

III. MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2024.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Sampel Penelitian

Sampel penelitian terbagi menjadi 20 sosis yang diambil secara acak dari 5 pasar tradisional dan 20 sosis yang diambil secara acak dari 5 pasar swalayan yang berada di wilayah Surabaya Barat. Sehingga total ada 40 sampel, adapun jumlah sampel ini merupakan rentang jumlah sampel layak dalam penelitian yaitu antara 30 sampai 500 (Sugiyono, 2013).

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah sosis, safranin, kristal violet, lugol, oil emersi, alkohol 95%, alkohol 70%, spiritus, kapas bola, media *Eosin methylene blue agar* (EMBA), media *nutrient agar* (NA), media *Triple sugar iron agar* (TSIA), media MR-VP, media *tryptone broth*, media *Simmons citrate agar* (SCA), reagen kovach, reagen alpha naphthol dengan 40% KOH, NaCl fisiologis, dan akuades

3.2.3 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini ialah masker medis, vortex, kompor listrik, kantong asi, korek api, penjepit kayu, spidol, rak

tabung reaksi, kertas tempel, toples, gloves, spreader, bunsen, spatel, ose bulat, pipet tetes steril, ose lurus, cawan petri, inkubator, tabung reaksi, erlenmeyer, autoklaf, timbangan analitik, spuit tuberculin, aluminium foil, plastik klip, stamper, mortir, sendok teh plastik, dan semprotan alkohol.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian observatif deskriptif yakni penelitian yang bertujuan untuk mendapatkan data terhadap suatu permasalahan sebagai pembuktian terhadap informasi yang diperoleh sebelumnya.

3.3.2 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini terdiri dari variabel bebas, terikat, dan kendali. Variabel bebas adalah bakteri *Escherichia coli* dan total bakteri (TPC). Variabel terikat ialah sosis. Variabel kendali yakni asal dan penyimpanan sosis.

3.4 Teknik Pengambilan Sampel

Sampel penelitian terbagi menjadi 20 sosis yang diambil secara acak dari 5 pasar tradisional dan 20 sosis yang diambil secara acak dari 5 pasar swalayan yang berada di wilayah Surabaya Barat. Sampel kemudian dikemas plastik dan terpisah setiap sampelnya dengan temperatur penyimpanan mengikuti suhu ruang

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Tahap Persiapan Penelitian

Tahap persiapan penelitian dimulai dengan mempersiapkan alat dan bahan yang diperlukan selama penelitian berlangsung. Tahap persiapan berikutnya yaitu mencuci bersih alat-alat penelitian kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf tekanan 1 atm suhu 121°C selama 20 menit. Setelah alat disterilisasi, disiapkan bahan dan media penelitian.

3.5.2 Pembuatan Suspensi dan Metode Pengenceran

Larutan sampel sosis sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian sampel ditambahkan dengan larutan akuades sebanyak 9 ml untuk mengencerkan sediaan menjadi 10^{-1} (P1). Lalu dihomogenkan, ambil 1 ml suspensi dari P1 dipindahkan ke tabung reaksi dengan media 9 ml akuades untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} (P2). Sampel diencerkan hingga pengenceran 10^{-5} (P5). Lalu ambil suspensi 1 ml dari hasil pengenceran, dilakukan inokulasi pada media NA dengan metode tuang kemudian disimpan didalam ruang inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, dilanjutkan dengan perhitungan TPC .

3.5.3 Teknik Perhitungan Total Bakteri (TPC)

Bakteri yang sudah tumbuh pada media *plate count agar* yang menggunakan NA dihitung menggunakan spidol. Adapun persyaratan data yang dipakai mengacu pada Markey *et al* (2013), Yusmaniar dkk (2017), dan Nurhayati (2017) yaitu koloni berupa bentukan seperti titik yang tampak secara visual pada media tumbuh serta terdiri dari jumlah kisaran

30 hingga 300 koloni. Menurut Palawe dan Antahari (2018), apabila sudah sesuai persyaratan, maka dapat dilanjutkan dengan perhitungan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{TPC} = \text{jumlah koloni pada cawan petri} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

