

III. MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dikerjakan selama dua bulan, dengan menentukan pengambilan sampel di Kabupaten Sidoarjo. Kemudian diisolasi dan diidentifikasi di Laboratorium Departemen Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya.

3.2. Materi Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang akan digunakan pada penelitian ini diantaranya adalah sampel feses dari swab kloaka ayam pedaging, *Buffered Peptone Water* (BPW), *MacConkey agar* (MCA) (HIMEDIA® MH081), *Mueller Hinton Agar* (MHA) (HIMEDIA®), *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) (HIMEDIA® M021), *Simons Citrate Agar* (SCA) (HIMEDIA® M099), *Sulfide Indol Motility* (SIM)(HIMEDIA® M181), *Urease* (HIMEDIA® M112), *Methyl-Red* (MR) (HIMEDIA®) dan *Voges-Praskeur* (VP) (HIMEDIA®, Standart *Mc Farland* nomor 0,5, NaCl fisiologis, *Ampisilin Antimicrobial Susceptibility Discs* (AMP) 10µg Oxoid®, *Amoksisilin Antimicrobial Susceptibility Discs* (AMC) 30µg Oxoid®, aquadest steril, kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin, reagen Kovac, α -naphthol 5%, KOH 40%, larutan *methyl red*, spirtus.

3.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu tabung reaksi, vortex, *cotton swab* steril, Erlenmeyer 250 mL, tabung reaksi steril, cawan Petri steril, pinset, spuit, kapas, ose bulat (*inoculating loop*), ose runcing (*inoculating needle*), pembakar bunsen, korek api, autoclave, inkubator, rak tabung, kompor, panci, gelas ukur, batang pengaduk, mikroskop, *object glass*, *oil immersion*, *cool box*, *thermafreeze ice gel*, lemari pendingin, jangka sorong, timbangan analitik, aluminium foil, kertas timbangan / perkamen, kertas label, pinset, spidol, pulpen, plastik, gunting, sabun cuci, *brush tube*, kamera, dan buku.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini termasuk penelitian deskriptif observasional dengan metode pengambilan sampel secara *simple random sampling* atau sampling acak sederhana. Simple random sampling merupakan metode untuk penentuan lokasi dan sampel yang dilakukan secara acak mulai dari menentukan jumlah sampel yang akan diteliti, memberikan urutan nomor pada semua satuan sampel yang diambil untuk mewakili wilayah penelitian sesuai dengan pengambilan sampel secara keseluruhan. Menurut Harahap *et al.*, (2018), *Simple random sampling* adalah salah satu metode yang digunakan untuk memilih sampel dari populasi secara acak sederhana sehingga dari setiap anggota populasi mempunyai peluang yang sama besar untuk digunakan sebagai sampel. *Simple random sampling* biasa digunakan jika populasi yang digunakan bersifat homogen. Ukuran sampel lebih besar dari 30 dan kurang dari 500 sesuai untuk sebagian besar penelitian (Alwi,

2015).

3.3.2 Teknik Pengambilan dan Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yakni dari swab feses sebanyak 50 ayam broiler yang di jual di Pasar wilayah Buduran, Larangan, Sedati, Waru, Gedangan, Sepanjang, dan Sukodono. Teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah *simple random sampling* dengan metode *swab* kloaka yang diambil dari masing-masing pasar dengan total keseluruhan 50 sampel.

3.3.3 Sterilisasi Peralatan

Kondisi yang baik digunakan untuk sterilisasi adalah pada suhu 121°C, 15 *Pounds per Square Inch* (Psi) selama kurang lebih 15 menit. Penggunaan autoklaf yang efisien dan agar uap dapat menembus ke dalam setiap instrumen yang akan disterilkan, autoklaf tidak boleh terlalu penuh sehingga uap benar-benar menembus semua area (Winarsih, 2020). Strandar pengisian autoklaf dengan air hingga batas yang ditentukan. Tutup autoklaf kembali dan kencangkan kait pengaman, nyalakan autoklaf dan pengatur waktu minimal 15 menit pada suhu 121°C Tunggu air mendidih, uap memenuhi kompartemen dan udara didorong keluar, lalu kencangkan katup pengaman, tunggu proses selesai, hitung mundur 15 menit. setelah tekanan mencapai 2 atmosfer. Setelah alarm berbunyi dan proses selesai, tunggu hingga tekanan di dalam bilik turun dan tekanannya sama dengan tekanan udara luar lalu buka kait pengaman.

