

## METODOLOGI PENELITIAN

### Waktu Dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli sampai dengan bulan Agustus 2012 di Bagian Mikrobiologi Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Sumatera utara.

### Alat dan Bahan Penelitian

#### Alat

Alat-alat yang digunakan antara lain : Neraca listrik (*Mettler Toledo*), erlenmeyer, kapas. aluminium foil, tabung reaksi (*Pyrex*). rak tabung, tabung durham, pipet volum, bola karet, inkubator (*Fischer scientific*), cawan petri. kawat oser, lampu bunsen, objek glass, deck glass, pipet tetes, mikroskop (*Olympus*), lemari pendingin (*Toshiba*).

#### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan antara lain : *Buffered Pepton Water* (BPW), *Lactosa Broth* (LB), *Brilliant Green Bile Broth* (BGLB) 2 %, Mac-Conkey Agar (MCA), *Silfide Indol Motility* (SIM), *Triple Sugar Iron* (TSI), *Simmon Citrate Agar* (SCA), larutan gentian violet, larutan lugol, alkohol, larutan *fuchsin*, pereaksi indol (Kovac), *Nutrient Broth* (NB), *Blood Agar*.

#### Metode Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah jamu gendong yang diambil dari lima orang penjual jamu gendong di lima lokasi yang berbeda di wilayah Kota Medan. Sampel Jamu di ambil masing masing sebanyak 500 ml dengan menggunakan glass Erlenmeyer kemudian sampel di bawa ke laboratorium untuk dilakukan pemeriksaan cemaran.

#### Pemeriksaan Bakteri *Escherichia coli* ( Metode APM )

Pemeriksaan bakteri *Escherichia coli* dilakukan dengan metode APM yaitu dengan menggunakan lima labu Erlemeyer steril, yang masing masing di isi

10 ml sampel dan diberi kode sampel (A, B, C, D, E). Kemudian dan tambahkan 90 ml *Buffered Pepton Water* (BPW), selanjutnya dihomogenkan untuk mendapatkan suspensi, selanjutnya dilakukan uji dugaan.

### **Uji Dugaan**

Uji dugaan dilakukan dengan cara menyiapkan 9 tabung durham yang berisi masing-masing 10 ml media *Lactosa Broth* (LB), kemudian ditambahkan 10 ml suspensi hasil homogenisasi sample, hal yang sama dilakukan untuk sampel 2, 3, 4 dan 5, dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu kisaran 35 s/d 37°C. Setelah 24 jam sampel yang positif menghasilkan gas diduga tercemar bakteri golongan coli.

### **Uji Penegasan**

Uji penegasan dilakukan dengan cara menyiapkan tabung reaksi steril, sejumlah biakan yang positif (+) gas dimasukkan tabung durham secara terbalik. Kemudian tabung reaksi diisi dengan 10 ml media *Brilliant Green Bile Broth* 2% (BGLB). Selanjutnya 10 ml biakan diambil dengan cara aseptik yang positif (+) gas dan biakan di atas dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi media *Brilliant Green Bile Broth* (BGLB). Media diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 35-37°C. Setelah 24 jam, tabung amati, sampel yang positif (+) gas, tercemar bakteri golongan coli.

### **Isolasi *Escherichia coli***

Dari hasil biakan yang positif (+) gas pada media *Brilliant Green Bile Broth* (BGLB), kemudian masing-masing ose inokulasikan pada permukaan Mac-Conkey Agar. Media diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 35-37°C dengan posisi lempeng dibalik, diamati koloni spesifik yang terbentuk, koloni yang berbentuk bulat, diameter 2-3 mm dengan warna merah tua diduga positif (+) tercemar bakteri golongan coli.

### **Karakterisasi morfologi *Escherichia coli***

Dari sampel 1, dengan menggunakan ose diambil satu koloni spesifik pada permukaan Mac-Conkey Agar (MCA), dibuat sediaan tipis pada permukaan kaca objek yang bersih. Setelah kering, kaca objek difiksasi dengan cara menyentuh permukaan sebelah bawah kaca objek tiga kali berturut-turut pada permukaan api Bunsen. Kaca objek diberi larutan warna gentian violet dan didiamkan selama 3-5 menit. Setelah itu objek gelas disiram dengan larutan lugol dan dibiarkan terendam dalam waktu yang sama. Preparat didekolorisasi dengan alkohol sampai semua zat warna tampak luntur dan dibilas dengan air mengalir, diberi warna kontras, fuchsin, Preparat akan berwarna merah seperti warna fuksin (bakteri gram negatif), bentuk sel diamati dengan mikroskop.

