BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi pertama pada penelitian ini adalah es batu serta populasi kedua adalah es kristal yang beredar di salah satu kantin kampus kota Surakarta. Sampel pertama pada penelitian ini adalah es batu yang dibuat langsung di kantin kampus dan sampel kedua adalah es kristal yang dibeli penjual kantin kampus. Sampel es batu dan es kristal diambil secara acak.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama yang digunakan dalam penelitian ini adalah es kristal dan es batu

Variabel utama kedua adalah jumlah mikroba koliform pada es batu dan es kristal hasil pengujian APM.

Variabel utama ketiga adalah jenis bakteri koliform yang terdapat di es batu dan es kristal.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Klasifikasi variabel utama terbagi ke dalam beberapa macam variabel yaitu variabel bebas dan variabel tergantung. Variabel bebas penelitian ini adalah es batu dan es kristal.

Variabel tergantung penelitian ini adalah jumlah APM dan jenis mikroba koliform pada es batu serta es kristal hasil pengujian APM. Variabel tergantung dipengaruhi oleh variabel kendali. Variabel kendali perlu dinetralisir atau ditetapkan klasifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan diulangi oleh peneliti lain dengan tepat, terdiri dari batasan maksimum cemaran mikroba yang ditetapkan, waktu inkubasi, suhu inkubasi, dan pengerjaan sampel.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, es batu adalah air yang dibekukan pada suhu 0°C yang dibuat secara rumahan di kantin kampus.

Kedua, es kristal adalah es batu berbentuk tabung dengan diameter 25-35 mm yang dibeli penjual kantin kampus.

Ketiga, jumlah mikroba koliform adalah jumlah mikroba koliform yang didapatkan dengan metode APM.

Keempat, APM (Angka Paling Mungkin) adalah suatu metode perhitungan yang digunakan untuk menentukan jumlah bakteri koliform dalam es batu dan es kristal dengan ragam 333.

Kelima, jenis bakteri adalah bakteri yang diidentifikasi pada media selektif MCA, pengecatan Gram, dan uji biokimia dengan media indikasi SIM, KIA, LIA dan Citrat.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Pada penelitian ini digunakan bahan sebagai berikut, es batu dan es kristal, medium *Lactose Broth* (LB), *Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLB), *Mac Conkey Agar* (MCA), *Kliger Iron Agar* (KIA), *Lysine Iron Agar* (LIA), *Sulfide Indol Motility* (SIM), *Simmons Citrate Agar*, saffranin, kristal violet, alkohol, larutan mordan, aquades steril, minyak imersi

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, pipet ukur 10 mL, 1 mL, tabung reaksi, tabung durham, cawan petri, erlenmeyer, gelas ukur, gelas beaker batang pengaduk, pemanas spirtus, inkubator, rak tabung reaksi, kapas, jarum ose, jarum ant, *autoclave*.

D. Jalannya Penelitian

1. Sterilisasi Alat

Alat gelas yang akan digunakan seperti pipet ukur, cawan petri, erlenmeyer, dan gelas beaker dicuci bersih dan dikeringkan. Erlenmeyer ditutup dengan kapas hingga memenuhi mulut erlenmeyer, lalu dibungkus dengan koran hingga menutupi erlenmeyer. Pipet ukur, cawan petri, dan gelas beaker hanya di bungkus dengan koran hingga rapat. Semua alat gelas dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 160-180°C selama 2-3 jam.

2. Persiapan Sampel

Sampel es kristal dan es batu diambil secukupnya, kemudian didiamkan dalam wadah yang bersih sampai mencair seluruhnya.

3. Pembuatan Media LB

Ditimbang 2,6 gram media *Lactose Broth* di dalam erlenmeyer dengan timbangan analitik. Media LB dilarutkan dengan aquadest 200 mL lalu digojog hingga homogen dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 3 mL, 7 mL dan 10 mL yang telah berisi tabung durham. Tabung reaksi yang berisikan media ditutup dengan kapas dan koran, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada temperatur 121°C selama 15 menit.

4. Pembuatan Media BGLB

Ditimbang 8 gram media BGLB di dalam erlenmeyer dengan

timbangan analitik. Media BGLB dilarutkan dengan aquadest 200 mL digojog hingga homogen, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 3 mL yang telah berisi tabung durham. Tabung reaksi yang berisikan media ditutup dengan kapas dan koran, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada temperatur 121°C selama 15 menit.

