

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah seluruh produk makanan olahan tepung Latiao yang beredar di *online shop*. Pengambilan sampel dilakukan menggunakan metode *purposive sampling*, dengan total 6 sampel yang digunakan. Sampel tersebut dibagi menjadi dua kategori utama. 3 sampel DB (Ditarik BPOM) merupakan produk Latiao yang peredarannya telah ditarik oleh BPOM. 3 sampel IB (Izin BPOM) merupakan produk Latiao yang masih diizinkan untuk dijual di *online shop*. Pemilihan sampel ini bertujuan untuk merepresentasikan kedua status peredaran produk Latiao yang ada di pasaran daring. Prosedur pengambilan sampel dirancang untuk memungkinkan perbandingan tingkat cemaran mikrobiologi antara produk yang telah dinyatakan bermasalah dan produk yang masih beredar.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama yang digunakan dalam penelitian ini adalah Angka Lempeng Total, AKK, MPN, *Salmonella*, dan *Bacillus cereus* pada Latiao.

Variabel utama kedua yang digunakan adalah tingkat cemaran bakteri pada Latiao.

Variabel utama ketiga adalah status peredaran produk Latiao yang sudah ditarik dan belum ditarik dari peredaran.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Klasifikasi variabel utama penelitian terbagi ke dalam beberapa macam variabel yaitu variabel bebas dan variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah status peredaran produk latiao (sudah ditarik atau belum ditarik dari peredaran)

Variabel tergantung dari penelitian ini adalah Angka Lempeng Total, AKK, MPN, *Salmonella*, dan *Bacillus cereus* pada Latiao dan tingkat cemaran

bakteri pada makanan olahan tepung Latiao. Variabel tergantung dipengaruhi oleh variabel kendali. Variabel kendali perlu dinetralisir atau ditetapkan klasifikasinya supaya hasil penelitian yang didapatkan sesuai dengan hasil yang diinginkan dan tidak perlu dilakukan pengulangan. Variabel kendali terdiri dari metode pengujian, kultur media, suhu, kondisi penyimpanan, dan pengerjaan sampel.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, Angka Lempeng Total (ALT) merupakan jumlah total mikroorganisme aerob mesofilik yang tumbuh pada media *Nutrient Agar* (NA) setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil dinyatakan dalam satuan CFU/g (colony forming unit per gram). Nilai ALT $\geq 10^5$ CFU/g dinyatakan tidak memenuhi syarat berdasarkan Peraturan BPOM No. 13 Tahun 2019.

Kedua, Angka Kapang Khamir (AKK) menunjukkan jumlah koloni jamur (kapang dan khamir) yang tumbuh pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) setelah inkubasi pada suhu 30°C selama 3 hari. Hasil dilaporkan dalam satuan CFU/g. Sampel dinyatakan tidak memenuhi syarat jika melebihi 10^3 CFU/g.

Ketiga *Most Probable Number* (MPN). Keberadaan bakteri coliform diukur menggunakan metode *Most Probable Number* (MPN) melalui tahapan uji praduga (*Lauryl Broth*), penegasan (BGLB), dan pelengkap (*MacConkey Agar*), serta dikonfirmasi dengan pewarnaan Gram dan uji biokimia. Hasil dinyatakan dalam APM/100g. Sampel yang menunjukkan nilai >11 APM/g dianggap tidak memenuhi syarat keamanan mikrobiologi pangan.

Keempat, *Salmonella* sp. Keberadaan *Salmonella* diuji menggunakan tahap pre-enrichment (BPW), seleksi (*Selenite Broth*), dan isolasi (SSA), diikuti pewarnaan Gram dan uji biokimia. Hasil dinyatakan dalam bentuk “positif” atau “negatif”. Sampel dikatakan memenuhi syarat jika hasilnya negatif pada semua uji.

Kelima, *Bacillus cereus*. Jumlah koloni *Bacillus cereus* dihitung dengan metode *pour plate* menggunakan media selektif *Bacillus cereus Agar* (BCA), diikuti dengan pewarnaan Gram dan uji biokimia konfirmasi. Hasil dinyatakan dalam satuan CFU/g. Batas maksimum yang diizinkan menurut BPOM adalah $\leq 10^4$ CFU/g. Nilai di atas batas tersebut menunjukkan cemaran berbahaya.

Keenam, Status Peredaran Produk. Merupakan klasifikasi administratif berdasarkan keputusan BPOM, yaitu apakah suatu produk Latiao telah ditarik dari peredaran (DB) atau masih diizinkan beredar (IB). Data diperoleh dari pengumuman resmi BPOM dan informasi label pada kemasan produk.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Pada penelitian ini digunakan bahan-bahan sebagai berikut, produk makanan latiao yang diambil dari berbagai merek di online shop. Untuk media kultur, digunakan media *Bacillus cereus Agar*, *Nutrient Agar*, media PDA, media SSA, media Selenit, media LB, media BGLB, media MCA, media biokimia SIM (*Sulfide Indole Motility*), KIA (*Kligler Iron Agar*), LIA (*Lysine Iron Agar*), dan *Citrate*. Reagen yang digunakan mencakup larutan *kristal violet*, iodine, alkohol 96%, *safranin* untuk pengecatan Gram, serta larutan ehrlich A dan ehrlich B untuk uji *indole* pada SIM. Larutan pendukung seperti *Buffered Peptone Water* (BPW) untuk pengenceran awal pada pengujian *Salmonella* dan larutan NaCl fisiologis (0,85%) untuk seri pengenceran.

