

III. MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2023.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada metode MPN adalah 25 sampel sarang burung walet berwarna putih (*Collocalia fuciphaga*) asal Jawa, masing masing berisi 10 g sarang burung walet, NaCl, *Brilliant Green Lactose Broth* (BGLB), *Lactose Broth* (LB). Alat yang dipakai yaitu: tabung durham, tabung reaksi, spuit (ukuran 1 ml dan 5 ml), erlenmeyer, gunting, pinset, kapas, stomacher, pembakar bunsen, timbangan, *magnetic stirrer*, pengocok tabung (*vortex*), inkubator, autoklaf, lemari steril (*clean bench*), dan lemari pendingin, *glove* dan wadah steril.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian kuantitatif tentang deteksi cemaran bakteri *coliform* pada sarang burung walet bersih asal Jawa, dengan perhitungan besaran sampel sejumlah 25 sampel.

3.4 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian dengan referensi Standar Nasional Indonesia (SNI 2897:2008) Tentang Metode Pengujian Cemarkan Mikroba Dalam Daging, Telur Dan Susu, serta Hasil Olahannya.

3.4.1 Penyiapan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan metode *purposive sampling* dengan cara timbang sarang burung walet padat sebanyak 10g/sampel secara aseptik kemudian haluskan sarang burung walet hingga menjadi bubuk, masukkan hasil tumbukan halus sarang burung walet ke dalam wadah steril yang berisi 90 ml larutan NaCl dengan perbandingan 1:9, homogenkan suspensi tersebut dengan menggunakan alat stomacher selama 1-2 menit sehingga memperoleh larutan pengenceran 10^{-1} (SNI 2897:2008).

3.4.2 Cara Uji

Pengujian menggunakan tiga seri tabung durham yang umumnya digunakan untuk sampel pangan. Dengan dua uji yaitu pendugaan dan uji konfirmasi, (SNI 2897:2008).

3.4.2.1 Uji Pendugaan

Sebanyak 1 ml larutan dipindahkan kedalam pengenceran 10^{-1} yang berisi 9 ml NaCl, untuk memperoleh pengenceran 10^{-2} . Dilakukan dengan cara yang sama hingga mendapatkan larutan pengenceran 10^{-3} . Kemudian ketiga larutan pengenceran tersebut dipindahkan dengan menggunakan pipet steril ke dalam masing-masing 1 ml dari setiap pengenceran ke dalam tiga seri tabung reaksi yang berisi tabung durham dan *Lactose Broth* (LB). Kemudian dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24-48 jam. Pengamatan dilakukan dengan melihat apakah terdapat gas yang terbentuk di dalam tabung durham. Hasil uji dapat dianggap positif jika gas terbentuk di dalam tabung durham (SNI 2897:2008).

3.4.2.2 Uji Konfirmasi (Peneguhan)

Setelah dilakukan uji pendugaan langkah selanjutnya yaitu uji konfirmasi dengan cara memindahkan tabung positif dari uji pendugaan dari setiap tabung *Lactose Broth* (LB) ke dalam tabung yang berisi tabung durham dan *Brilliant Green Lactose Broth* (BGLB) kemudian inkubasikan tabung reaksi yang berisi larutan tersebut pada temperatur $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama ± 48 jam. Pengamatan dilakukan dengan memperhatikan gas yang terbentuk di dalam tabung durham dan dapat dinyatakan positif. Kemudian menggunakan tabel *Most Probable Numbers* (MPN) untuk mendapatkan nilai MPN berdasarkan jumlah tabung *Brilliant Green Lactose Broth* (BGLB) positif sebagai *coliform* per mililiter atau gram. (SNI 2897:2008).

3.5 Analisis Data

3.5.1 Perhitungan MPN

Jumlah bakteri *coliform* pada sampel uji diinterpretasikan dengan menggabungkan jumlah tabung dengan hasil positif berdasarkan tabel nilai MPN. Penggabungan dilakukan dari pengenceran tertinggi yang memberikan tabung hasil positif, sementara itu pengenceran berikutnya berisi tabung negatif. Kombinasi yang digunakan terdiri dari tiga pengenceran (SNI 2897:2008). Nilai MPN tabel dirujuk dari buku *Microbiology: A Laboratory Manual 7th Edition* karangan Cappuccino, dkk (2005). Nilai MPN coliform dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Nilai MPN coliform} = \text{Nilai MPN Tabel} \times \frac{1}{\text{tingkat pengenceran tengah}}$$

3.6 Kerangka Penelitian

