

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian non-eksperimental dengan analisis deskriptif-komparatif, dikarenakan tidak memberikan perlakuan terhadap subjek uji. Data yang didapat berupa prediksi jumlah bakteri *Coliform*, *Coliform* fekal dan bakteri *Escherichia coli* dalam 100 mL sampel yang dibandingkan dengan Standar Nasional Indonesia 01- 3839-1995 yang didasarkan dari PERMENKES RI No. 492/Menkes/PER/IV/2010

#### 3.2 Sampel

Sampel uji yang digunakan dalam penelitian ini berupa sampel es batu balok yang berasal dari distributor es batu dan pabrik pembuatan es batu balok di daerah Kopel dan Adiarsa, Karawang yang sebelumnya telah dicairkan. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Universitas Buana Perjuangan Karawang

### 3.3 Alat dan Bahan

#### 1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : Aluminium foil (Best Fresh), Cawan petri (Pyrex), bunsen blup, *hot plate* (Heidolph), jarum ose (Rofa), kaca objek (Microscope Slide), mikroskop (Smic), *Laminar Air Flow (LAF)*, Inkubator Memmert), timbangan analitik (vortex), rak tabung reaksi, tabung reaksi (Pyrex), autoklaf (ALP), pipet (Pyrex), *micropipet (Dragon Lab)*, pipet volume (Pyrex).

#### 2. Bahan

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : es batu balok dari sekitaran Karawang, Jawa Barat, media Nutrien Agar (NA), media *Lactose Broth*, medium MRVP, media agar *Eosin Methylene Blue*, medium *Sulfide Indole Motility*, media agar *Simmons Citrate Agar*, Kristal Violet, lugol, alkohol 70%, minyak imersi, *aquadest*, *aquabidest*, spirtus, NaCl fisiologis, reagen kovac's, safranin, *methyl red*, *iodine*, barritt's A atau alfa naflol 5%, dan KOH 40%.

### 3.4 Variabel Penelitian

#### 1. Klasifikasi Variabel

a. Variabel bebas : yang termasuk ke dalam variabel bebas di dalam penelitian ini adalah es batu balok yang diperoleh dari beberapa penjual minuman di sekitaran Karawang, Jawa Barat

b. Variabel terikat : Identifikasi bakteri *Escherichia coli*, jumlah bakteri *Coliform*, dan *Coliform fekal*

c. Variabel terkendali : Kualitas media yang digunakan, Akurasi peralatan dalam pengaturan suhu, akurasi peralatan dalam pengambilan volume sampel, tingkat ketelitian selama proses pembuatan media agar

#### 2. Definisi Operasional Variabel

a. Bakteri *Coliform* merupakan indikator akan kualitas dari air. Semakin sedikit bakteri *Coliform* maka semakin baik pula kualitas air. Secara umum bakteri *Coliform* berasal dari kotoran dan dapat menyebabkan penyakit pada manusia maupun hewan (Yehia dan Sabae, 2011).

- b. Bakteri *Coliform* fekal adalah salah satu indikator polusi yang banyak terjadi pada saat ini, terutama yang disebabkan oleh limbah mentah dan terolah, dan juga dampak tersebar dari tanah pertanian dan padang rumput (Yehia dan Sabae, 2011).
- c. Es batu balok adalah Es balok merupakan air yang didinginkan kemudian dicetak menjadi balok es. Es balok memiliki ukuran yang bervariasi mulai dari yang kecil hingga besar, hal ini tergantung dari masing-masing pabrik yang membuatnya. Es balok merupakan jenis es batu serbaguna, dimana kegunaannya dapat sebagai pengawet kesegaran ikan, buah-buahan, hiasan patung es, sampai dijual ke pedagang es pinggir jalan sebagai es batu.
- d. Bakteri *Escherichia coli* merupakan salah satu bakteri *Coliform fekal* dengan memiliki kemampuan memfermentasikan 11 laktosa pada suhu 44,5°C yang kemungkinan terkandung di dalam es batu.
- e. *Most Probable Number* (MPN) merupakan metode penentuan jumlah bakteri *Coliform* dan *Coliform* fekal yang kemungkinan terkandung didalam sampel es batu balok yang diambil dari penjual minuman di Karawang, Jawa Barat.
- f. Kualitas Mikrobiologis es batu adalah Kelayakan es batu balok dilihat dari segi mikrobiologis dengan menggunakan ketentuan kandungan total bakteri *Coliform* sebesar 0/100 mL dan *Coliform fekal* sebesar 0/100 mL berdasarkan