2. Alat

Peralatan yang digunakan mencakup cawan petri steril, tabung reaksi steril, autoklaf untuk sterilisasi alat dan media, inkubator dengan suhu 37°C, mikroskop, kaca objek dan kaca penutup, timbangan analitik, pipet mikro, pembakar Bunsen, serta perlengkapan keamanan kerja pada laboratorium seperti sarung tangan, masker, dan jas laboratorium.

D. Jalannya Penelitian

1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat yang terbuat dari kaca yang digunakan seperti pipet ukur, cawan petri, erlenmeyer, dan gelas beaker dicuci bersih dan dikeringkan. Erlenmeyer ditutup dengan kapas hingga memenuhi mulut erlenmeyer, kemudian dibungkus dengan kertas koran hingga menutupi erlenmeyer. Pipet ukur, cawan petri, dan gelas

beaker hanya di bungkus dengan kertas koran hingga tertutup rapat. Semua alat dari kaca dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 160-180°C selama 2-3 jam.

Sterilisasi media agar dilakukan untuk memastikan bahwa media bebas dari kontaminasi mikroorganisme sebelum digunakan untuk kultur bakteri. Proses ini dilakukan menggunakan autoklaf. Persiapkan media yang baik berupa media yang berbentuk bubuk maupun yang sudah dilarutkan, dimasukkan ke dalam wadah seperti erlenmeyer atau tabung reaksi. Jika media berbentuk bubuk, terlebih dahulu larutkan sesuai dengan komposisi yang tertera pada petunjuk pabrikan. Pastikan larutan homogen dengan mengaduk menggunakan batang pengaduk atau magnetic stirrer. Wadah yang berisi larutan media ditutup dengan kapas atau tutup ulir dan dibungkus dengan kertas untuk mencegah kontaminasi. Kemudian media dimasukkan kedalam autoklaf untuk proses sterilisasi selama 15 menit dengan suhu 121 °C.

2. Preparasi Sampel

2.1 Preparasi Sampel

Sampel kode DB (Dilarang BPOM) 1 dengan Latiao sebanyak 25 gram ditimbang dengan timbangan analitik, kemudian dimasukkan ke dalam 225 mL NaCl fisiologis (0,85%) steril untuk menghasilkan pengenceran 1:10. Sampel kemudian dihomogenkan dengan dikocok manual. Selanjutnya, dilakukan pengenceran seri menggunakan larutan NaCl fisiologis (0,85%) hingga konsentrasi 10^{-7} . Setiap konsentrasi pengenceran disiapkan untuk inokulasi ke media kultur.

3. Pembuatan Media

3.1 Pembuatan Media *Bacillus cereus* Agar (BCA)

Larutkan 10,25 g media dalam 500 mL air suling. Didihkan perlahan, aduk hingga larut sempurna. Tuang ke dalam tabung reaksi, masing-masing sebanyak 10 mL. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dinginkan pada suhu ruang.

3.2 Pembuatan Media Potato Dextrose Agar (PDA)

Larutkan 11,7 g media dalam 300 mL air suling. Didihkan perlahan, aduk hingga larut sempurna. Tuang ke dalam tabung reaksi, masing-masing

sebanyak 10 mL. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dinginkan pada suhu ruang.

3.3 Pembuatan Media *Nutrient Agar (NA)*

Larutkan 18,2 g media dalam 650 mL air suling. Didihkan perlahan, aduk hingga larut sempurna. Tuang ke dalam tabung reaksi, masing-masing sebanyak 10 mL. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit dan dinginkan pada suhu ruang.

3.4 Pembuatan Media *Selenit*

Larutkan 12 g media dalam 200 mL air suling. Didihkan perlahan, aduk hingga larut sempurna. Tuang ke dalam tabung reaksi, masing-masing sebanyak 3 mL dan dinginkan pada suhu ruang.

3.5 Pembuatan Media *Salmonella-Shigella Agar (SSA)*

Larutkan 12 g media dalam 200 mL air suling. Didihkan perlahan, aduk hingga larut sempurna. Tuang ke dalam cawan petri, masing-masing sebanyak 10 mL dan dinginkan pada suhu ruang.

3.6 Pembuatan Media *Lauryl Broth (LB)*

Larutkan 11,05 g media dalam 850 mL suling. Didihkan perlahan, aduk hingga larut sempurna. Tuang ke dalam tabung reaksi yang diberi durham, masing-masing sebanyak 10 mL. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit dan dinginkan pada suhu ruang.

3.7 Pembuatan Media *Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLB)*

Larutkan 34 g media dalam 850 mL air suling. Didihkan perlahan, aduk hingga larut sempurna. Tuang ke dalam tabung reaksi yang diberi durham, masing-masing sebanyak 10 mL. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit dan dinginkan pada suhu ruang.

