

IV. METODA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian : Sublab. Bioteknologi
Universitas Diponegoro
2. Waktu : November - Desember 1992

B. Bahan dan Alat

1. Bahan

- Sampel (daging kerang darah segar)
- Nutrien Agar
- Air Pepton Buffer %
- Air pepton 1%
- Air pepton alkali 0,1%
- Medium Laktosa cair
- Medium Bismut Sulfit Agar (BSA)
- Medium Selenit Cystein Broth
- Medium Salmonella-Shigella Agar (SSA)
- Medium Manitol Salt Agar (MSA)
- Medium Thiosulfat Citrate Bile Salts (TCBS)
- Medium Brilliant Green Laktose Bile Broth
(BGLB)
- Medium Endo Agar
- Medium Tripel Sugar Iron Agar (TSIA)
- Aquades
- Spirtus

- Kertas pH (PH meter)
- Kapas
- Alkohol 70%
- Cat Gram A, B, C, D.
- Es balok

2. Alat

- Ose
- Bunsen
- Blender
- Rak Tabung reaksi
- Gelas ukur
- Incubator
- Oven
- Thermos es
- Pinset
- Palu
- Corong
- Cawan petri
- Tabung reaksi
- Tabung durham
- Pipet ukur
- Autoklaf
- Gelas Benda
- Mikroskop
- Pisau
- Timbangan

C. Cara Kerja

1. Pengambilan sampel

Sebagai sampel adalah jenis kerang darah yang diambil dari Tanah Mas, Tambak lorok Kulon dan Tambak lorok Wetan. Pada penelitian ini dilakukan pengambilan sampel sebanyak 3 kali pada tiap lokasi.

Sampel kerang darah didapat dari beberapa nelayan. Dari setiap nelayan diambil sebanyak kira-kira 0,25 kg. Sampel kerang darah diambil setelah diturunkan dari perahu oleh para nelayan, kemudian

kerang dimasukkan dalam termos/plastik yang diberi es, terus dibawa ke laboratorium untuk diperiksa.

3. Penyediaan Sampel

Untuk pemeriksaan sampel dilakukan dengan stratified random sampling. Kerang dikelompokkan menjadi tiga kelompok yaitu kerang yang berukuran besar, sedang dan kecil. Lalu setiap kelompok diambil secara acak sejumlah 10 buah kerang.

Cangkang kerang dibersihkan dulu dari kotoran, lalu supaya aseptik kulit kerang dibersihkan dengan alkohol. Cangkang kerang dibuka dengan cara dipukul dengan palu kemudian dicongkel dengan pinset steril sampai cangkang terbuka. Daging dan cairannya diambil dengan pinset steril dicampur didalam wadah steril. Semuanya dikerjakan secara aseptik.

Menimbang 10 gram sampel yang diambil secara acak dari daging kerang yang sudah dikuliti dan dimasukkan kedalam blender steril. Kemudian dimasukkan pula 90 ml air pepton 1% steril kedalam blender, lalu diblender sampai bahan padat tersebut hancur seluruhnya. Lama penghancuran 2 - 5 menit. Bahan dengan pengenceran tersebut siap dipergunakan untuk pemeriksaan angka lempeng total (TPC), Most Probable Number (MPN) coliform dan pemeriksaan bakteri patogen lainnya (Trihendrokesowo, 1987).

4. Pemeriksaan mikrobiologis

Dari bahan contoh yang telah dipersiapkan kemudian dilakukan beberapa pemeriksaan terhadap kualitas bakteriologisnya, yaitu :

4.1. Angka Lempeng Total (TPC)

1. Dibuat pengenceran bertingkat 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Atau kalau diperlukan 10^{-6} dan seterusnya.
2. Dari masing-masing pengenceran diambil 0,1 ml diinokulasi pada cawan petri, setelah itu Nutrien agar yang masih hangat dituangkan pula. Lalu digoyang-goyang sampai rata. Pada masing-masing pengenceran dikerjakan dua kali penanaman. Disamping itu juga dibuat kelompok kontrol yang berupa :
 - a. medium yang dituang ke dalam cawan petri steril untuk mengetahui aseptisitas kerja dan sterilitas medium.
 - b. medium dan pengencer dituang ke dalam cawan petri steril untuk mengetahui sterilitas pengencer.
3. Dieramkan selama 24-48 jam pada suhu $35-37^{\circ}$ C.
4. Dihitung jumlah koloni kuman.
5. Jumlah koloni kuman untuk masing-masing pengenceran adalah harga rata-rata dari jumlah koloni kuman hasil dua kali penanaman (duplo).

6. Penghitungan koloni kuman dianggap akurat apabila jumlah koloni yang dihitung antara 30-300 koloni kuman pada setiap cawan petri.
7. Jumlah kuman dalam 1 gram bahan pangan = jumlah koloni (h) x 10 x faktor pengenceran (Trihendrokesowo, 1987).

