

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Pelaksanaan identifikasi *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* pada uang kertas 2000 rupiah dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta pada bulan Januari 2019.

3.2. Alat dan Bahan Penelitian

a. Alat

1. Tabung Reaksi
2. Rak Tabung
3. Cawan Petri
4. Kapas lidi steril
5. Autoklaf
6. Ose
7. Inkubator

b. Bahan

1. Endo Agar (EA)
2. *Mac Conkey Agar (MCA)*
3. *Vogel Johnson Agar (VJA)*
4. *Brain Heart Infusion (BHI)*
5. *Kliger's Iron Agar (KIA)*
6. *Lysin Iron Agar (LIA)*
7. *Sulfate Indol Moltility (SIM)*
8. Erlich A
9. Erlich B

10. Citrat
11. Plasma citrat
12. *Kalium telurit*
13. Larutan H₂O₂

3.3. Prosedur Kerja

3.3.1. Persiapan Sampel Pemeriksaan

Penulis bertindak sebagai pembeli, sampel pertama di ambil Pasar Gede, di dua pedagang yang berbeda yaitu, pedagang ayam atau ikan, pedagang kue dan snack. Uang Kertas 2000-an dari ketiga pedagang yang berbeda tersebut dimasukan ke dalam plastik bersih dan bebas lemak. Penulis mengenakan *handscoon* untuk menghindari kontaminasi bakteri. Penulis melakukan tindakan yang sama pada 4 pasar yang lain dengan pedagang yang berbeda.

3.3.2. Isolasi dan Identifikasi *Escherichia coli*

a. Isolasi *Escherichia coli*

1. Disiapkan uang yang telah diambil dari 5 pasar tradisional di Surakarta.
2. Di swab dengan kapas lidi pada bagian permukaan uang senilai 2000 rupiah.
3. Dimasukan kapas lidi yang telah di swab ke dalam media BHI, kemudian keluarkan kapas lidi.
4. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
5. Diamati adanya kekeruhan pada media BHI.

b. Identifikasi bakteri *Escherichia coli* dengan media Mac Conkey Agar dan Endo Agar

1. Diambil 1 ose biakan dari media BHI dan digoreskan pada media Endo Agar dan Mac Conkey Agar.
2. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.

3. Diamati ada tidaknya koloni *Escherichia coli* pada media. Pada media Endo Agar akan membentuk koloni berwarna kilat logam dan pada media Mac Conkey Agar akan membentuk koloni berwarna merah kabut

c. Uji Biokimia

1. Pada Uji Biokimia, dilakukan inokulasi dari media Endo Agar dan Mac Conkey Agar ke dalam media *Kliger's Iron Agar*, *Lysine Iron Agar*, *Simmons Citrat Agar* dan *Sulfide Indol Motility*.
2. Diambil biakan yang di duga *Escherichia coli* pada media Endo Agar kemudian lakukan penusukan pada agar KIA, lalu digores pada bagian lereng agar. Lakukan hal yang sama tetapi biakan diambil dari media Mac Conkey Agar.
3. Diambil biakan yang di duga *Escherichia coli* pada media Endo Agar kemudian dilakukan penusukan pada agar LIA, lalu digores pada lereng agar. Lakukan hal yang sama tetapi biakan diambil dari media Mac Conkey Agar.
4. Untuk media *Simmons Citrat Agar*, biakan yang di duga *Echerichia coli* pada media Endo Agar diambil kemudian dilakukan penggoresan pada bagian lereng media *Simmons Citrat Agar*. Lakukan hal yang sama tetapi biakan diambil dari media Mac Conkey Agar.
5. Biakan yang di duga *Escherichia coli* diambil pada media Endo Agar kemudian ditusukan pada media *Sulfide Indol Motility* (SIM). Lakukan hal yang sama tetapi biakan diambil dari media Mac Conkey Agar.
6. Media KIA, LIA, SIM dan Citrat kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.3.3. Isolasi dan Identifikasi *Staphylococcus aureus*

- a. Isolasi *Staphylococcus aureus*

1. Uang kertas, di swab dengan kapas lidi steril yang sudah dicelupkan pada media BHI. Kemudian masukan kapas lidi dalam media BHI. Ambil kapas dan tutup dengan kapas steril.
 2. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.
- b. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan media VJA
1. Diamati adanya kekeruhan pada media BHI. Jika terdapat kekeruhan, maka diambil 1 ose kemudian diinokulasikan dengan cara goresan pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA).
 2. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.
 3. Diamati ada tidaknya koloni *Staphylococcus aureus* pada media VJA. Koloni *Staphylococcus aureus* pada media akan berbentuk bulat dan warna koloni hitam.
- c. Pengecatan Gram.
1. Diambil satu ose biakan pada media VJA kemudian ratakan di object glass yang bersih dan bebas lemak secara aseptis, kemudian fiksasi sebentar.
 2. Digenangi preparat dengan Gram A (kristal violet) tunggu selama 1 menit, kemudian buang dan aliri dengan air mengalir.
 3. Digenangi preparat dengan Gram B (lugol iodin) tunggu selama 1 menit, kemudian buang dan aliri dengan air mengalir.
 4. Digenangi preparat dengan Gram C (etanol) tunggu selama 30 detik, kemudian buang dan aliri dengan air mengalir.
 5. Digenangi preparat dengan Gram D (safranin) tunggu selama 1 menit, kemudian buang dan aliri dengan air mengalir.
 6. Ditiriskan, kemudian amati dengan mikroskop perbesaran 100x dengan minyak imersi.
- d. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan Uji Katalase

1. Diamati adanya pertumbuhan koloni pada media VJA, koloni yang akan diuji katalase.
2. Diteteskan di object glass larutan H₂O₂ 3% kemudian ambil 1 ose koloni diratakan diatas object glass yang sudah ditetesi H₂O₂ 3%, amati adanya gelembung.

e. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan uji koagulase

1. Diamati adanya pertumbuhan koloni pada media VJA, kemudian diinokulasikan pada media BHI.
2. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.
3. Diamati adanya kekeruhan pada media BHI. Diambil 1 ml larutan plasma citrat kemudian ditambahkan 1 ml suspensi bakteri dari media BHI. Inkubasi 37°C selama 24 jam.