BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Bahan.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Sampel susu yang telah dipasteurisasi.
2. Medium NA (*Nutrien Agar*).
3. Air buffer pepton.
4. Aquades steril.
5. Mediem BSA (*Bismuth Sulfit Agar*).
6. Medium LB (*Lactosa Broth*).
7. Medium BGLB (*Briliant Green Lactosa Bile Broth*).
8. Medium EA (*Endo Agar*).
9. Medium SCB (*Selenith Cystein Broth*).
10. Medium SSA (*Salmonella-Shigella Agar*).
11. Medium TCBS (*Thiosulfate Citrat Bile Salts*).
12. Medium MSA (*Manitol Salt Agar*).
13. Larutan *Tiosianat Biru Metilen*.
14. Medium KIA (*Kliger Iron Agar*).
15. Medium LIA (*Lysine Iron Agar*).
16. Medium MIO (*Motility Indol Ornithine*).
17. Medium TSIA (*Triple Sulfate Iron Agar*).
18. Pewarnaan gram.

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

B. Alat - alat.

Alat - alat yang digunakan :

1. Botol sampel 500 ml.
2. Tabung reaksi dan tabung durham.
3. Cawan petri dan jarum ose.
4. Gelas ukur 100 ml dan 500 ml.
5. Gelas erlenmeyer 300 ml, 500 ml dan 100 ml.
6. Pipet ukur 1 ml dan 5 ml.
7. Lampu spiritus.
8. Timbangan manual.
9. Miskroskop dan gelas obyek.
10. Koloni Counter.
11. Sterilisator dan inkubator.
12. Stirer dan pemanas.
13. Rak tabung reaksi.

C. Metodologi.

Untuk mengetahui kualitas sampel susu setelah dipasteurisasi digunakan parameter :

1. Jumlah total bakteri, dengan menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*).
2. Populasi bakteri koliform group dengan menggunakan metode MPN (*Most Probable Number*).
3. Keberadaan beberapa bakteri patogen penyebab gastro-enteritis dengan isolasi dan identifikasi bakteri patogen.

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

4. Reduksi sampel susu dengan menggunakan *Biru Metilen* (Test Reductase).

D. Pengambilan sampel.

Pengambilan sampel susu dilakukan disalah satu tempat pemerahan susu sapi di kodia Semarang.

Pada minggu pertama dilakukan pengambilan sampel, kemudian dilakukan pasteurisasi dengan suhu 72 ^{o}C sampai 75 ^{o}C selama 15 detik. Kemudian diberi perlakuan waktu 0 jam, 4 jam, 8 jam dan 12 jam.

Pada minggu ketiga (selang waktu 2 minggu) dilakukan pengambilan sampel kedua. Sampel ini juga dipasteurisasi kemudian diberi perlakuan waktu seperti pada pengambilan sampel pertama (0 jam, 4 jam, 8 jam dan 12 jam).

Pada minggu kelima, dilakukan hal yang sama seperti pengambilan sebelumnya.

E. Cara kerja :

1. Sterilisasi alat
   a. erlenmeyer, dan tabung reaksi ditutup dengan kapas kemudian dibungkus dengan kertas, disterilkan dengan autoklaf pada temperatur 121 ^{o}C selama 15 menit.
   b. cawan petri yang akan digunakan dan pipet ukur dibungkus kertas, disterilkan dengan oven pada temperatur 170 - 180 ^{o}C selama 2 jam.

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

2. Pembuatan medium (terlampir).
3. Metode TPC (*Total Plate Count*).

   (Hendarko, Sriani dan Endang, 1990)

   a. Membuat suatu seri pengencer dengan kelipatan 10 pada setiap konsentrasi dari suspensi sampel susu sebagai berikut :

      a.1. Diambil 10 ml dari sampel susu dimasukkan kedalam tabung reaksi (10°)

      a.2. Diambil 1 ml sampel susu dari pengenceran pertama (a.1.), kemudian dimasukkan kedalam 9 ml Aquadest steril / pepton (10^{-1}).

      a.3. Suspensi pengenceran 10^{-1} diambil 1 ml sampel susu lagi, diinokulasi kedalam 9 ml larutan pepton (10^{-2}).

   b. Diencerkan medium *Nutrien Agar (NA)* dalam pemanas air dan didinginkan sampai temperatur kira-kira 50 ^{o}C.

   c. Dari suspensi pengenceran 10°, 10^{-1} dan 10^{-2} masing-masing diambil 1 ml dengan pipet ukur steril secara aseptik, dimasukkan kedalam cawan petri. Tiap pengenceran dengan menggunakan dua cawan petri (duplo) kemudian cawan tersebut dituangi dengan medium NA yang telah agak dingin lalu digoyang secara vertikal dan horisontal dengan hati-hati, agar suspensi bahan tercampur merata dengan medium.

