

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Juli sampai Agustus 2012 di Balai Laboratorium Kesehatan Medan.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah garam buffer fosfate pH7,2 , Lactose Broth (LB), Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLB), Endo Agar, Gentian Violet, Lugol 1%, Alkohol 99%, Fuchsin, PCA, BHI broth, BPA, Blood Agar, SS Agar, Tetrathionate broth, TSIA, SIM.

Alat yang diperlukan adalah autoclave, incubator 37⁰C dan 44⁰C, timbangan, labu Elenmeyer, rak tabung reaksi, lampu spritus, spidol, tabung reaksi, Petridis, pipet steril 1ml dan 10ml, kawat ose, tabung durham, kapas alkohol dan thermometer.

Metode Penelitian

Jenis penelitian adalah deskriptif, untuk melihat gambaran, analisa laboratorium dan mengetahui bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella* pada jus yang menggunakan es yang dijual di Jalan Setia Budi Medan.

Populasi dan Sampel

Populasi penjual jus jeruk yang ada di Jalan Setia Budi Medan (dari Titi Bobrok sampai simpang Jalan Dr.Mansyur) semuanya berjumlah 17 orang.

Sampel penelitian ini adalah jus jeruk, dimana setiap kantin diambil satu jenis jus yang menggunakan es karena setiap jenis buah yang dijadikan jus

berpotensi mengandung *Escherichia coli*. Jumlah sampel adalah 10. Penelitian dilakukan di Balai Laboratorium Kesehatan Medan.

Prosedur Kerja

Sampel diambil dari penjual jus jeruk kemudian dimasukkan ke dalam plastik yang telah tersedia. Sampel jus jeruk segera dibawa ke Laboratorium.

Pelaksanaan Pemeriksaan *Escherichia coli*

Test Pendahuluan

Tujuh tabung reaksi disiapkan yang masing-masing berisi media lactose broth sebanyak 10 ml. tabung disusun pada tabung reaksi, masing-masing tabung diberi tanda nomor urut, tanggal pemeriksaan dan volume. Dengan pipet steril diambil bahan pemeriksaan yang telah disiapkan yaitu sampel jus yang menggunakan es, dimasukkan ke dalam tabung 1 s.d 5 masing-masing sebanyak 10 ml, tabung ke-6 sebanyak 1 ml dan tabung ke-7 sebanyak 0,1 ml . Masing - masing tabung tersebut digoyang-goyang agar specimen dan media tercampur. Diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24-48 jam diperiksa ada tidaknya pembentukan gas pada tabung durham. Dicatat semua tabung yang menunjukkan peragian lactose (pembentukan gas). Pembentukan gas pada tabung durham pada test pendahuluan dinyatakan test (+) positif dan dilanjutkan dengan test penegasan. Bila test negatif berarti *coliform* negatif dan tidak perlu dilakukan test penegasan.

Test Penegasan

Dari tiap-tiap presumptive yang positif, dipindahkan 1-2 ose kedalam tabung komfirmative yang berisi 10ml BGLB 2%. Dari masing-masing tabung comvirmative diinokulasikan ke dalam 2 tabung BGLB 2%. Satu seri tabung

BGLB 2% diinkubasikan pada suhu 37⁰C selama 24-48 jam untuk memastikan adanya *coliform* dan satu seri yang lain diinkubasikan pada suhu 44⁰C selama 24-48 jam untuk memastikan adanya *coliform* tinja. Pembacaan dilakukan setelah 24-48 jam dengan melihat jumlah tabung BGLB yang menunjukkan positif gas.

Gas penegasan ini merupakan test yang minimal harus dikerjakan untuk pemeriksaan bakteriologi makanan dan minuman.

Pembacaan Test Hasil Penegasan

Pembacaan hasil test penegasan dilakukan dengan menghitung jumlah tabung yang menunjukkan adanya gas baik pada seri tabung yang diinkubasikan pada suhu 44⁰C, angka yang diperoleh dicocokkan dengan tabel MPN, maka akan diperoleh index MPN *coliform* untuk tabung yang diinkubasikan pada suhu 37⁰C dan MPN *Escherichia coli* untuk tabung yang diinkubasi pada suhu 44⁰C.