3.5.4 Isolasi Bakteri *E.coli* dengan EMBA

Eosin methylene blue agar (EMBA) memiliki kandungan laktosa dan gula sukrosa. Bakteri yang dapat memfermentasi laktosa akan menghasilkan koloni dengan inti berwarna gelap dan kilap logam (*metallic sheen*), sedangkan bagi yang tidak maka tidak akan berwarna. Media ini cocok untuk menguji *Escherichia coli* karena memiliki warna pertumbuhan khas yakni hijau metalik (*metallic sheen*) terjadinya pengendapan methylene blue akibat peningkatan kadar asam dalam media oleh aktivitas bakteri (Nurhayati, 2017; Yusmaniar dkk., 2017).

Disiapkan alat dan bahan pembuatan EMBA di dalam *laminar air flow*. Sampel berupa larutan sosis dengan akuades yang telah dihomogenkan diinokulasikan kedalam media EMBA dengan metode *streak* kemudian disimpan didalam ruang inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.5.5 Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram dilakukan setelah didapatkan hasil isolasi bakteri dengan EMBA berupa suspek bakteri *Escherichia coli* yaitu koloni berwarna metallic sheen. Koloni suspek diambil 1 lop dan diletakkan pada *object glass*. Lalu *object glass* difiksasi menggunakan kristal violet dan

didiamkan selama 1 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir. Kemudian ditetesi alkohol dan didiamkan selama 30 menit dan setelahnya dibilas dengan air mengalir. Selanjutnya sediaan ditetesi safranin dan didiamkan selama 1 menit kemudian dibilas dengan air mengalir. Terakhir sediaan difiksasi dengan *oil emersi* dan diamati dibawah mikroskop (Ummamie dkk., 2017).

3.5.6 Identifikasi Bakteri *E.coli* dengan Uji Biokimia

Tahapan uji *Sulfite indole motility* (SIM) dilakukan dengan mengambil 1 lop biakan dari media kemudian diinokulasikan pada media *tryptone broth* dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah inkubasi sampel ditambahkan pereaksi indol kedalam tabung dan diamati perubahan yang terjadi. Apabila positif ditandai dengan terbentuknya cincin indol berwarna merah muda setelah ditetesi reagen Kovach (Kartikasari dkk., 2019).