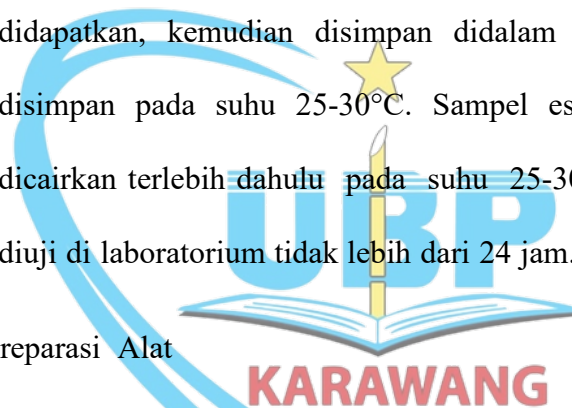
### 3.5 Prosedur Kerja

#### 1. Pengambilan Sampel

Es batu balok yang digunakan sebagai sampel diambil sebanyak 3 sampel yang berasal dari tempat distributor es balok dan dari pedagang minuman kaki lima disekitar pasar tradisional kota Karawang dan blanko yang digunakan adalah aquadest steril yang berfungsi sebagai pembanding. Sampel es batu balok yang telah didapatkan, kemudian disimpan didalam plastik klip steril dan disimpan pada suhu 25-30°C. Sampel es batu sebelum dianalisa dicairkan terlebih dahulu pada suhu 25-30°C. Sampel yang akan diuji di laboratorium tidak lebih dari 24 jam.

#### 2. Preparasi Alat

Alat yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu alat yang terbuat dari kaca, gelas dan media untuk pertumbuhan mikroba disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.



### 3. Pembuatan Media Pertumbuhan

#### 1. *Nutrient Agar (NA) Miring*

Media *Nutrient Agar* (NA) ditimbang sebanyak 1.69 g lalu dilarutkan dalam 60 mL aquadest kemudian diaduk hingga homogen sambil dipanaskan dengan menggunakan *hot plate*. *Nutrien Agar* kemudian diambil sebanyak  $\pm 5$  mL dan dimasukkan pada tabung reaksi. Medium disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit, kemudian setelah disterilisasi media dimiringkan  $45^{\circ}$  dan dipadatkan (Rafika dan Pratiwi, 2014).

#### 2. *Lactose Broth (LB)*

Lactose Broth ditimbang sebanyak 1 g dan dilarutkan dalam 60 mL aquades kemudian diaduk hingga homogen sambil dipanaskan dengan menggunakan *hot plate*. Kemudian mengambil 10 mL media lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang sebelumnya telah berisi tabung durham, kemudian disterilisasikan dengan menggunakan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit (Rafika dan Pratiwi, 2014).

#### 3. *Eosin Methylene iBlue Agar (EMBA)*

*Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) ditimbang sebanyak 1.090 g kemudian dilarutkan dengan menggunakan aquadest sebanyak 30 mL lalu diaduk hingga homogen sambil dipanaskan dengan menggunakan *hot plate*. Medium yang telah dipanaskan kemudian disterilisasikan dengan menggunakan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$

selama 15 menit (Andrian *et al.*, 2014).

#### 4. *Sulfide Indole Motility (SIM)*

*Sulfide Indole Motility* ditimbang sebanyak 1.087 g, dan dilarutkan dengan menggunakan aquadest sebanyak 30 mL lalu diaduk hingga homogen sambil dipanaskan dengan menggunakan *hot plate*. Kemudian mengambil  $\pm 15$  mL dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Medium disterilisasikan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Ismail dan Fariedah, 2014).

#### 5. *Methyl Red-Voges Proskauer (MRVP)*

Media MRVP ditimbang sebanyak 0.52 g lalu dilarutkan dengan 30 mL aquadest kemudian diaduk hingga homogen dan dipanaskan dengan menggunakan *hot plate*. Medium diambil sebanyak  $\pm 5$  mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Medium kemudian disterilisasikan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Sari & Apridamayanti, 2014).