Steril basah bahan dan alat yang dapat disterilkan dalam autoklaf antara lain media, akuades dalam erlenmeyer dan tabung reaksi. Bahan dan alat yang

tidak terpakai dan bekas dikemas plastik tahan panas. Steril kering bahan dan alat seperti cawan petri dan pinset dapat disterilkan di dalam autoklaf perlu dipastikan sebelum dimasukkan harus dibungkus dengan kertas.

3.3.4 Isolasi Bakteri *Escherichia coli*

Sampel swab kotoran dikumpulkan menggunakan kapas steril dan ditempatkan dalam tabung reaksi yang berisi BPW, yang ditutup dan disimpan dalam *cool box* pada suhu 4°C untuk pengujian laboratorium. Bakteri *Escherichia coli* diisolasi pada media MCA dengan metode *streak/goresan*, setelah itu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh pada media MCA dicirikan oleh warna bulat, halus dan merah (Apriyanthi *et al.*, 2022).

3.3.5 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram adalah metode pewarnaan bakteri yang populer dalam ilmu bakteriologi. Metode pewarnaan ini, bakteri dapat mampu untuk dibedakan menjadi dua kelompok yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif (Apriyanthi *et al.*, 2022). Dengan menggunakan ose, diambil koloni terpisah, untuk membuat lapisan tipis pada slide yang bersih. Setelah lapisan kering, perbaiki dengan menyentuh permukaan bawah lensa objektif berulang tiga kali ke permukaan api Bunsen. Penambahan tetesan dari larutan kristal violet, didiamkan rentan waktu 3-5 menit lalu cuci dengan air. Kemudian tambahkan larutan Lugol dan biarkan selama 3-5 menit, lalu bilas dengan air. Sediaan didekontaminasi dengan konsentrasi alkohol 96% sampai semua noda tampak hilang, kemudian dibilas dengan air mengalir. Pemberian warna kontras safranin dan kemudian dituangkan air mengalir. Setelah pewarnaan dengan pewarna dasar akan

menunjukkan warna ungu karena pewarnaan kristal violet dan tidak lagi menyerap pewarna kontras. Bakteri dengan karakteristik sesuai dengan klasifikasi sebagai bakteri Gram positif. Sedangkan kelompok bakteri yang telah diwarnai zat warna dasar dan dibersihkan setelah perlakuan alkohol akan menyerap zat warna safranin yang digunakan sebagai zat warna kontras, sehingga komposisinya menjadi merah (safranin). Kelompok bakteri semacam itu disebut bakteri Gram negatif.

3.3.6 Uji Biokimia

Media TSIA merupakan media yang digunakan untuk melihat kemampuan dari mikroorganisme untuk memfermentasi gula. Media TSIA digunakan dalam uji biokimia untuk pemisahan beberapa bakteri tergolong dalam kelompok *Enterobacteriaceae* (Saidah dan Susilawati, 2018). Isolat murni dapat diinokulasi pada media TSIA dengan tusukkan pada bagian dasar dan di streak pada bidang miring, diinkubasi dalam suhu inkubator selama 24-48 jam. Terjadi perubahan warna setelah diamati pada media setelah inkubasi, apabila media berubah warna menjadi merah atau tetap warna semula menandakan telah terjadi reaksi alkali (K), jika warna media berubah menjadi kuning telah menunjukkan terjadi reaksi asam (A). Serta dapat diamati terbentuknya gas pada bagian dasar media (Sari *et al.*, 2019).

Uji sitrat bertujuan untuk mengetahui kemampuan suatu bakteri dalam menggunakan sitrat sebagai sumber karbon dalam menghasilkan energi. Sebagian kultur diinokulasikan ke dalam media Simmons sitrat, diikuti dengan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Warna biru berarti hasil positif, warna hijau berarti hasil negatif (Sari *et al.*, 2019).