4.2. Metode Most Probable Number (MPN)

1. Disiapkan 5 ml media laktosa cair dalam tabung reaksi ukuran 30 ml yang dalamnya dimasukan tabung durham secara terbalik untuk mengetahui adanya gas.
2. Diletakan 3 kelompok tabung di dalam 1 deret rak tabung :
 - (a) kelompok pertama : 3 tabung berisi 5 ml laktosa cair.
 - (b) kelompok kedua : 3 tabung berisi 5 ml laktosa cair.
 - (c) kelompok ketiga : 3 tabung berisi 5 ml laktosa cair.
 - (d) kelompok kontrol yang terdiri dari:
 - 1 tabung yang berisi medium laktosa cair yang didalamnya diisi tabung durham
 - 1 tabung yang berisi medium laktosa cair dan pengencer yang didalamnya diisi tabung durham

- 1 tabung yang berisi larutan contoh yang diperiksa dan diisi tabung durham.
3. Untuk masing-masing kelompok tabung dimasukkan sampel yang akan diperiksa.
- (a) 3 tabung kelompok pertama masing-masing di inokulasi 0,5 ml sampel dari pengenceran 10^{-1} .
- (b) 3 tabung kelompok ke dua masing-masing di tambah 0,5 ml sampel dari pengenceran 10^{-2} .
- (c) 3 tabung kelompok ke tiga masing-masing di tambah 0,5 ml sampel dari pengenceran 10^{-3} .
4. Diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 - 48 jam.
5. Dilihat apakah terbentuk gas atau tidak dengan melihat adanya gelembung gas pada tabung durham yang diletakkan terbalik dan dilihat adanya perubahan warna medium. Diamati dan dicatat yang menunjukkan reaksi positif (terbentuknya gas pada tabung Durham).
6. Dari tiap tabung yang positif diambil satu ose diinokulasikan dalam 5 ml media BGLB yang didalamnya terdapat tabung durham yang dipasang terbalik. Dibuat dua set.
7. Satu set dieramkan pada suhu 44° C (Fecal coliform) dan satu set lagi pada suhu 37° C (coliform) selama 24 - 48 jam.

8. Dilihat apakah terbentuk gas atau tidak. Adanya gas dicatat dari setiap kelompok 3 tabung.
9. Hasil gas positif dari masing-masing kelompok 3 tabung dicocokkan dengan indeks tabel MPN. Maka didapat jumlah bakteri fecal coliform serta coliform pada tiap 100 gram sampel, kemudian uji ini dilanjutkan dengan uji adanya *E. coli* pada medium selektif Endo Agar. Koloni *E. coli* akan tampak berwarna merah metalik. Lalu dilakukan pengecatan Gram (Trihendro kesowo, 1987).

4.3. Isolasi dan Identifikasi *Salmonella sp.*

1. 1 ml sampel diinokulasikan pada 9 ml air pepton bufer 1% dan dieramkan pada suhu 37° C selama 24 jam.
2. Dari eraman di atas diambil 1 ml, dan diinokulasikan pada 9 ml media Selenit Cystein cair. Diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam.
3. Diinokulasi secara goresan pada Bismuth-Sulfit Agar. Diinkubasi selama 48 jam. Koloni *Salmonella* berwarna hitam dan keemasan dengan kilauan disekitar koloni metalik. Koloni yang dicurigai di tanam secara tusukan dan goresan pada medium Tripel Sugar Iron Agar miring diinkubasi selama 24 jam dan dilakukan pengecatan

Gram. Lalu diamati dicocokkan dengan ciri-ciri pada buku (Koesnijo,1987).

4.4. Isolasi *Shigella sp.*

1. Sama dengan isolasi *Salmonella sp* (No. 1-2).
2. Diambil 1 ml lalu diinokulasi dalam Salmonella-shigella Agar (SS Agar), diinkubasi pada 37° C selama 48 jam.
3. Koloni yang tidak berwarna pada medium ini dicurigai sebagai *Shigella sp.*
4. Koloni yang dicurigai di ambil dengan ose lalu dilakukan pengecatan Gram dan diamati dibawah mikroskop. Juga dilakukan penanaman pada media Tripel Sugar Iron Agar miring secara tusukan dan goresan. Diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 Jam. Lalu diamati dan dicocokkan dengan literatur (Koesnijo, 1987).

4.5. Isolasi *Vibrio sp.*

1. 1 ml sampel dari pengenceran 10^{-2} di tanam pada 9ml air pepton alkali 0,1%. Diinkubasikan pada 37° C selama 24 jam.
2. Diambil 1 ml diinokulasikan pada media selektif TCBS (Thiosulfat Citrate Bile Salt). Koloni yang berwarna kuning dan hijau dicurigai sebagai *Vibrio sp.* dilakukan pengecatan Gram. Koloni yang

berwarna kuning dicurigai sebagai koloni *Vibrio cholera*, dan yang berwarna biru atau hijau dicurigai sebagai koloni *Vibrio parahaemolyticus*. lalu diamati dibawah mikroskop (Koesnijo, 1987).

4.6. Isolasi *Staphylococcus sp.*

1. 1 ml sampel dari pengenceran 10^{-2} ditanam pada 9 ml air pepton 1%, diinkubasikan pada suhu 37° C selama 24 jam.
2. Diambil 1 ml dan ditanam pada Manitol Salt Agar (MSA).
3. Koloni yang berwarna kuning kecil atau putih kecil dan merubah warna media dari merah menjadi kuning adalah koloni *Staphylococcus sp.*
4. Lalu dilakukan pengecatan Gram dan diamati dibawah mikroskop (Suparwoto Saleh, 1987).

D. Analisis Data

Hasil yang telah diperoleh kemudian dibuat rata-rata yang meliputi pemeriksaan angka lempeng total (TPC), MPN "coliform" dan MPN "fecal coliform". Untuk data pemeriksaan *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Vibrio sp.*, dan *Staphylococcus sp.* dilakukan diskripsi langsung. Kemudian hasil tersebut dibandingkan dengan standar yang telah ditentukan sebagai persyaratan kebersihan dan keamanan kerang segar. Bila hasil yang

diperoleh dari pemeriksaan sampel kerang darah melebihi standar yang berlaku berarti kerang darah telah tercemar oleh bakteri tersebut.



7