### **Identifikasi dan Konfirmasi**

#### ***Uji Indol***

Dari sampel 1 diambil dua atau lebih koloni spesifik pada Mac-Conkey Agar (MCA) dan diinokulasikan pada agar miring *Sulfide Indol Mortility* (SIM) dengan cara ditusuk ke dalam media agar miring tersebut, hal yang sama dilakukan terhadap sampel 2 dan 3, diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 24-48 jam, Setelah 24-48 jam, biakan ditambahkan 1 ml pereaksi Indol (Kovac) dikocok dan didiamkan beberapa menit kemudian diamati perubahan warna. Warna merah cherry yang berbentuk cincin pada permukaan biakan menunjukkan reaksi indol positif.

#### ***Uji Reaksi Biokimia***

Uji reaksi biokimia (Pembentukan asam/peragian, pembentukan Gas Pembentukan H<sub>2</sub>S) Dari sampel 1, dipilih dua atau lebih koloni spesifik pada Mac Conkey Agar (MCA) diinokulasikan pada agar miring Triple Sugar Iron (TSI) dengan cara digores pada permukaan dan ditusuk ke dalam media agar miring

tersebut, hal yang sama dilakukan terhadap sampel 2 dan 3, diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 24-48 jam, Setelah 24-48 jam, amati. Warna awal media adalah merah, jika terjadi perubahan warna, maka: Alkalis (K) merah, peragian negatif. Asam (A) kuning, peragian positif. Asam Gas (AG) kuning, peragian positif dan terbentuk gas, agar retak atau terangkat). H<sub>2</sub>S terbentuk endapan hitam, karena terbentuknya FeS.

### ***Uji Sitrata***

Uji sitrata dilakukan dengan cara mengambil koloni pada sampel 1 pada Mac-Conkey Agar (MCA), kemudian diinokulasikan pada agar miring *Triple Sugar Iron* (TSI) dengan cara digoreskan pada permukaan media agar miring. Hal yang sama dilakukan terhadap sampel 2 dan 3, media kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam, dilakukan pengamatan hasil setelah 24-48 jam. Warna awal media adalah hijau, jika terjadi perubahan warna menunjukkan (+) *Escherichia coli* dan jika tidak terjadi perubahan warna menunjukkan (-) *Escherichia coli*.

### **Pemeriksaan Bakteri *Staphylococcus aureus***

Pemeriksaan bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan cara menyiapkan 5 labu erlenmeyer steril, kemudian mengambil 10 ml masing-masing sampel dengan cara aseptik dan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer. Selanjutnya ditambahkan 90 ml *Buffered Pepton Water* (BPW) ke dalam masing masing Erlenmeyer dan dihomogenkan sehingga diperoleh suspensi pengenceran 1:10.

### **Uji Pengkayaan**

Uji pengkayaan dilakukan dengan memasukkan *Nutrient Broth* (NB) sebanyak 1 ml ke dalam masing-masing tabung reaksi, kemudian tambahkan 1 ml sampel ke dalam tiap tabung. Media diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 35-37°C. Setelah diinkubasi dilakukan pengamatan berupa warna kekeruhan.

## **Isolasi**

Isolasi dilakukan dengan cara mengambil hasil uji pengkayaan dengan menggunakan ose steri, kemudian ditanam pada *Manitol Salt Agar* (MSA). Hal ini dilakukan pada masing-masing tabung sampel (A, B, C, D dan E). Kemudian diinkubasi selama 24-48 jam dengan suhu 35-37°C dengan posisi lempeng dibalik. Dilakukan pengamatan koloni spesifik yang terbentuk setelah 24-48 jam.

