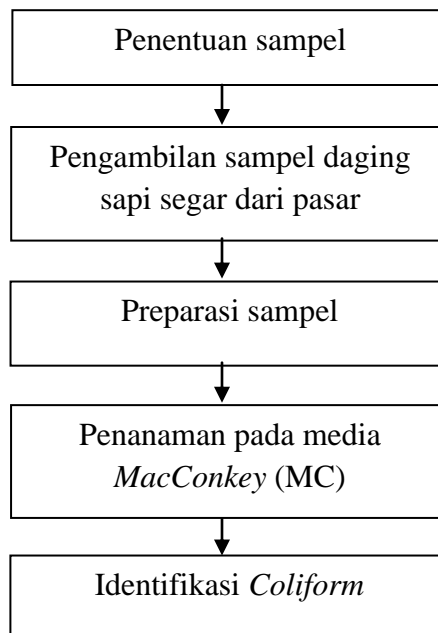
Gula-gula : warna asli media gula-gula adalah biru, sehingga apabila bakteri tersangka ternyata dapat memfermentasi gula-gula akan menyebabkan perubahan warna pada media (Depkes RI, 2004)

a. Glukosa : positif (kuning) dengan gas atau positif tanpa gas

b. Laktosa : positif (kuning) atau negatif (biru)

- c. Manitol : positif (kuning) atau negatif (biru)
- d. Maltosa : positif (kuning) atau negatif (biru)
- e. Sukrosa : positif (kuning) atau negatif (biru)

6. Skema Penelitian



Gambar 5. Skema Penelitian