

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan merupakan penelitian deskriptif dengan tujuan untuk memberikan gambaran mengenai fenomena yang ingin diteliti dan dalam penelitian ini yaitu bakteri *Escherichia coli* pada sampel udang (Simorangkir, 2020). Metode yang digunakan yaitu metode analisis kualitatif laboratorium yaitu menentukan ada tidaknya cemaran bakteri *Escherichia coli* pada sampel udang.

3.2. Populasi dan Sampel

3.2.1. Populasi

Populasi pada penelitian ini yaitu udang segar dari pasar di Sidoarjo dan kota-kota sekitarnya yang diujikan di Balai KIPM Surabaya I pada tanggal 1 Maret hingga 28 April 2023.

3.2.2. Sampel

Sampel yang digunakan merupakan udang segar yang diuji di Balai KIPM Surabaya I pada tanggal 1 Maret hingga 28 April 2023 tanpa memerhatikan jenis udang yang diuji.

3.3. Waktu dan Tempat Penelitian

Kegiatan penelitian dilakukan pada bulan Maret hingga April tahun 2023 di Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan Surabaya I yang berlokasi di Jalan Raya Bandara Ir. H. Juanda No. 23, Semabung, Kecamatan Gedangan, Kabupaten Sidoarjo, Jawa Timur.

3.4. Bahan dan Alat

a) Bahan

Bahan-bahan yang dibutuhkan pada penelitian yaitu sampel udang, larutan *Butterfield's Phosphate Buffer* (BFP), *Levine's eosin methylen blue agar* (L-EMB), *Tryptone Soya Agar* (TSA) 0% , *Lactose Broth* (LB), *Tryptophan broth* (TB), *MRVP broth*, *Simmon's Citrat Agar*, *aquades*, *compact dry*, *reagen MR, VP, kovac*, dan larutan KOH 40%.

b) Alat

Alat-alat yang dibutuhkan untuk penelitian diantaranya *autoclave*, *oven*, inkubator, *stomacher*, *bag filter*, *hot plate*, kulkas, LAF, neraca analitik, mikro tip, mikropipet, tabung reaksi, tabung durham, cawan petri, dan ose

3.5. Variabel Penelitian

3.5.1. Variabel independen (Variabel bebas)

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu udang yang digunakan sebagai sampel.

3.5.2. Variabel dependen (Variabel terikat)

Variabel dependen pada penelitian ini yaitu bakteri *Escherichia coli* yang terkandung dalam udang.

3.6. Definisi Operasional Penelitian

Tabel 3.1. Tabel definisi operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Skala	Hasil Ukur
Bakteri <i>Escherichia coli</i>	Bakteri gram negatif yang merupakan bakteri patogen pada udang segar yang di uji di BKIPM Surabaya I pada bulan Maret hingga April 2023	Uji <i>Compact Dry</i>	Nominal	(+) koloni berwarna biru
		Uji APM (uji pelengkap)	Nominal	(+) koloni berwarna hijau metalik
		Uji Biokimia 1. Uji Indol 2. Uji MR 3. Uji VP 4. Uji Sitrat 5. Uji Gas Laktosa	Nominal	1. (+) terbentuk cincin merah pada media 2. (+) terbentuk warna merah pada media 3. (+) terbentuk warna merah pada media 4. (+) perubahan warna media dari hijau menjadi biru 5. (+) terjadi kekeruhan dan terbentuk gas

3.7. Prosedur Penelitian

3.7.1. Persiapan

Alat dan media yang akan digunakan disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan metode panas uap selama 2 jam pada suhu 121°C. Media yang telah disterilkan dapat segera digunakan atau disimpan dalam lemari pendingin. Sedangkan alat yang telah steril dikeringkan menggunakan *oven* pada suhu 100°C selama 1 jam atau secukupnya hingga dirasa telah kering. Sterilisasi cawan petri dilakukan menggunakan *oven* dengan metode panas kering selama 2 jam pada suhu 150°C.

1. Pembuatan media :

a) Butterfield's Phosphate Buffer (BFP)

Dibuat larutan stok dengan melarutkan 34 gram KH_2PO_4 dalam 500 mL *aquades*. Atur pH menggunakan NaOH 1N hingga pH menjadi 7,2. Larutan kerja dibuat dengan melarutkan 1 mL larutan stok steril ke dalam 100 mL *aquades* steril (1:10).

b) Levine's eosin methylen blue agar (L-EMB)

Sebanyak 36 gram serbuk L-EMB dilarutkan dalam 1000 mL *aquades*. Media dipanaskan menggunakan hot plate pada suhu 250°C sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah larutan media mendidih dan larut sempurna, media disterilisasi menggunakan autoklaf. Larutan media yang telah disterilisasi dituang dalam cawan petri sebanyak lebih kurang 15 mL.

c) Tryptone Soya Agar (TSA) 0%

Sebanyak 40 gram serbuk TSA dilarutkan dalam 1000 mL *aquades*. Media dipanaskan menggunakan hot plate pada suhu 250°C sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah larutan media mendidih dan larut sempurna, media disterilisasi menggunakan autoklaf. Larutan media yang telah disterilisasi dituang dalam cawan petri sebanyak lebih kurang 15 mL.

d) Lactose Broth (LB)