#### 6. *Simmons Citrate-Agar*

Media *Simmons Citrate Agar* ditimbang sebanyak 0.70 g kemudian

dilarutkan dengan aquadest sebanyak 30 mL liter kemudian diaduk hingga homogen lalu dipanaskan dengan *hot plate*. Kemudian mengambil  $\pm 7$  mL medium *simmons citrate* agar dan dimasukkan ke dalam tabung eaksi. Kemudian medium disterilasikan dengan menggunakan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. Setelah disterilisasikan tabung reaksi berisi medium kemudian dimiringkan  $45^{\circ}$  dan dipadatkan (Irianto, 2006).



#### 4. Uji Coliform

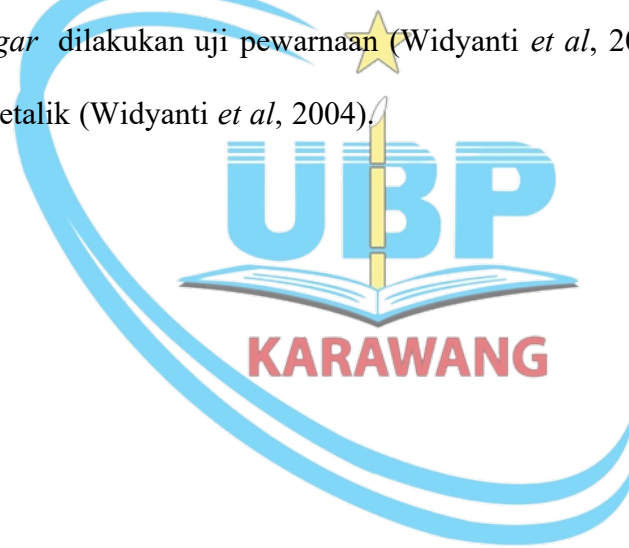
##### 1. Uji Penduga (*Presumptive test*)

Uji penduga (*Presumptive test*) dengan menggunakan 9 tabung reaksi (dengan menggunakan seri 3-3-3) Masing- masing tabung reaksi berisikan media *lactose broth* sebanyak 10 mL dan dilengkapi dengan tabung durham dalam keadaan posisi yang terbalik. Sampel es batu balok yang sebelumnya telah dicairkan kemudian diambil sebanyak 10 mL, 1 mL, 0,1 mL. Tiga seri pertama diisi sampel es batu sebanyak 10 mL dengan bantuan pipet volum, tiga seri tabung reaksi kedua diisi sebanyak 1 mL sampel es batu balok, dan tiga seri tabung ketiga diisi sampel es batu sebanyak 0,1 mL dengan menggunakan mikropipet. Pengisian sampel dilakukan secara aseptis. Semua tabung reaksi yang sudah berisikan sampel kemudian diinkubasi pada inkubator pada suhu 37°C dan diamati hasilnya. Hasil positif jika terbentuk gas berupa rongga kosong pada tabung durham (Bambang *et al.*, 2014; Hadi *et al.*, 2014)

##### 2. Uji Penguat (*Confirmative test*)

Tabung yang menunjukkan hasil positif pada uji penduga sebelumnya kemudian dilanjutkan dengan uji penguat. Mengambil 1-2 ose kemudian digoreskan pada cawan yang berisi medium *Eosin Methylene Blue Agar* dan diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C dan ditunggu 1×24 jam. Bakteri yang diduga *Escherichia coli* memiliki koloni yang Uji Pelengkap (*Completed Test*)

Tabung yang pada uji penguat menghasilkan hasil positif kemudian diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasi dalam *Lactose Broth* dengan jarum inokulasi secara aseptik dan diinkubasi dengan menggunakan inkubator pada suhu 37°C selama 1 × 24 jam. Jika terbentuk gelembung pada tabung durham maka hasilnya positif dan untuk membedakan bakteri golongan *Coli* dari bakteri golongan *Coli* fekal dengan cara menginkubasi medium *Nutrient Agar* dengan posisi dimiringkan pada suhu 37°C (untuk golongan *Coli*) dan diinkubasi pada suhu 42°C (untuk golongan *Coli fekal*) dan hasil bakteri yang tumbuh di *Nutrient Agar* dilakukan uji pewarnaan (Widyanti *et al*, 2004). berwarna hijau metalik (Widyanti *et al*, 2004).



