

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga Surabaya. Pelaksanaan penelitian ini dimulai pada bulan Februari 2023.

#### **3.2 Bahan dan Alat Penelitian**

##### **3.2.1 Bahan yang Digunakan dalam Penelitian**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain; sampel kotoran burung walet sebanyak 20 gram, media pertumbuhan bakteri yang terdiri dari, media *enrichment* BPW (*Buffered Peptone Water*), media selektif EMBA (*Eosin Methylene Blue Agar*), SIM (*Sulfide Indole Motility*), SCA (*Simmons Citrate Agar*), MR-VP (*Methyl Red-Voges Proskauer*) dan media uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*). Pewarnaan gram (kristal violet, lugol, alkohol 70%, dan safranin), aquades steril, reagent *kovac's*, KOH 40%,  $\alpha$ -naftol, *methyl red*, garam fisiologis (NaCl), kapas, spiritus, dan minyak imersi.

##### **3.2.2 Alat yang Digunakan dalam Penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain; spatula spoon, plastic steril, *gloves*, korek api, api bunsen, *sprayer* berisi alkohol 70%, *plastic wrap*, *aluminium foil*, kertas label, alat tulis untuk mencatat hasil sampling, tabung reaksi dan rak tabung reaksi, gelas erlenmeyer dan cawan petri, *plastic wrap* dan *aluminium foil*, timbangan, vortex, pipet, *ose*, kompor, laminar air flow, mikroskop dan kamera digital, *object glass*, *sprayer*, masker, jas laboratorium, dan tisu.

### **3.3 Prosedur Penelitian**

#### **3.3.1 Pengambilan Sampel**

Sebanyak 20 sampel burung walet diperoleh melalui beberapa petani burung walet di Jawa Tengah dengan menggunakan teknik *random sampling*.

#### **3.3.2 Isolasi Bakteri**

Isolasi *E. coli* dengan menggunakan uji mikrobiologi berdasarkan metode analisis uji bakteri enteropatogenik *E. coli* (EPEC). Sampel yang diambil dihomogenkan dengan BPW. Sebanyak 1 gram sampel yang telah dikoreksi dilakukan pengenceran menggunakan 9 ml BPW. Inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C (dilakukan dengan cara pengenceran bertingkat dengan perbandingan pengenceran 1:9), sehingga diperoleh pengenceran 1/10 untuk setiap tingkat pengencerannya. Inokulasi pada media selektif EMBA dengan cara streak ke cawan petri. Dilakukan inkubasi bakteri dengan suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya, dilakukan pemurnian pada media EMBA selama 24 jam untuk mendapat koloni tunggal. Target pemurnian ini sendiri adalah setiap koloni yang berwarna hijau metalik (Katon dkk, 2020).

Pemurnian bakteri menggunakan metode cawan gores (*streak plate*) pada media EMBA. Karakteristik biokimia dilakukan uji fisiologis yaitu, uji indol (SIM), uji MR-VP, uji *citrate*, dan uji fermentasi gula dengan TSIA (Fitriasari, 2020)

### **3.3.3 Identifikasi Bakteri**

#### **3.3.3.1 Pengamatan Makroskopis Bakteri**

Koloni bakteri diinokulasikan dengan cara penuangan pada media selektif dan menggoreskan dengan mode *slant* (miring) pada pemurnian isolat bakteri di cawan petri. Kemudian inkubasi dengan kurun waktu 24 jam. Pengamatan makroskopis pada media pertumbuhan bakteri media selektif dalam cawan petri meliputi pigmentasi, bentuk koloni, dan elevasi (Susanti dkk, 2017).

#### **3.3.3.2 Pengamatan Mikroskopis Koloni**

##### **1. Pembuatan Preparat Olesan Bakteri**

Objek glass ditetesi dengan aquadest steril menggunakan ose. Biakan bakteri dari media pertumbuhan diambil beberapa koloni untuk diletakkan dalam tetesan aquades. Ratakan tetesan tersebut hingga terbentuk lapisan tipis. Keringkan tetesan, lakukan fiksasi dengan meletakkan objek glass diatas nyala api spiritus berulang antara 3-4 kali (Nurhidayati dkk, 2015).

##### **2. Pewarnaan Gram**

Pada preparat, diberikan beberapa tetes larutan kristal violet. Cuci preparat dengan air mengalir, usap dengan hati-hati. Berikan beberapa tetes larutan lugol, diamkan preparat beberapa menit. Cuci preparat menggunakan air mengalir. Tetesi preparat menggunakan alkohol, diamkan preparat beberapa detik. Tetesi preparat menggunakan safranin, diamkan beberapa detik. Cuci dan keringkan preparat dengan hati-hati.

Amati preparat di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x menggunakan minyak emersi (Rahmatullah dkk, 2021).

### 3.3.3.3 Uji Biokimia

Tahap uji fisiologis dalam penelitian ini, meliputi uji fermentasi gula, H<sub>2</sub>S dengan TSIA, uji motilitas (SIM), uji MR-VP, dan uji *citrate* (SCA).

#### 1. Uji motilitas (SIM)

Inokulasi isolat bakteri pada media SIM menggunakan ose tusuk steril. Inkubasi 24 jam dengan suhu 37°C. Media ditambahkan 10-12 tetes reagen *Kovac's*. Uji positif ditandai dengan bakteri yang menyebar (seperti pohon cemara terbalik), maka dapat dibilang jika bakteri tersebut bergerak (motil) dan apabila pertumbuhan bakteri tidak menyebar atau hanya berupa satu garis, maka bakteri tersebut dikatakan tidak bergerak (non motil) (Rahayu dkk, 2018).

#### 2. Uji fermentasi gula H<sub>2</sub>S dan gas dengan TSIA

Inokulasi bakteri pada media TSIA, dengan inokulasi tegak lurus pada bagian tegak (*butt*) dan miring (*slant*). Inkubasi bakteri pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji positif ditandai dengan perubahan warna pada media dan bentukan gas. Pada bagian miring (*slant*) dan tusuk (*butt*) keduanya berwarna kuning, maka bakteri mampu memfermentasikan sukrosa dan laktosa. Hasil yang ditambah gas, ditunjukkan gelembung udara pada media. Warna hitam menunjukkan adanya produksi H<sub>2</sub>S (Rahayu dkk, 2018).

### 3. Uji MR-VP

Inokulasi bakteri pada media MR-VP, dengan inokulasi tegak pada media serta dilakukan vortex. Inkubasi bakteri pada suhu 37°C selama 24 jam. Media ditambahkan 3-4 tetes indikator *methyl red*, dihomogenkan menggunakan vortex. Uji positif ditandai dengan terdapat perubahan warna media menjadi merah. Sedangkan untuk uji VP (*Voge's Proskauer*), tambahkan 5-10 tetes  $\alpha$  naphthol 5% dan KOH 40% kemudian dihomogenkan menggunakan vortex. Uji positif ditandai dengan warna kuning pada media. (Rahayu dkk, 2018).

### 4. Uji Sitrat (SCA)

Inokulasi bakteri pada media SCA, dengan inokulasi miring. Inkubasi bakteri pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji positif ditandai dengan terdapat perubahan warna media menjadi biru. Jika hasil negatif, warna media tidak berubah. (Rahayu dkk, 2018).

## 3.4 Analisis Data

Penelitian kali ini bersifat deskriptif dengan membandingkan secara langsung hasil penelitian yang dilakukan.

### 3.5 Kerangka Prosedur Penelitian