Uji indol, media pepton kaya asam amino triptofan, yang diinokulasi dan ditumbuhkan selama 24 jam. Oleh karena itu, bakteri *Escherichia coli* mampu menghasilkan enzim triptofanase yang membentuk indol. Pengujian ini memanfaatkan *tryptone broth* dengan penambahan reagen *Kovacs*. Uji indole dengan *Escherichia coli* dinyatakan negatif karena tidak terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Hal ini menunjukkan bakteri tersebut tidak menghasilkan indol dari triptofan sebagai sumber karbon. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya warna merah atau pink pada permukaan (Saidah dan Susilawati, 2018).

Tujuan dari uji urease adalah untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mengubah urea menjadi amonia. Buffer Urea digunakan dalam media uji urease. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna yang terjadi pada media dari kuning menjadi merah muda (Ulfa *et al.*, 2016).

Uji MR digunakan untuk mengetahui bakteri mampu dalam melakukan fermentasi asam campuran. Hasil uji MR pada strain bakteri *Escherichia coli* menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan perubahan warna merah pada media. Bakteri suspek *Escherichia coli* diinokulasikan ke dalam media selama 48-72 jam pada suhu 37°C, setelah itu ditambahkan 5 tetes reagen ke dalam 1 ml media (Sarudji *et al.*, 2017).

Voges-Proskauer (VP) uji ini dimanfaatkan untuk mendeteksi senyawa asetoin yang disebut juga asetil-metil-karbinol, yang menunjukkan terjadinya fermentasi 2,3 butilen glikol yang negatif untuk *Escherichia coli* (Saidah dan

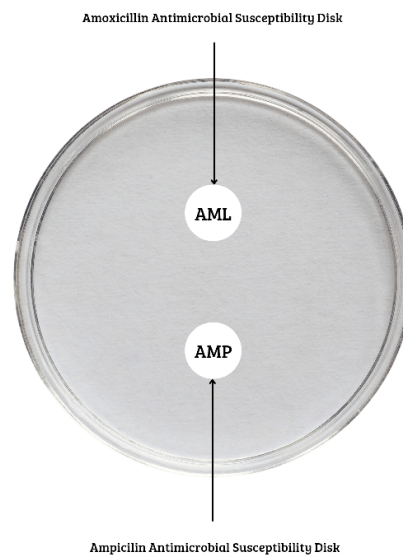
Susilawati, 2018). Menggunakan hasil inkubasi yang telah diinokulasikan koloni ke dalam media MR-VP, lalu ditambahkan 3 tetes dari larutan alfa naftol dan 2 tetes larutan KOH 40%, dan didiamkan beberapa menit. Warna merah muda hingga merah tua telah menunjukkan hasil positif, jika tidak terjadi perubahan warna maka menunjukkan hasil negatif (Sari *et al.*, 2019).

3.3.7 Uji Sensitivitas Antibiotik

Uji sensitivitas antibiotik penelitian ini menggunakan metode *Kirby-Beuer* yang memanfaatkan metode *disk diffusion* untuk menghasilkan kategori yang bersifat kualitatif dengan indikator penilaian tergolong sensitif, intermediet dan resisten. Koloni bakteri yang digunakan dalam metode ini harus memiliki kekeruhan sesuai dengan standart *McFarland* No.1. Biakan bakteri yang diperoleh dari koloni media MCA dipindahkan ditabung reaksi yang berisi 8 ml NaCl fisiologis, selanjutnya dilakukan homogenisasi menggunakan alat vortex sampai didapatkan kekeruhan yang sama dengan kesesuaian standart *McFarland* No.1. Kemudian dilanjutkan dengan tetesan pada media MHA 0,2 ml dari suspensi sampel tersebut dan di *streak* secara perlahan pada seluruh permukaan media *Muller Hinton Agar* (MHA) lalu dilanjutkan dengan peletakan *paper disk* antibiotik ampisilin dan amoksisilin sejajar pada media tersebut, *paper disk* diambil menggunakan pinset steril. *Paper disk* sedikit ditekan pada permukaan agar antibiotik supaya meresap dengan baik kemudian diinkubasi 37 °C selama 24 jam (Rahmaniar *et al.*, 2020).

Hasil pada pengujian ini dapat diamati dengan adanya daerah bening atau jernih disekitar cakram (*paper disk*), sebagai daerah hambatan (*zona inhibisi*) pada

pertumbuhan bakteri pada media *Muller Hinton Agar* (MHA). Zona inhibisi pada penelitian dapat dianalisa dengan interpretasi zona inhibisi standart *Kirby-Bauer* setelah inkubasi, dilakukan pengamatan adanya diameter zona hambatan pertumbuhan bakteri di luar *paper disk* tersebut (Muhammad *et al.*, 2018).