## 5. Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*

### A. Pewarnaan Gram

Bakteri yang sebelumnya sudah diinokulasi pada media *Nutrient Agar* (NA) miring dan sudah diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 36-37°C, kemudian diambil  $\pm$  1 ose lalu diletakan pada gelas objek. Gelas objek difiksasi dengan cara dilewatkan apusan di atas api bunsen. Apusan ditetesi dengan larutan kristal violet lalu didiamkan selama 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan cara dianginkan. Apusan ditetesi dengan beberapa tetes larutan *iodine*, dibiarkan selama 1 menit setelah itu dicuci kembali dengan menggunakan air mengalir dan dikeringkan dengan cara dianginkan. Apusan ditetesi dengan alkohol lalu didiamkan selama 30 detik kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan cara dianginkan. Kemudian apusan diberi beberapa tetes safranin lalu didiamkan selama 30 detik dan dicuci dengan menggunakan air yang mengalir setelah itu dikeringkan dengan cara dianginkan dan diamati dibawah mikroskop (Marianse Allung & Made Susilawati, 1977)

### B. Uji IMViC (Indol, *Methyl Red*, *Voges Proskauer*, *Simmons Citrate*)

a. Uji Indol

Bakteri uji yang sebelumnya sudah ditumbuhkan pada media *Nutrient Agar* (NA) dengan posisi miring diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan kedalam media *Sulfide Indole Motility* (SIM) dengan kontrol satu tabung yang tidak diinokulasikan bakteri. Kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C, lalu menambahkan 5 tetes reagen Kovacs' kedalam masing-masing tabung dan diamkan selama 10 menit. Jika terbentuk lapisan berwarna merah pada permukaan biakan menandakan reaksi indol positif (Sari & Apridamayanti, 2014).

b. Uji Methyl Red

Bakteri uji yang telah ditumbuhkan pada *Nutrien Agar* (NA) dengan posisi miring diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan ke dalam media MR-VP dengan blanko satu tabung berisi media MR-VP yang tidak diinokulasikan bakteri dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Menambahkan 3 tetes pereaksi *methyl red*. Hasil uji positif ditandai dengan adanya perubahan warna media menjadi merah, dapat diartikan bahwa telah terbentuk asam (Sari & Apridamayanti, 2014).

c. *Uji Voges Proskauer*

Bakteri uji yang telah ditumbuhkan pada media *Nutrient Agar* (NA) dengan posisi miring, kemudian diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan ke dalam media MR-VP yang tidak diinokulasikan bakteri. Kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C dengan ditambahkan alfa naftol 5% sebanyak 0,6 mL dan KOH 40% sebanyak 0,2 mL kemudian didiamkan. Hasil uji positif ditandai dengan terbentuknya cincin warna merah muda (SNI, 1992).

d. *Uji Simmons Citrate*

Mengambil bakteri uji yang telah ditumbuhkan sebelumnya pada media *Nutrient Agar* (NA) dengan posisi miring sebanyak 1 ose dan diinokulasikan ke dalam media *Simmons Citrate* dengan blanko satu tabung berisi media *Simmons Citrate* yang tidak diinokulasikan bakteri, kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif ditandai dengan adanya perubahan warna pada medium biakan menjadi biru (Hadioetomo, 1993; Sudarsono, 2008).

### C. Uji TSIA (Triple Sugar Iron Agar)

Mengambil bakteri uji yang sebelumnya sudah ditumbuhkan pada media *Nutrient Agar* (NA) dengan posisi miring sebanyak 1 ose dan diinokulasikan kedalam media TSIA dengan cara menusuk tegak lurus pada bagian *butt* (tusuk) dan cara zig zag pada bagian *slant* (miring) dengan menggunakan blanko satu tabung yang berisikan media *Triple Sugar Iron Agar* yang tidak diinokulasikan oleh bakteri.

Kemudian diinkubasi selama

24 jam pada suhu 37°C. Diamati perubahan yang terjadi pada warna medium. Apabila pada bagian *slant* berubah warna menjadi merah dan *butt* menjadi warna kuning maka bakteri mampu memfermentasi glukosa, sedangkan apabila pada bagian *slant* dan *butt* tidak berubah warna menjadi kuning maka bakteri mampu memfermentasi sukrosa dan laktosa (Yusuf, 2009)