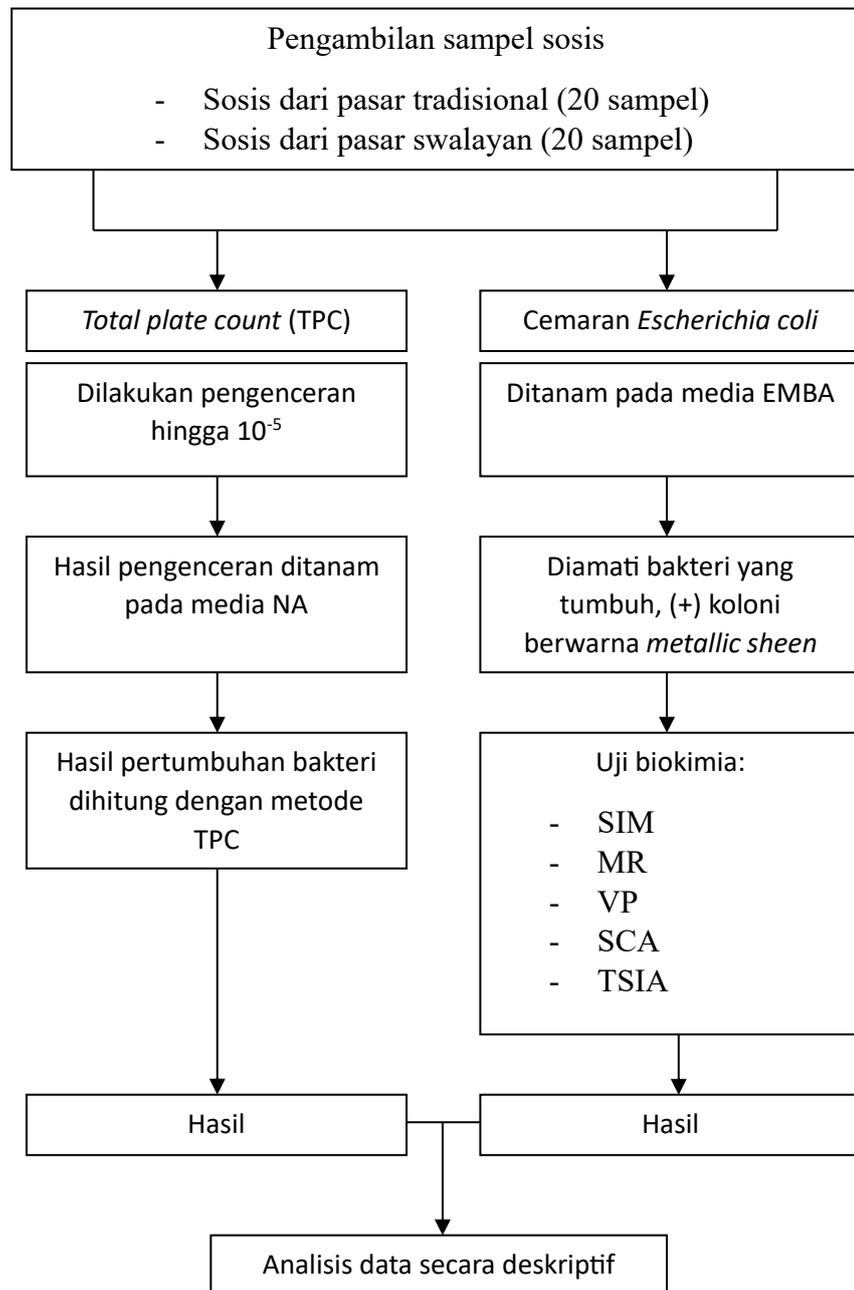
Tahapan uji reaksi *Methyl red* dilakukan dengan mengambil 1 lop biakan dari media kemudian diinokulasikan pada media pembedahan MR-VP dan selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam. Setelah inkubasi sampel ditambahkan reagen *Methyl red* kemudian dihomogenkan dengan vortex dan diamati perubahan yang terjadi. Apabila positif bakteri *Escherichia coli* adalah ditunjukkan dengan larutan berwarna merah ataupun orange sedangkan berwarna kuning berarti negatif (Rahayu dan Gumilar, 2017).

Tahapan uji reaksi *Voges proskauer* dilakukan dengan mengambil 1 lop biakan dari media kemudian diinokulasikan pada media pembedahan MR-VP dan selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam. Setelah inkubasi, sampel ditambahkan reagen 0.6 ml alpha naphthol dan 0.2 ml 40% KOH kemudian dihomogenkan dengan vortex dan didiamkan selama 2-4 jam. Setelah inkubasi penambahan reagen diamati perubahan yang terjadi. Apabila positif akan ada perubahan warna media dari kuning menjadi merah (Rahayu dan Gumilar, 2017).

Tahapan uji *Simmons citrate agar* (SCA) dilakukan dengan mengambil 1 lop biakan lalu dimasukkan kedalam media SCA dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48-96 jam. Setelah inkubasi amati, jika bakteri mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbonnya maka akan menaikkan pH dan mengubah warna medium biakan dari hijau menjadi biru (Fatimawati, 2014).

Tahapan uji *Triple sugar iron agar* (TSIA) dilakukan dengan mengambil koloni biakan dengan ose lurus kemudian menusukkannya dengan tegak dan digoreskan pada bagian *slant*. Media kemudian diinkubasikan dengan suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah inkubasi amati bagian *slant* dan *butt*, apabila berwarna kuning maka menunjukkan suasana asam dikarenakan bakteri *Escherichia coli* pada media TSIA dapat memfermentasi glukosa, laktosa, dan sukrosa (Ummamie dkk., 2017).

3.6 Kerangka Prosedur Penelitian



3.7 Analisis Data

Data yang didapat akan dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan secara langsung hasil dari penelitian yang dilakukan.