5. Pembuatan Media MCA

Ditimbang 5,153 gram media MCA dengan timbangan analitik. Media MCA yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam panci dan dilarutkan dengan 100 mL aquades. Media yang telah dilarutkan kemudian dipanaskan diatas kompor serta diaduk dengan spatula kayu hingga homogen, kemudian media dituangkan dalam tabung reaksi sebanyak 10 mL dan ditutup dengan kapas serta dibungkus koran. Media disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Media MCA yang sudah steril dimasukkan ke dalam cawan petri steril dan ditutup dengan koran.

6. Pembuatan Media KIA

Media KIA ditimbang sebanyak 2,876 gram pada timbangan analitik kemudian dimasukkan ke dalam ke dalam panci dan dilarutkan dengan aquades sebanyak 50 mL. Media KIA yang telah dilarutkan lalu dipanaskan diatas kompor sampai larut sempurna diaduk dengan spatula kayu dan dituangkan ke dalam tabung reaksi sebanyak ± 5 mL. Mulut tabung reaksi yang berisikan media ditutup dengan kapas steril dan ditutup koran. Media KIA disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, setelah disterilkan dengan autoklaf maka didinginkan dalam posisi $\frac{1}{2}$ bagian miring dan $\frac{1}{2}$ bagian tegak.

7. Pembuatan Media LIA

Media LIA ditimbang sebanyak 1,6 gram pada timbangan analitik kemudian dimasukkan ke dalam panci dan dilarutkan dengan aquades sebanyak 50 mL. Media LIA yang telah dilarutkan lalu dipanaskan diatas kompor sampai larut sempurna diaduk dengan spatula kayu dan dituangkan ke dalam tabung reaksi sebanyak ± 5 mL. Mulut tabung reaksi yang berisikan media ditutup dengan kapas steril dan ditutup koran. Media LIA disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, setelah disterilkan dengan autoklaf maka didinginkan dalam posisi $\frac{1}{2}$ bagian miring dan $\frac{1}{2}$ bagian tegak.

8. Pembuatan Media SIM

Media SIM ditimbang sebanyak 1,5 gram pada timbangan analitik kemudian dimasukkan ke dalam ke dalam panci dan dilarutkan dengan

aquades sebanyak 50 mL. Media SIM yang telah dilarutkan lalu dipanaskan diatas kompor sampai larut sempurna diaduk dengan spatula kayu dan dituangkan ke dalam tabung reaksi sebanyak ± 5 mL. Mulut tabung reaksi yang berisikan media ditutup dengan kapas steril dan ditutup koran. Media SIM disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, setelah disterilkan dengan autoklaf maka didinginkan dalam posisi tegak.

9. Pembuatan Media Simmons Citrate Agar

Media Simmons Citrate Agar ditimbang sebanyak 1,15 gram pada timbangan analitik kemudian dimasukkan ke dalam panci dan dilarutkan dengan aquades sebanyak 50 mL. Media sitrat yang telah dilarutkan lalu dipanaskan diatas kompor sampai larut sempurna diaduk dengan spatula kayu dan dituangkan ke dalam tabung reaksi sebanyak ± 5 mL. Mulut tabung reaksi yang berisikan media ditutup dengan kapas steril dan ditutup koran. Media sitrat disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, setelah disterilkan dengan autoklaf maka didinginkan dalam posisi $\frac{1}{2}$ bagian miring dan $\frac{1}{2}$ bagian tegak.

10. Uji Praduga

Dipipet sampel es yang sudah mencair di dalam beaker glass dengan pipet ukur steril 10 mL, 1 mL, 0,1 mL, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan ragam 333 yaitu 3 tabung reaksi steril berisikan media LB 10 mL, 3 tabung reaksi steril berisikan media LB 7 mL, dan 3 tabung reaksi steril berisikan media LB 3 mL, saat pengerjaan api spirtus dinyalakan. Sampel es dipipet dengan pipet ukur steril sebanyak 10 mL dan dimasukkan ke dalam tabung media LB 10 mL. Setelah itu, sampel dipipet kembali dengan pipet ukur sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam media LB 7 mL. Pemipetan sampel yang terakhir sebanyak 0,1 mL lalu dimasukkan ke dalam media LB 3 mL, kemudian sampel yang sudah berada dimedia LB, diinkubasi dalam inkubator selama 48 jam dengan suhu 37°C. Hasil uji LB dilanjutkan ke pengujian penegas dengan media BGLB.