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

d. Diinkubasi pada temperatur (37 ^{o}C) selama 24 jam.

e. Sebagai kontrol, dibuat medium NA dengan larutan pepton saja, yang telah disterilkan.

f. Jumlah koloni yang tumbuh dari masing-masing pengenceran dihitung. Kemudian dengan rumus yang ada akan dapat jumlah sel bakteri total.

$$\text{Jumlah sel/ml atau per gram} = \text{jumlah sel per cawan} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

4. Metode MPN (*Most Probable Number*).

(Hendarko, Sriani dan Endang, 1990)

<u>Presumptive test</u>

a. Diambil 3 tabung reaksi,masing-masing telah diisi dengan 10 ml *laktosa cair*, kemudian masing-masing pula diberi 1 ml suspensi dari pengenceran 10°, secara aseptik.

b. Diambil lagi 3 tabung, masing-masing diisi dengan 10 ml *laktosa cair*, kemudian diberi 1 ml suspensi dari pengenceran 10^{-1}, dari tiap perlakuan.

c. Tiga tabung, masing - masing diisi 10 ml laktosa cair, kemudian diberi 1 ml suspensi dari pengenceran 10^{-2} secara aseptik.

d. Sebagai kontrol digunakan *laktosa cair* 10 ml dalam tabung reaksi.

e. Semua tabung diinkubasi pada temperatur 37 ^{o}C selama 24 sampai 48 jam.

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

f. Tabung-tabung yang menunjukkan adanya pembentukan gas, berarti positif ada bakteri koliform group.

Confirmed test

g. Diambil 1 ose dari masing-masing tabung yang menunjukkan adanya gas pada tahap presumptive, kemudian ditanam pada medium BGLB 5 ml.

h. Diinkubasi pada temperatur 37 ^{o}C dan 44 ^{o}C selama 24 sampai 48 jam. Dimana adanya gas pada temperatur 37 ^{o}C untuk menentukan bakteri " *non fecal* " dan temperatur 44 ^{o}C untuk menentukan bakteri " *fecal* ".

i. Adanya gas dalam tabung BGLB, berarti test penegasan positif.

j. Dari tabung-tabung yang positif kemudian di-cocokkan dengan tabel MPN yang sesuai dengan kombinasi penanaman dalam tabung fermentasi.

Complete test

k. Dari tahap penegasan, diambil tabung yang positif, kemudian ditanam pada medium *Endo Agar* dengan indikasi *basic fuchsin*. Penanaman dengan cara " *streak* " atau goresan yaitu menggunakan ujung ose yang mengandung inokulum secara zig-zag diatas permukaan medium.

l. Diinkubasi pada temperatur 37 ^{o}C selama 24 jam.

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

m. Koloni yang tumbuh diamati kemudian dibuat preparat dengan pengecatan gram. Dan selanjutnya diamati dibawah mikroskop.

5. Identifikasi bakteri patogen dalam susu.

a. Isolasi dan identifikasi *Salmonella sp.*

a.1. 1 ml sampel susu murni diinokulasi pada 9 ml medium *Selenit Cystein Broth* (SCB). Diinkubasi pada temperatur 37 ^{o}C selama 24 jam.

a.2. Tabung yang positif (membentuk gas), ditanam pada medium BSA dengan cara "*streak*" atau goresan. Kemudian diinkubasikan pada temperatur 37 ^{o}C selama 24 jam.

a.3. Koloni yang tumbuh, dilakukan pengecatan gram dan dilakukan uji biokimia dengan ditanam pada media KIA, LIA, MIO dan TSIA. **(Koesnijo, 1987)**

b. Isolasi dan Identifikasi *Shigella sp.*

b.1. Diambil 1 ose dari sampel susu kemudian diinokulasi pada medium SSA, dengan cara " *streak* " atau goresan.

b.2. Dinkubasikan pada temperatur 37 ^{o}C selama 24 jam.

b.3. Koloni yang tumbuh, dilakukan pengecatan gram dan dilakukan uji biokimia dengan ditanam pada medium KIA, LIA, MIO dan TSIA. **(Koesnijo, 1987)**

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

c. Isolasi dan Identifikasi *Staphylococcus sp.*

c.1. Diambil 1 ose suspensi dari sampel murni, dan diinokulasikan pada medium MSA yang telah disiapkan. Penanaman dilakukan dengan cara " *streak* " atau goresan.

c.2. Diinkubasikan pada temperatur 37 ^{o}C selama 24 jam.

c.3. Koloni yang tumbuh dan dicurigai sebagai koloni *Staphyloccus sp.*, diambil dengan ose, kemudian dibuat preparat dan dilakukan pewarnaan gram.

c.4. Diamati dengan mikroskop. **(Suparwoto, 1988)**

d. Isolasi dan identifikasi *Eschericia coli.*

d.1. Diambil 1 ose dari biakan *Lactosa Broth* yang positih terdapat gas pada tahap presumtif-MPN kemudian diinokulasikan pada medium *Endo Agar* (EA). Penanaman dilakukan dengan cara goresan.

d.2. Dinkubasikan pada temperatur 44 ^{o}C selama 24 jam.

d.3. Koloni yang tumbuh, diambil dengan ose, kemudian dibuat preparat dengan pewarnaan gram, dilakukan uji biokimia dengan ditanam pada medium KIA, LIA, dan MIO.