Gambar 3.4 Pola Peletakan Disk Antibiotik Uji Resistensi

3.3.8 Pengukuran Zona Hambat

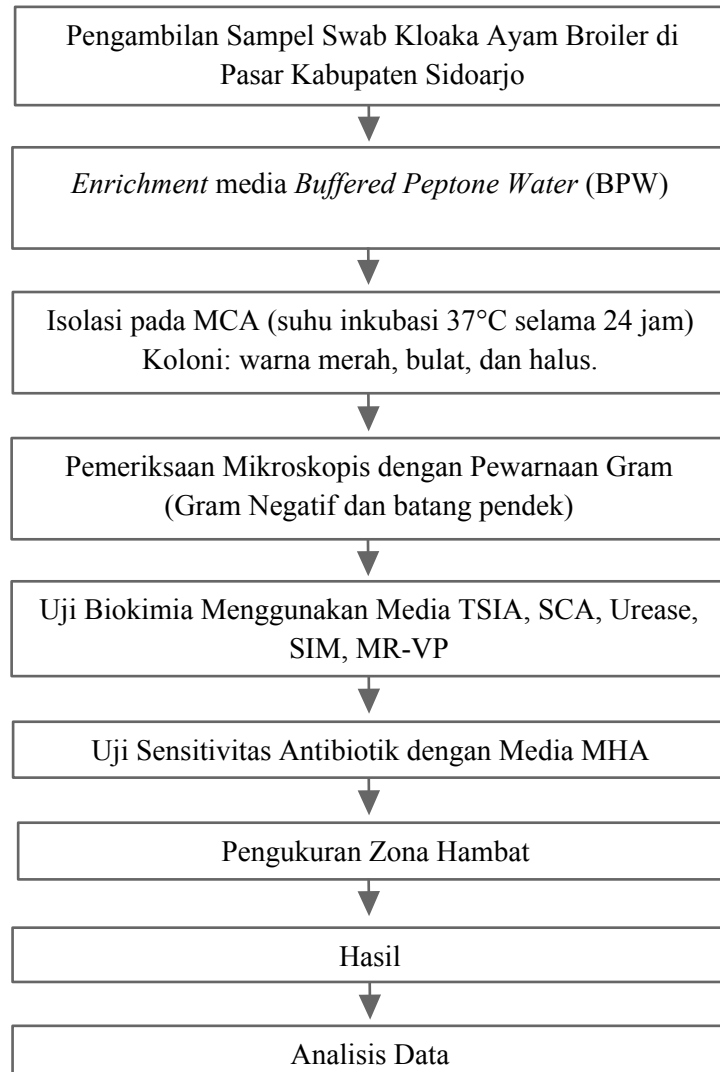
Pengukuran zona hambat dapat dilakukan dengan cara mengambil garis secara horizontal pada zona bening di sekitar *paper disk* menggunakan jangka sorong (Novaryatiin *et al.*, 2018). Metode pengukuran zona hambat ini dilakukan dengan cara mengambil tarikan garis ukur horizontal pada zona bening di sekitar disk menggunakan jangka sorong (CLSI, 2020).

3.5 Tabel Standar Kepekaan antibiotik untuk *Enterobacteriaceae* (CLSI, 2020)

Golongan	Antibiotik	Kode	Kandungan Disk	Diameter Zona Hambat		
				Sensitive	Intermediet	Resisten
Penisilin	Amoksisilin	AML	10/20 µg	≥18	14-17	≤13
	Ampisilin	AMP	10 µg	≥17	14-16	≤13

3.4 Teknik Pengolahan Data

3.4.1 Kerangka Penelitian



3.4.2 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif. Hasil status resisten bakteri *Escherichia coli* yang diisolasi dari swab kloaka pada ayam broiler terhadap antibiotik betalaktam (ampisilin dan amoksisilin), disajikan dalam bentuk tabel dan gambar. Analisis deksriptif adalah bidang statistik yang membahas tentang metode pengumpulan, menyederhanakan dan menyajikan data sehingga didapatkan informasi.