11. Uji Penegasan

Diambil 1-2 ose secara aseptik sampel pada media LB hasil uji penduga yang terbentuk gas pada tabung durham, dengan ose dipijarkan terlebih dahulu pada api spirtus. Jika semua tabung durham mengandung gas, sampel dari media LB ditambahkan ke dalam 9 tabung reaksi yang telah disterilkan, masing-masing berisikan 3 mL media BGLB cair. Sampel dari media LB yang telah dimasukkan ke dalam media BGLB

dengan ose yang sudah dipijarkan, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, diinkubasi hingga 48 jam jika belum terbentuk gas. Hasil uji penegas dilanjutkan dengan uji pelengkap pada media MCA.

12. Uji Pelengkap

Diambil 1 ose secara aseptik sampel hasil uji penegas di media BGLB dengan ose dipijarkan terlebih dahulu pada api spirtus. Mulut tabung reaksi yang berisikan media BGLB disterilkan diatas api spirtus dan diambil sampel dengan ose yang telah dipijarkan. Posisi tabung reaksi dekat dengan api, lalu ose dimasukkan ke dalam media BGLB dan dioleskan pada media MCA. Pinggir cawan petri disterilkan dengan dipanaskan pada api spirtus ketika membuka cawan petri yang berisikan media MCA dan saat cawan petri ditutup kembali. Bakteri dari media BGLB yang telah dioleskan pada media MCA diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

13. Pengecatan Gram

Kaca objek dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol 70%, kemudian kaca diolesi aquades steril dengan ose secara aseptik. Dioleskan koloni bakteri hasil inokulasi bakteri yang telah diambil dari media MCA pada aquades steril diatas kaca objek dengan menggunakan jarum ose secara aseptik. Selanjutnya difiksasi di atas api spirtus hingga kering dan didinginkan, kemudian kaca objek ditetesi dengan kristal violet sebagai Gram A dan didiamkan selama 1 menit lalu dicuci dengan menggunakan air mengalir dan dikering anginkan serta menggunakan tisu. Kaca objek yang kering ditetesi dengan larutan mordan sebagai Gram B yaitu larutan iodine dan didiamkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan alkohol sebagai Gram C dan segera dicuci dengan air mengalir. Kaca objek ditetesi dengan pewarna safranin dan didiamkan selama 30 detik, setelah itu dicuci dengan air mengalir lalu dikeringkan menggunakan tisu dan dikering anginkan. Kaca objek yang telah kering diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran terkecil hingga perbesaran 100x, pada perbesaran 100x kaca objek ditetesi minyak imersi. Diamati warna bakteri, bentuk bakteri, dan susunan bakteri.

14. Uji KIA

Koloni bakteri yang tumbuh pada media MCA hasil inokulasi bakteri koliform dari uji pelengkap diambil dengan jarum ant secara aseptik. Ujung jarum ant dipijarkan dengan api spirtus, lalu jarum ant didinginkan terlebih dahulu setelah dipijarkan. Cawan petri yang berisikan media MCA beserta koloni bakteri disterilkan dengan api

spiritus pada pinggiran cawan petri dan dibuka didekat api sewaktu mengambil koloni bakteri. Koloni bakteri diambil dengan jarum ant yang sudah dingin. Tabung media KIA disterilkan terlebih dahulu dengan dipanaskan menggunakan api spiritus pada mulut tabung dan didekatkan api, ketika bakteri yang berada di jarum ant dimasukkan ke dalam media KIA dengan posisi jarum tegak lurus menusuk hingga dasar tabung reaksi dan digoreskan pada lereng media KIA, setelah itu media tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

15. Uji LIA

Koloni bakteri yang tumbuh pada media MCA hasil inokulasi bakteri koliform dari uji pelengkap diambil dengan jarum ant secara aseptik. Ujung jarum ant dipijarkan dengan api spiritus, lalu jarum ant didinginkan terlebih dahulu setelah dipijarkan. Cawan petri yang berisikan media MCA beserta koloni bakteri disterilkan dengan api spiritus pada pinggiran cawan petri dan dibuka didekat api sewaktu mengambil koloni bakteri. Koloni bakteri diambil dengan jarum ant yang sudah dingin. Tabung media LIA disterilkan terlebih dahulu dengan dipanaskan menggunakan api spiritus pada mulut tabung dan didekatkan api, ketika bakteri yang berada di jarum ant dimasukkan ke dalam media LIA dengan posisi jarum tegak lurus menusuk hingga dasar tabung reaksi dan digoreskan pada lereng media LIA, setelah itu media tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