Serbuk LB ditimbang sebanyak 13,0 gram dan dilarutkan dalam 1000 mL *aquades*. Media dipanaskan menggunakan hot plate pada suhu 250°C sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah larutan media

mendidih dan larut sempurna, media disterilisasi menggunakan autoklaf. Larutan media yang telah disterilisasi dipipet sebanyak 9 mL ke dalam tabung reaksi yang berisi tabung Durham.

e) Tryptophan broth (TB)

Sebanyak 16 gram serbuk TB dilarutkan dalam 1000 mL *aquades*. Media dipanaskan menggunakan hot plate pada suhu 250°C sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah larutan media mendidih dan larut sempurna, media disterilisasi menggunakan autoklaf. Larutan media yang telah disterilisasi dipipet sebanyak 2 mL ke dalam tabung reaksi.

f) MR-VP broth

Sebanyak 17 gram serbuk MR-VP dilarutkan dalam 1000 mL *aquades*. Media dipanaskan menggunakan hot plate pada suhu 250°C sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah larutan media mendidih dan larut sempurna, media disterilisasi menggunakan autoklaf. Larutan media yang telah disterilisasi dipipet ke dalam tabung reaksi sebanyak 3 mL untuk uji MR dan sebanyak 1 mL untuk uji VP.

g) Simmon's Citrat Agar

Sebanyak 24,28 gram serbuk Simmon's Citrat Agar dilarutkan dalam 1000 mL *aquades*. Media dipanaskan menggunakan hot plate pada suhu 250°C sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah larutan media mendidih dan larut sempurna, media disterilisasi menggunakan autoklaf. Larutan media yang telah disterilisasi dipipet sebanyak 5 mL ke dalam tabung reaksi yang dimiringkan sehingga didapatkan media agar miring SCA.

2. Persiapan sampel

Sampel ditimbang sebanyak 10 gram dan dilarutkan dalam 90 mL BFP. Sampel yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam bag filter dan ditambahkan dengan larutan BFP lalu dihomogenkan selama 1 menit menggunakan stomacher.

3.7.2. Pengujian

1. Uji *Compact Dry*

Sampel yang telah dihomogenkan dengan larutan BFP dipipet sebanyak 1,0 mL ke dalam *Compact dry* pada bagian tengah. Larutan sampel akan menyebar

ke bagian samping *Compact dry*. Kemudian inkubasi selama 24 ± 2 jam pada suhu 35°C . Koloni terduga bakteri *Escherichia coli* berwarna biru.

2. Uji APM (pelengkap)

Koloni terduga *E. coli* pada *Compact Dry* diinokulasikan pada media L-EMB agar dan diinkubasi selama 18 – 25 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Koloni *E. coli* pada media L-EMB memiliki warna khas yaitu hitam hijau metalik. Koloni yang terbentuk diinokulasikan pada media TSA dan dilanjutkan dengan uji biokimia.

3. Uji Biokimia

Uji biokimia dilakukan pada koloni yang tumbuh pada media TSA. Uji biokimia diantaranya yaitu,

a) Uji indol

Pada uji ini dilakukan inokulasi pada media TB dan diinkubasi diinkubasi selama 24 jam \pm 2 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Kemudian ditambahkan 0,2 mL – 0,3 mL pereaksi Kovacs yang menunjukkan reaksi positif bila terbentuk cincin merah pada bagian atas media dan reaksi negatif bila terbentuk cincin kuning.

b) Uji MR-VP

Pada uji VP, dari media TSA diinokulasikan pada media MR-VP Broth dan diinkubasi selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Media ditambahkan *alpha naftol* dan KOH 40% dengan perbandingan 3:1 kemudian dikocok dan didiamkan selama 15 menit. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah muda eosin hingga merah delima.

Pada uji MR, media MR-VP diinkubasi kembali selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Kemudian ditambahkan 5 tetes indikator metil merah dengan hasil positif akan terbentuk warna merah dan hasil negatif jika tidak terjadi perubahan warna.

c) Uji Sitrat

Pada uji sitrat, dilakukan inokulasi dari media TSA ke permukaan media Simmon's Citrat Agar miring dan diinkubasi selama 96 jam + 2 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Reaksi yang terjadi yaitu perubahan warna

pada media dari hijau menjadi biru untuk reaksi positif dan tidak terjadi perubahan warna media untuk reaksi negatif.

d) Uji Produksi Gas (Laktosa)

Untuk uji produksi gas, dilakukan inokulasi dari media TSA ke dalam media LB dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Reaksi positif ditunjukkan dengan gas pada tabung durham dan terjadinya kekeruhan .

3.8. Metode Analisis Data

Tabel 3.2. Tabel interpretasi hasil uji biokimia bakteri *E. coli*.

Uji biokimia	Biotipe 1	Biotipe 2
Uji produksi gas	+	+
Uji indol	+	-
Uji MR	+	+
Uji VP	-	-
Uji sitrat	-	+

Sumber : (Badan Standarisasi Nasional, 2015)

Hasil dari uji biokimia dibandingkan dengan tabel 3.2. untuk menentukan ada tidaknya cemaran bakteri *E. coli* pada sampel. Hasil uji biokimia yang tidak sesuai dengan kedua biotipe menunjukkan bahwa bakteri terduga bukan bakteri *E. coli* sehingga menunjukkan hasil negatif *E. coli*.