

III. BAHAN DAN METODA

3.1. Bahan

Bahan-bahan yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu plate count agar (PCA), Buffered Peptone Water (BPW), Lauryl Tryptose Broth (LTB), Eosin Metilen Blue (EMB), Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar, Lysine Iron Agar (LIA), Triple Sugar Iron (TSI) agar, gliserol, nutrient agar, nutrient broth, kristal violet, larutan iodin, safranin, dan larutan etanol 95 %.

3.2. Metoda

Metoda yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Total Plate Count (TPC)

Sebanyak 25 gram dari masing-masing sampel dihomogenkan di dalam 225 mL larutan buffer pepton. Selanjutnya dibuat pengenceran bertingkat hingga konsentrasi 10^{-8} (*triplicate serial dilutions*), ditanamkan dalam Plate Count Agar (*pour plated*), dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C. Kemudian dihitung koloni yang tumbuh dan diinterpretasikan sebagai log 10 cfu/g (Azanza and Ortega, 2004).

2. Coliorm count

Sebanyak 1 mL dari larutan pengenceran bertingkat dalam larutan buffer pepton (seperti prosedur 1) diinokulasikan ke dalam 9 mL Lauryl Tryptose Broth (LTB) dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 35°C. Kemudian, 1 loop sampel dari dalam LTB yang memberikan ciri positif kekeruhan dan pembentukan gas diambil, digoreskan pada Eosin Metilen Blue agar (EMB), dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C untuk rekonfirmasi keberadaan coliform. Hasil tes dilaporkan sebagai *most probable number* (MPN) per gram sampel Azanza and Ortega, 2004).

3. Identifikasi kontaminasi *Escherichia coli*

Sebanyak 1 mL dari larutan pengenceran bertingkat dalam larutan buffer pepton (seperti prosedur 1) diinokulasi pada Eosin Metilen Blue agar (*streak plated*), dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C. Koloni berwarna ungu muda menunjukkan ciri koloni *Escherichia coli*. Koloni yang diperoleh kemudian diuji secara biokimia yaitu uji pada agar miring Triple Sugar Iron (TSI) Agar dan

Lysine Iron Agar (LIA), motility test, dan pewarnaan gram. *Escherichia coli* akan memberikan warna kuning slant dan kuning butt pada TSIA, ungu slant dan ungu butt pada LIA, kekeruhan medium pada uji motility, dan warna merah muda pada pewarnaan gram. Isolat positif kemudian disimpan dalam stok agar miring nutrient agar.

4. Identifikasi kontaminasi *Salmonella* spp.

Sebanyak 25 gram dari masing-masing sampel dimasukkan ke dalam wadah steril yang berisi 225 mL Buffered Peptone Water (BPW) steril, dikocok homogenkan, dan kemudian didiamkan agar cairan kembali kedasar wadah. Suspensi sampel (5 mL) dalam Buffer Peptone Water akan diinkubasikan selama 18-24 jam pada 37°C. Sebanyak 0.1 mL *pre-enriched* sampel tersebut kemudian diinokulasi ke dalam Rappaport Vassiliadis (RV) dan diinkubasi pada 37°C. Setelah 24 jam inkubasi, 0.1 mL *selective enrichment broth* tersebut ditransfer dan disebar (*spread plated*) di atas Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar, diinkubasi pada 37°C selama 24 jam, dan kemudian akan dianalisa koloni khas *Salmonella* pada Lysine Iron Agar (LIA), Triple Sugar Iron (TSI) agar, API 20E diagnostic strips and reagent (BioMerieux), dan pewarnaan gram. *Salmonella* spp akan memberikan warna merah/kuning slant dan hitam butt pada TSIA, ungu slant dan hitam butt pada LIA, dan warna merah muda pada pewarnaan gram. Isolat positif kemudian disimpan dalam stok agar miring nutrient agar.

5. Uji Biokimia

(i). Reaksi dalam LIA dan TSIA

Dipersiapkan agar miring LIA dan TSIA yang telah disterilkan sebelum dilakukan prosedur pengujian. Tiap pengujian dilakukan *triplicate*. Koloni khas masing-masing bakteri uji akan diambil, diinkulasi dalam agar miring Lysine Iron Agar (LIA) dan Triple Sugar Iron (TSI) agar, dan kemudian diidentifikasi koloni yang memberikan reaksi positif.

(ii). Motility test

Untuk melakukan uji ini, akan dibuat terlebih dahulu motility test medium dengan komposisi 10 gram tryptose, 5 gram Natrium Klorida, dan 5 gram agar dalam 1 L akuades. Kemudian, 5 mL medium tersebut akan dimasukkan ke dalam tabung-tabung uji dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama

15 menit. Selanjutnya, 1 loop isolat dari stok ditanamkan secara vertikal ke tengah tabung yang berisi medium motility test steril ke dalam 1-1.5 cm. Dibuat dua tabung untuk masing-masing koloni uji dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 25°C (tabung pertama) dan 37°C (tabung kedua). Interpretasikan hasil:

Uji positif (Motil)	:	Organisme berpindah dari posisi garis inokulasi vertikal dan berdifusi ke dalam medium menyebabkan timbulnya kekeruhan.
Uji negatif (Non-motil)	:	Pertumbuhan bakteri hanya tampak pada garisan inokulasi. Medium disekitarnya tetap jernih.
Kontrol	:	Tidak ada pertumbuhan bakteri, medium tetap jernih dan tidak berwarna.

(iii) Pewarnaan gram

Masing-masing isolat akan dibuat smear pada kaca slide mikroskop dan kemudian dikeringanginkan di atas bunsen yang menyala. Smear yang telah kering dan melekat pada permukaan kaca slide akan diwarnai dengan larutan kristal violet, dibilas dengan air, ditetesi larutan iodin, dan dibilas lagi dengan air. Selanjutnya, kaca slide ditetesi etanol 95% dan dibilas air. Kemudian, safranin sebagai zat warna pembanding akan ditetaskan pada smear yang telah dicuci dengan etanol, dibilas dengan air, dan diamati menggunakan mikroskop.