(Trihendrokesowo, 1988)

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

e. Isolasi dan identifikasi *Vibrio sp.*

e.1. Diambil 1 ml sampel susu murni diinokulasikan pada medium diperkaya TCBS dengan cara taburan.

e.2. Dinkubasikan pada temperatur 37 ^{o}C selama 24 jam.

e.3. Koloni yang tumbuh dan diduga bakteri *Vibrio sp.*

Kuning dengan diameter 2 - 3 mm diduga *Vibrio cholera.*

warna koloni biru hijau diduga *Vibrio Parahemolyticus.*

e.4. Untuk penegasan, dilakukan pengecatan gram, uji identifikasi dengan ditanam pada medium KIA, LIA, MIO dan TSIA. **(Koesnijo, 1987)**

6. Reduktase dengan *Biru Metilen.*

a. 1 ml *tiosianat biru metilen* dimasukan kedalam tabung reaksi steril secara aseptik.

b. Diambil 10 ml sampel susu murni, kemudian dituangkan kedalam tabung reaksi tersebut secara aseptik pula. Tabung digoyang agar homogen.

c. Tabung direndam dalam air yang temperaturnya 35,5 ^{o}C sampai 37,5 ^{o}C sampai warna biru lenyap. Warna biru dibagian atas dekat dengan udara tetap bertahan karena tidak terjadi reduksi.

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

d. Apabila banyak koloni bakteri yang terdapat dalam susu, maka warna biru akan lebih cepat hilang karena tereduksi. **(Cappuccino, 1983)**

Kriteria dinyatakan sebagai berikut :

(i) Reduksi lebih dari 8 jam dengan jumlah bakteri kurang dari 50.000 per ml dinyatakan baik.

(ii) Reduksi 6 - 8 jam dengan jumlah bakteri 100.000 - 4 juta per ml dinyatakan sedang.

(iii) Reduksi 2 - 6 jam dengan jumlah bakteri 4 - 20 juta dinyatakan dapat diterima.

(iv) Reduksi kurang dari 2 jam (sering kurang dari 20 menit) dengan jumlah bakteri lebih dari 20 juta dinyatakan kualitas buruk.

(Buckle et al, 1985)

F. Rancangan Percobaan dan Metode Analisis.

Dalam penelitian ini digunakan Rancangan Acak kelompok (RAK). Dilakukan pengambilan sampel sebanyak tiga kali, kemudian masing-masing sampel diberi perlakuan 0 jam, 4 jam, 8 jam dan 12 jam. Selang waktu pengambilan sampel diabaikan.

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

Rancangan ini dapat digambarkan sebagai berikut :

BLOK	PERLAKUAN			
	A	B	C	D
I	X_0Y_I	X_4Y_I	X_8Y_I	$X_{12}Y_I$
II	X_0Y_{II}	X_4Y_{II}	X_8Y_{II}	$X_{12}Y_{II}$
III	X_0Y_{III}	X_4Y_{III}	X_8Y_{III}	$X_{12}Y_{III}$

Keterangan :

A : Waktu 0 jam setelah dipasteurisasi
B : Waktu 4 jam setelah dipasteurisasi
C : Waktu 8 jam setelah dipasteurisasi
D : Waktu 12 jam setelah dipasteurisasi
X_0Y_I : Waktu 0 jam pada Blok ke I
X_4Y_I : Waktu 4 jam pada Blok ke I
X_8Y_I : Waktu 8 jam pada Blok ke I
$X_{12}Y_I$: Waktu 12 jam pada Blok ke I
X_0Y_{II} : Waktu 0 jam pada Blok ke II
X_4Y_{II} : Waktu 4 jam pada Blok ke II
X_8Y_{II} : Waktu 8 jam pada Blok ke II
$X_{12}Y_{II}$: Waktu 12 jam pada Blok ke II
X_0Y_{III} : Waktu 0 jam pada Blok ke III
X_4Y_{III} : Waktu 4 jam pada Blok ke III
X_8Y_{III} : Waktu 8 jam pada Blok ke III
$X_{12}Y_{III}$: Waktu 12 jam pada Blok ke III

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)