16. Uji SIM

Koloni bakteri yang tumbuh pada media MCA hasil inokulasi bakteri koliform dari uji pelengkap diambil dengan jarum ant secara aseptik. Ujung jarum ant dipijarkan dengan api spiritus, lalu jarum ant didinginkan terlebih dahulu setelah dipijarkan. Cawan petri yang berisikan media MCA beserta koloni bakteri disterilkan dengan api spiritus pada pinggiran cawan petri dan dibuka didekat api sewaktu mengambil koloni bakteri. Tabung media SIM disterilkan terlebih dahulu dengan dipanaskan menggunakan api spiritus pada mulut tabung dan didekatkan api sewaktu bakteri yang berada di jarum ant dimasukkan ke dalam media SIM dengan posisi jarum tegak lurus menusuk hingga dasar tabung reaksi, setelah itu media tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Media SIM setelah diinkubasi, di teteskan Erlich A dan Erlich B sebanyak 3-5 tetes. Jika bakteri memiliki enzim triptonase pada uji indol akan menghasilkan cincin berwarna merah setelah ditambahkan Erlich A dan Erlich B.

17. Uji Sitrat

Koloni bakteri yang tumbuh pada media MCA hasil inokulasi bakteri koliform dari uji pelengkap diambil dengan jarum ant secara aseptik. Ujung jarum ant dipijarkan dengan api spirtus, lalu jarum ant didinginkan terlebih dahulu setelah dipijarkan. Cawan petri yang berisikan media MCA beserta koloni bakteri disterilkan dengan api spirtus pada pinggiran cawan petri dan dibuka didekat api sewaktu mengambil koloni bakteri. Tabung media *Simmons Citrate Agar* disterilkan dengan dipanaskan menggunakan api spirtus pada mulut tabung dan didekatkan api sewaktu bakteri yang berada di jarum ant dimasukkan ke dalam media dengan posisi jarum tegak lurus menusuk hingga dasar tabung reaksi dan digoreskan pada lereng media. Setelah itu, media tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

E. Analisis Hasil

Hasil penelitian berdasarkan jumlah tabung yang menunjukkan hasil positif dan disesuaikan pada tabel APM. Jumlah bakteri koliform disesuaikan persyaratan SNI 2019. Identifikasi bakteri koliform pada media MCA, pengecatan Gram sederhana dan uji biokimia (SIM untuk pengujian indol, KIA untuk pengujian laktosa, LIA untuk dikarboksilasi lisine, dan Sitrat pengujian apakah bakteri menggunakan Sitrat sebagai sumber karbon tunggal).

Tabel 1. Tabel Angka Paling Mungkin (APM)

Kombinasi Jumlah Tabung Pada Tiap Seri Yang Menunjukkan Pertumbuhan			APM per g atau per mL	Batas Kepercayaan 95%	Kombinasi Jumlah Tabung Pada Tiap Seri Yang Menunjukkan Pertumbuhan			APM per g atau per mL	Batas Kepercayaan 95%	
Jumlah g atau mL sediaan per tabung			Jumlah g atau mL sediaan per tabung							
0,1	0,01	0,001								
0	0	0	<3	0-9,4	2	2	0	21	5-40	
0	0	1	3	0,1-9,5	2	2	1	28	9-94	
0	1	0	3	0,1-10	2	2	2	35	9-94	
0	1	1	6,1	1,2-17	2	3	0	29	9-94	
0	2	0	6,2	1,2-17	2	3	1	36	9-94	
0	3	0	9,4	3,5-35	3	0	0	23	5-94	
1	0	0	3,6	0,2-17	3	0	1	38	9-104	
1	0	1	7,2	1,2-17	3	0	2	64	16-181	
1	0	2	11	4-35	3	1	0	43	9-181	
1	1	0	7,4	1,3-20	3	1	1	75	17-199	
1	1	1	11	4-35	3	1	2	120	30-360	
1	2	0	11	4-35	3	1	3	160	30-380	
1	2	1	15	5-38	3	2	0	93	18-360	
1	3	0	16	5-38	3	2	1	150	30-380	
2	0	0	9,2	1,5-3,5	3	2	2	210	300-400	
2	0	1	14	4-35	3	2	3	290	90-990	
2	0	2	20	5-38	3	3	0	240	40-990	
2	1	0	15	4-38	3	3	1	460	90-1980	
2	1	1	20	5-38	3	3	2	1.100	200-4000	
2	1	2	27	9-94	3	3	3	>1.100		

Menurut Farmakope Edisi VI 2020