## **Uji Mikroskopik**

Uji mikroskopik dilakukan dengan pengecatan gram yaitu dari 5 sampel yang diduga tercemar bakteri patogen menggunakan ose diambil satu sengkeli koloni spesifik pada permukaan Agar Darah. Kemudian dibuat sediaan tipis pada permukaan kaca objek. Setelah kering, fiksasi dengan cara menyentuh permukaan sebelah bawah kaca objek tiga kali berturut-turut pada permukaan api Bunsen, diberi larutan warna gentian violet, diamkan 3-5 menit, disiram dengan larutan Lugol dan dibiarkan terendam dalam waktu yang sama, preparat didekolorisasi dengan alkohol sampai semua zat warna tampak luntur, siram dengan air, diberi warna fuchsin, preparat akan berwarna ungu (bakteri gram positif).

## **Pemeriksaan Bakteri *Salmonella* sp.**

Pemeriksaan bakteri *Salmonella* dilakukan dengan menggunakan media *Tetrathionate broth* dan *Salmonella Shigella Agar*. Sampel diambil dari labu Erlenmeyer dengan pengenceran  $10^{-1}$  dan dimasukkan ke dalam *Tetrathionate broth*. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya media *Salmonella Shigella Agar*, spesimen diambil dengan menggunakan ose steri kemudian ditanam pada media *Salmonella Shigella Agar*. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian diamati koloni yang tumbuh pada media isolasi, koloni yang tumbuh dilanjutkan dengan pemeriksaan biokimia. Dari koloni tersangka ditanam pada TSI miring dan SIM agar, caranya diambil 1 ose koloni tersangka dari bagian ujung-ujung atasnya dan dipilih koloni yang halus. Inokulasikan ke TSI terlebih dahulu dengan menusukkan ose tersebut sampai dasar media, kemudian oleskan ose tersebut pada permukaan lereng secara zig-zag. Tanpa menyentuh ose kembali pada koloni ataupun membakarnya, ujung

kawat ose disentuhkan pada bagian bekas tusukkan di TSI, kemudian ditusukkan ke SIM agar. Tutup tabung dengan kapas steril, demikian pula dengan tabung TSI. Diinkubasi kedua tabung pada suhu 37° C selama 24 jam dan pembacaan hasil dilakukan setelah 24 jam. Untuk pembacaan SIM, sebelumnya ditambahkan reagen kovac ke dalam tabung.

### **Pemeriksaan Total Plate Count**

Pemeriksaan total plate count (TPC) dilakukan dengan cara menyiapkan 6 tabung reaksi steril dan disusun pada rak. Masing-masing tabung secara berurutan diberi tanda  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  sebagai kode pengenceran dan tanggal pemeriksaan. Kemudian disiapkan 7 petridish steril dan diberi tanda pada bagian belakangnya sesuai dengan kode pada pengenceran dan tanggal pemeriksaan, digunakan 1 petridish sebagai kontrol. Pada tabung 2, 3, 4, 5 dan 6 diisi dengan 90 ml air garam fisiologis atau aquabidest atau larutan garam *buffer phosphate*. Bahan spesimen dikocok dalam labu erlenmeyer sebanyak 25 kali sampai homogen, lalu diambil 10 ml masukkan pada tabung ke satu. Sebanyak 10 ml bahan dari tabung pertama dipindahkan ke dalam tabung kedua dengan pipet, cairan dibuat sampai homogen.

Kemudian sebanyak 1 ml bahan dari tabung kedua dipindahkan ke dalam tabung ketiga dengan pipet, cairan dibuat sampai homogen. Demikian seterusnya dilakukan sampai tabung keenam. Pengenceran yang diperoleh pada keenam tabung adalah  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  sesuai dengan kode pengenceran yang telah tercantum sebelumnya. Dari masing-masing tabung di atas dimulai dari tabung keenam dengan menggunakan pipet steril, diambil 1 ml dimasukkan ke dalam masing-masing petridis steril, sesuai dengan kode pengenceran yang sama. Kemudian ke dalam masing-masing petridis di tuang Plate Count Agar cair yang telah dipanaskan dalam water bath  $\pm 45^{\circ}\text{C}$  sebanyak 15-20 ml. Masing-masing petridis digoyang perlahan-lahan hingga tercampur merata dan biarkan hingga dingin dan membeku. Lalu dimasukkan dalam incubator 37°C selama  $2 \times 24$  jam dalam keadaan terbalik. Kontrol dibuat dari cairan air garam fisiologis dan dimasukkan ke dalam petridis control, selanjutnya *Plate Count Agar* dimasukkan