BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan dari bulan Februari sampai dengan bulan Juni 2019 di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah tabung reaksi, pipet ukur, gelas ukur, rak tabung reaksi, *autoclave All American, hot plate*, *erlenmayer*, cawan petri, bunsen, incubator IN601 *Gemmy*, jarum inokulasi (ose), *colony counter* XK97-A, kaca preparat dan mikroskop monokuler *Yazumi,* korek api, wadah botol, label, spidol, kamera.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan penelitian ini adalah susu UHT (sampel A dan B) serta susu fermentasi (sampel X) yang diperoleh dari supermarket didaerah Karawang. Media pertumbuhan bakteri yaitu NA (*Nutrien* Agar), SIM dan MR-VP. Reagen yang digunakan yaitu reagen *kovac*, reagen *methyl red*. Pewarnaan gram yaitu kristal violet, alcohol 96%, safanin dan aquadest.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 *Total Plate Count* (TPC)

Pada tiap sempel diambil 1 ml, kemudian diencerkan menggunakan aquadest sampai pengenceran ke 10^{-6}. Selanjutnya dari sampel masing-masing pengenceran 10^{-6} diambil 1 ml untuk dimasukan kedalam cawan petri steril, kemudian dituang media cair *Nutrien Agar* (NA) dan dihomogenkan dengan cara menggeserkan cawan horizontal atau membentuk angka delapan dan

dibiarkan membeku. Inkubasi pada susu 37ºC selama 24 jam dan semua koloni yang tumbuh dihitung sebagai TPC.

3.3.2 Uji Biokimia

Dari tabung pengenceran, buat goresan pada media *Nutrien Agar* (NA), dan inkubasi pada temperatur 37ºC selama 18-24 jam. Amati koloni yang berwarna putih keruh media NA.

1) Uji Indol

   Koloni dari media NA diinokulasikan pada tabung ber isi SIM dan inkubasikan pada temperatur 35ºC selama 24 jam ± 2 jam. Lalu tambahkan beberapa tetes reagen kovac hingga timbul cincin merah pada lapisan atas untuk hasil positif dan cicin kuning untuk hasil yang negatif.

2) Uji *Methyl Red* (MR)

   Koloni dari media NA diinokulasikan pada tabung berisi 10 mL MR-VP dan inokulasi pada temperatur 35ºC selama 48 jam ± 2 jam. Lalu tambahkan 2-5 tetes indikator MR pada tabung. Amati adanya warna merah untuk hasil positif dan warna kuning untuk hasil negatif.

3) Uji Voges Prokauer (VP)

   Inokulasikan isolate murni bakteri pada media MR-VP dan inkubasi selama 24 jam pada suhu kamar. Tambahnkan 0.6 ml larutan alpha_naphtol 5% dilanjutkan 0,2 ml KOH 40%. Amati perubahan warna selama 30 menit.

4) Uji Sitrat

   Inokulasikan isolate murni bakteri secara goresan zig zag menggunakan ose atau menggunakan jarum inokulasi pada media *simmons citrate agar* miring, kemudian inkubasi selama 24 jam pada suhu kamar. Amati perubahan warna dari hijau menjadi biru.

3.3.3 Pewarnaan Gram

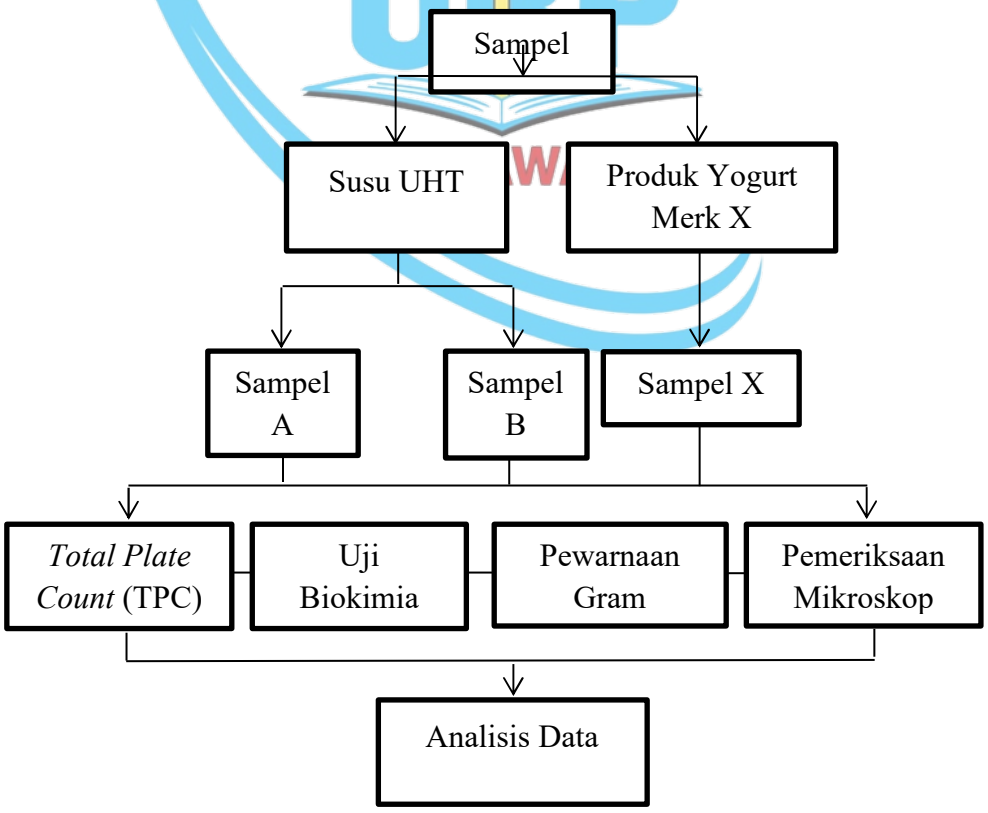
Pada NA, ambil koloni yang berwarna putih keruh dengan ose. Kemudian letakkan diatas kaca preparat, fiksasikan diatas api dengan cara melewatkan kaca preparat diatas api sebanyak dua kali. Teteskan gentian violet sampai seluruh lingkaran tertutupi, tunggu sampai 5 menit. Bersihkan diatas air

mengalir. Lalu teteskan lugol dan tunggu hingga 1 menit. Bersihkan kembali diatas air mengalir. Teteskan alkohol pada seluruh permukaan sampai tidak ada warna yang luntur kembali. Bersihkan kembali diatas air mengalir. Teteskan safranin dan tunggu hingga 2 menit. Bersihkan kembali diatas air mengalir. Keringkan preparat diatas tisu.

3.3.4 Pemeriksaan Mikroskop

Teteskan minyak imersi terlebih dahulu sebanyak satu tetes. Kemudian periksa preparat dibawah mikroskop dari perbesaran paling kecil terlebih dahulu. Setelah menemukan letakan koloni, ganti perbesaran hingga 100 kali. Bentuk *Escherichia coli* yang sesuai adalah berwarna merah, bentuk batang pendek dan koloni tunggal.

3.4 Diagram Alir



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian