

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian tentang identifikasi *E. coli* pada es batu yang dijual pada warung makan jalan Bumi Kelurahan Oesapa Selatan Kecamatan Kelapa Lima, Kota Kupang merupakan jenis penelitian deskriptif kualitatif yaitu bertujuan untuk mengidentifikasi keberadaan cemaran bakteri *E. coli* pada es batu.

B. Tempat dan waktu penelitian

1. Tempat penelitian

a. Tempat pengambilan sampel

Sampel penelitian diambil pada warung makan jalan Bumi Kelurahan Oesapa Selatan Kecamatan Kelapa Lima Kota Kupang.

b. Tempat pemeriksaan sampel

Sampel penelitian diperiksa di Laboratorium Bakteriologi Prodi TLM.

2. Waktu

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari-Maret 2025.

C. Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini variabel tunggal yaitu identifikasi *E. coli* pada es batu yang dijual pada warung makan jalan Bumi Kelurahan Oesapa Selatan Kecamatan Kelapa Lima Kota Kupang.

D. Populasi

Populasi penelitian ini adalah semua es batu yang dijual di warung makan jalan bumi yang berjumlah 20 warung makan.

E. Sampel dan Teknik Sampling

1. Sampel

Sampel penelitian terdiri dari 20 es batu yang diambil dari 20 warung makan yang berbeda, menggunakan metode *Total Sampling*.

2. Teknik sampling

Teknik pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah teknik total populasi yaitu dengan teknik pengambilan 20 sampel dari 20 warung makan yang ada di Jalan Bumi Kelurahan Oesapa Selatan Kecamatan Kelapa Lima Kota Kupang.

F. Definisi operasional

Tabel 3.1. Definisi Operasional

No	Variabel	Defenisi	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Uji cemaran bakteri <i>E. coli</i>	melihat cemaran bakteri <i>E. coli</i> pada es batu melalui uji LB, EMBA	LB Positif : keruh dan gas pada tabung durham Negatif : tidak keruh dan tidak ada gas dalam tabung durham EMBA Positif : koloni berwarna hijau metalik Negatif : koloni tidak berwarna hijau metalik ENDO Positif : koloni berwarna merah gelap metalik Negatif : koloni tidak tidak berwarna merah gelap metalik	Nominal
2.	Pewarnaan gram	Teknik yang digunakan untuk melihat ciri-ciri dari bakteri <i>E. coli</i> .	Positif : bakteri berwarna merah dan bentuk batang (gram negatif) Negatif : bakteri tidak berwarna merah atau tidak berbentuk batang (gram positif)	Nominal

3.	Uji biokimia	Uji yang digunakan untuk mengidentifikasi adanya cemaran bakteri <i>E. coli</i> melalui uji IMVIC dan TSIA.	Indol : terbentuk lapisan (cincin berwarna merah MR : terbentuk warna merah VP : tidak terbentuk warna merah Citrat : tidak terjadi perubahan warna pada media TSIA : positif akan berwarna merah pada agar miring dan kuning pada agar tegak	Nominal
----	--------------	---	---	---------

G. Prosedur Penelitian

1. Tahap perencanaan

- Mengajukan proposal penelitian dan mendapatkan persetujuan dari pembimbing penelitian
- Pengajuan dan pengurusan kode etik penelitian
- Mengurus permohonan ijin penelitian
- Survey lokasi pengambilan sampel

2. Tahap persiapan alat dan bahan

a. Alat

Alat yang dipakai dalam studi ini meliputi autoclave, inkubator, pengaduk, gelas beaker, cawan petri, labu erlenmeyer, gelas ukur, hot plate, tabung durham, tabung reaksi, rak untuk tabung reaksi, pipet tetes, objek kaca, ose bulat, ose jarum, lampu spritus, spidol, korek api, oven, rak pewarnaan, timbangan analitik, mikroskop.

b. Bahan

Bahan yang dipakai dalam studi ini mencakup es batu, alkohol 70%, aquadest steril, media *LB* (*Lactose Broth*) media *EMBA* (*Eosin Methylene Blue Agar*), media *ENDO* agar, media *SIM*, reagen Kovac,

MR-VP (Methyl Red-Voges Proskauer), larutan methyl red, larutan anaphtol dan larutan KOH 40%, serta cat Gram (kristal violet, lugol, iodine, dan safranin), oil imersi, kapas steril, kertas cokelat, benang, plastik wayang, kertas label dan kertas wrap.

3. Prosedur kerja

a. Persiapan alat dan bahan

Sebelum melakukan penelitian, alat dan media perlu disterilkan lebih dulu, untuk alat gelas dan media disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Ose disterilkan dengan membakar di atas api bunsen sebelum dan setelah digunakan (Rifta & Durindiati, 2016).

b. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan membeli es batu langsung dari warung makan di Jalan Bumi, lalu sampel tersebut dimasukkan ke dalam wadah yang telah disediakan, kemudian dibawa ke laboratorium untuk dilakukan penelitian. Tahap selanjutnya es batu dicairkan pada suhu ruang, lalu es batu yang sudah mencair dimasukkan ke dalam tabung steril menggunakan pipet ukur steril (Rifta & Durindiati, 2016).

c. Pembuatan Media

1) Pembuatan *Lactosa Broth* (LB)

Pembuatan *Lactosa Broth* (LB) : Media *Lactose Broth* diukur sesuai dengan jumlah yang diperlukan (2 gr/L) dan kemudian

ditambahkan akuadest sebanyak 100 ml lalu dipanaskan sampai tercampur rata (Safitri & Djasfar, 2023). Siapkan 20 tabung reaksi sesuai jumlah sampel. Selanjutnya, isi masing-masing tabung dengan 5 ml larutan media LB, setelah itu lakukan sterilisasi (Safitri & Djasfar, 2023).

2) Pembuatan *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA)

Pembuatan *Eosin Methylen Blue Agar* (EMBA): Media EMBA ditimbang sebanyak 17 g, dilarutkan dengan 450 ml aquades sampai mendapatkan 450 ml media, dan diaduk hingga semuanya larut. Panaskan media hingga mendidih menggunakan hotplate yang diaduk dengan batang pengaduk. Setelah media tercampur rata, disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit (Putri, dkk., 2023).

3) Pembuatan Media ENDO agar: Media ENDO ditimbang sebanyak 18 g, dilarutkan dengan 450 ml aquades sampai mendapatkan 450 ml media, dan diaduk hingga semuanya larut. Panaskan media hingga mendidih menggunakan hot plate yang diaduk dengan batang pengaduk. Setelah media tercampur rata, disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit (Putri, dkk., 2023).

d. Prosedur Pemeriksaan

1). Uji Menggunakan Media LB (*Presumptive test*)

Uji Penduga (*presumptive test*): Tiap tabung telah dipenuhi dengan 5 ml media LB, masukan sampel kedalam media, selanjutnya

tabung durham dimasukkan dengan cara terbalik secara hati-hati. Pastikan tidak ada gelembung yang terbentuk di dalam tabung durham. Tabung reaksi ditutup menggunakan kapas yang dilapisi dengan kasa. Diinkubasi selama 24 jam, apabila belum ada perubahan, lanjutkan hingga 48 jam di dalam inkubator dengan suhu tetap 37°C (Safitri & Djasfar, 2023).

2). Uji Menggunakan Media EMBA dan ENDO

Tabung positif dalam uji penegasan diteruskan dengan mengambil kultur menggunakan jarum ose dan diinokulasikan pada permukaan media EMBA dan ENDO dengan cara *streak plate*. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam sampai terbentuk koloni bakteri (Hidayati, 2022).

3). Pewarnaan Gram

- a) Ambil objek gelas yang bersih dan tidak berlemak serta buat preparat dari kultur bakteri, lalu fikasi preparat di atas api Bunsen dengan cara melewatkannya di atas api Bunsen sampai kering.
- b) Permukaan preparat ditutupi dengan cat Gram A, biarkan selama 1 menit, kemudian bilas dengan air mengalir.
- c) Teteskan cairan Gram B hingga menutupi semua area preparat, lalu biarkan selama 1-2 menit dan bilas dengan air yang mengalir.

- d) Dioleskan cat Gram C, lalu dibiarkan selama 30 detik, kemudian dibilas dengan air yang mengalir.
- e) Dioleskan cat Gram D, lalu dibiarkan selama 60 detik, kemudian dibilas dengan air yang mengalir.
- f) Preparat dikeringkan dengan tisu.
- g) Letakkan 1 tetes minyak imersi pada preparat, kemudian amati di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa obyektif 100X. Catat hasil pengamatan mengenai bentuk bakteri, warna bakteri, susunan bakteri, serta apakah bakteri tersebut Gram positif atau Gram negatif.

4). Pengujian biokimia IMVIC dan TSIA

Dalam mengidentifikasi tipe bakteri *E. coli*, dilakukan pengujian biokimia IMVIC (*Indol*, *Metil Merah*, *Voges-Proskauer*, dan *Sitrat*).

a) Uji Indol

Dari kultur EMBA dan ENDO, 1 sengkeli biakan diinokulasikan ke dalam media *Sulfur Indol Motilitas (SIM)*, lalu diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24 jam. Kemudian, tambahkan 2-3 tetes reagen Kovac ke dalam tabung. Jika permukaan media berubah menjadi merah tua, itu menandakan reaksi indol positif.

b) Uji *Methyl red*

Dari kultur EMBA dan ENDO, 1 sengkelit kultur diinokulasikan ke media *methyl red (MR)*. Selanjutnya, media tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, tambahkan 5 tetes *Methyl red*, kocok, lalu biarkan selama beberapa menit. Warna kuning menunjukkan reaksi negatif, sementara warna merah menandakan reaksi positif.

c) Uji *Voges Proskauer*

Dari biakan EMBA dan ENDO, satu sengkelit biakan diinokulasikan ke dalam media *Voges Proskauer (VP)*. Media tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah proses inkubasi, ditambahkan 3 tetes larutan alfa naftol dan 2 tetes larutan KOH 40%, kemudian dikocok dan dibiarkan selama beberapa menit. Jika muncul warna merah muda hingga merah tua, itu menandakan reaksi positif, sementara jika warnanya tetap sama, itu menandakan reaksi negatif.

d) Uji *Simmon Sitrat*

Dari biakan EMBA dan ENDO ditanam 1 sengkelit biakan kedalam pembenihan Simon Sitrat, lalu diinkubasikan

selama 24 jam dengan suhu 37°C. Warna biru menunjukkan hasil positif, dan warna hijau menunjukkan hasil negatif (Rifta & Darundiati, 2016).

e) Uji TSIA

Dari biakan EMBA dan ENDO bakteri diinokulasikan dengan jarum ose dengan cara ditusuk pada bagian tengah sampai kedalaman $\frac{3}{4}$ bagian dari permukaan media dan kemudian digores pada bagian miring dari media. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif bila terjadi pembentukan asam dan pembentukan gas. Pembentukan asam terlihat sebagai perubahan warna substrat karbohidrat dari warna merah menjadi warna kuning. Pembentukan gas terjadi didasar media yang ditandai dengan adanya ruang kosong didasar media.

H. Analisis Hasil

Data dari hasil penelitian ini dianalisis dan disajikan dalam bentuk tabel dan dinarasikan dengan membandingkan standar kelayakan cemaran bakteri *E. coli* pada es batu berdasarkan Peraturan Permenkes Nomor 2 Tahun 2023.