Pelaksanaan Pemeriksaan Total Plate Count

Enam tabung reaksi steril disiapkan, susun pada rak tabung. 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. Tujuh petridis steril disiapkan pula. Pada 6 petridis diberi tanda pada bagian belakangnya sesuai dengan kode pada pengenceran dan tanggal pemeriksaan seperti pada butirnya. Satu petridis lainnya diberi tanda “kontrol”. Pada tabung kedua sampai dengan keenam, diisi dengan 90 ml air garam fisiologis atau aquadest atau larutan garam buffer fosfate, untuk pemeriksaan *Bacillus cereus* harus menggunakan larutan garam buffer fosfate. Bahan spesimen diatas dikocok dalam labu erlenmeyer sebanyak 25 kali sampai homogen, lalu diambil 10 ml masukkan pada tabung ke satu. 1 ml bahan dari tabung kesatu dipindahkan ke dalam tabung kedua dengan pipet, cairan dibuat

sampai homogen. 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 inkubator 37°C selama 2×24 jam dalam keadaan terbalik. Kontrol dibuat dari cairan air garam fisiologis atau aquades atau larutan garam buffer fosfate. Untuk pemeriksaan *Bacillus cereus* harus menggunakan larutan garam buffer fosfate, dimasukkan ke dalam petridis “kontrol” dan dituangi Plate Count Agar cair seperti tersebut di atas sebanyak 15-20 ml. Pembacaan dilakukan setelah 2×24 jam dengan cara menghitung jumlah koloni yang tumbuh pada tiap petridis.

Pelaksanaan Pemeriksaan *Staphylococcus aureus*

Media yang digunakan untuk pemeriksaan *Staphylococcus aureus* adalah Brain Hearth Infusion broth, Blood Agar dan Baird Parker Agar. Peralatan kerja disiapkan dan dibersihkan semua tempat kerja dengan desinfektans, bahan spesimen pengenceran 10^{-1} dalam labu Erlenmeyer ambil dengan pipet steril dan dimasukkan ke dalam Brain Hearth Infusion broth. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Media Blood Agar dan Baird Parker Agar yang akan

digunakan disiapkan, apabila media tersebut sebelumnya disimpan pada lemari es sebelum digunakan harus dikeringkan sebentar pada inkubator untuk menghilangkan uap air pada media. Dengan menggunakan ose steril, diambil 1 ose spesimen dari Brain Heart Infusion broth kemudian ditanam pada media Blood Agar dan Baird Parker Agar, lalu diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Kemudian amati koloni yang tumbuh pada masing-masing media Blood Agar, Baird Parker Agar. Koloni tersangka dari Blood Agar dan Baird Parker Agar dibuat sediaan dan dicat dengan pewarnaan Gram. Bila terdapat Gram+ (positif), sisa koloni ditanam pada perbenihan Nutrient agar, Loffler Serum dan Blood broth, lalu diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam, kemudian dipindahkan koloni dari Blood Agar dan Baird Parker Agar dengan ose steril ke kaca objek yang bersih lalu diteteskan 1 tetes H₂O₂ 3% dan diamati reaksi yang terjadi.

Pembacaan hasil dan pelaporan

Pada media Blood Agar menunjukkan sifat koloni smooth, bundar dan opaque, umumnya mengandung pigmen kuning tua hingga orange atau kadang-kadang putih, haemolitik/non haemolitik, besar 1-2 mm.

Pada media Baird Parker Agar menunjukkan sifat koloni warna hitam pekat dan mengkilat, kadang-kadang keabu-abuan, dilingkari zone yang jelas (kadang-kadang tidak dilingkari zone), besar > 1 mm. Pada Katalase Tes akan terlihat bubbles (gelembung-gelembung).

Pemeriksaan *Salmonella*

Media yang digunakan untuk pemeriksaan *Salmonella* adalah Tetrathionate broth dan Salmonella Shigella Agar. Peralatan kerja disiapkan dan

dibersihkan semua tempat kerja dengan desinfektans, diambil bahan spesimen pengenceran 10^{-1} dalam labu Erlenmeyer dengan pipet steril dan dimasukkan ke dalam Tetrathionate broth, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Media Salmonella Shigella Agar yang akan digunakan disiapkan, apabila media tersebut sebelumnya disimpan pada lemari es sebelum digunakan harus dikeringkan sebentar pada inkubator untuk menghilangkan uap air pada media. Dengan menggunakan ose steril, diambil 1 ose spesimen dari Tetrathionate broth kemudian ditanam pada media Salmonella Shigella Agar, lalu diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Kemudian diamati koloni yang tumbuh pada media isolasi, koloni yang tumbuh dilanjutkan dengan pemeriksaan reaksi biokimia. Dari koloni tersangka ditanam pada TSIA miring dan SIM agar, caranya diambil 1 ose koloni tersangka dari bagian ujung-ujung atasnya dan dipilih koloni yang halus. Inokulasikan ke TSIA 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 disentuh pada bagian bekas tusukkan di TSIA, kemudian ditusukkan ke SIM agar. Tutup tabung dengan kapas steril, demikian pula dengan tabung TSIA. 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.

Analisis Data

Data yang diperoleh dibandingkan dengan nilai baku yang dikeluarkan oleh DEPKES RI.