3.8 Pembuatan Media *Mac Conkey Agar (MCA)*

Larutkan 34 g media dalam 850 mL air suling. Didihkan perlahan, aduk hingga larut sempurna. Tuang ke dalam tabung reaksi, masing-masing sebanyak 10 mL. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit dan dinginkan pada suhu ruang.

3.9 Pembuatan Media *Buffer Pepton Water*

Larutkan 9,032 g media dalam 450 mL air suling. Didihkan perlahan, aduk hingga larut sempurna. Tuang ke dalam vial, masing-masing sebanyak 100 mL. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit dan dinginkan pada suhu ruang.

3.10 Pembuatan Media *Kligler Iron Agar (KIA)*

Media KIA ditimbang sebanyak 2,876 g pada timbangan analitik kemudian dimasukkan ke dalam ke dalam panci dan dilarutka dengan aquades sebanyak 50 mL. Media KIA yang telah dilarutkan lau dipanaskan diatas kompor sampai larut sempurna diaduk dengan spatula kayu dan dituangkan ke dalam tabung reaksi sebanyak \pm 5 mL. Mulut tabung reaksi yang berisikan media ditutup dengan kapas steril dan ditutup koran. Media KIA disterilkan dengan autoklaf pada suhu subu 121°C selama 15 menit, setelah disterilkan dengan autoklaf maka didinginkan dalam posisi $\frac{1}{2}$ bagian miring dan $\frac{1}{2}$ bagian tegak.

3.11 Pembuatan Media *Lysine Iron Agar (LIA)*

Media LIA ditimbang sebanyak 1,6 g pada timbangan analitik kemudian dimasukkan ke dalam panci dan dilarutkan dengan aquades sebanyak 50 mL. Media LIA yang telah dilarutkan lalu dipanaskam diatas kompor sampai larut sempuma diaduk dengan spatula kayu da dituangkan ke dalam tabung reaksi sebanyak \pm 5 mL. Mulut tabung reaks yang berisikan media ditutup dengan kapas steril dan ditutup koran Media LIA disterilkan dengan autoklaf pada suhu suhu 121°C selama 15 menit, setelah disterilkan dengan autoklaf maka didinginkan dala posisi $\frac{1}{2}$ bagian miring dan $\frac{1}{2}$ bagian tegak.

3.12 Pembuatan Media *Sulfide Indole Motility (SIM)*

Media LIA ditimbang sebanyak 1,6 g pada timbangan analitik kemudian dimasukkan ke dalam panci dan dilarutkan dengan aquades sebanyak 50 mL. Media LIA yang telah dilarutkan lalu dipanaskam diatas kompor sampai larut sempuma diaduk dengan spatula kayu da dituangkan ke dalam tabung reaksi sebanyak \pm 5 mL. Mulut tabung reaksi yang berisikan

media ditutup dengan kapas steril dan ditutup koran. Media LIA disterilkan dengan autoklaf pada suhu suhu 121°C selama 15 menit, setelah disterilkan dengan autoklaf maka didinginkan dalam posisi ½ bagian miring dan ½ bagian tegak.

3.13 Pembuatan Media *Simmons Citrate Agar*

Media *Simmons Citrate Agar* ditimbang sebanyak 1,15 g pada timbangan analitik kemudian dimasukkan ke dalam panci dan dilarutkan dengan aquades sebanyak 50 mL. Media sitrat yang telah dilarutkan lalu dipanaskan diatas kompor sampai larut sempurna diaduk dengan spatula kayu dan dituangkan ke dalam tabung reaksi sebanyak +5 mL. Mulut tabung reaksi yang berisikan media ditutup dengan kapas steril dan ditutup koran. Media sitrat disterilkan dengan autoklaf pada suhu suhu 121°C selama 15 menit, setelah disterilkan dengan autoklaf maka didinginkan dalam posisi ½ bagian miring dan ½ bagian tegak.

4. Uji Identifikasi Bakteri *Bacillus cereus*

4.1 Penanaman Sampel pada Media *Bacillus cereus* Agar

Sampel makanan Latiao sebanyak 25 gram ditimbang dengan timbangan analitik, kemudian dimasukkan ke dalam 225 mL larutan NaCl fisiologis (0,85%) steril untuk menghasilkan pengenceran 1:10. Sampel kemudian dihomogenkan dengan dikocok manual. Selanjutnya, dilakukan pengenceran seri menggunakan larutan NaCl fisiologis (0,85%) hingga konsentrasi 10^{-7} . Setiap konsentrasi pengenceran disiapkan untuk inokulasi ke media kultur. Pindahkan 1 mL suspensi dan pengenceran yang diperlukan ke dalam cawan Petri steril. Tambahkan sekitar 10 mL media biarkan memadat di atas permukaan yang dingin. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam pada Media *Bacillus cereus* Agar.

4.2 Isolasi dan Identifikasi pada Media *Bacillus Cereus* Agar (BCA)

Ambil 1 mL larutan sampel dari pengenceran menggunakan pipet steril. Tuang larutan sampel ke media BCA dalam cawan petri steril. Sebarkan larutan sampel secara merata. Kemudian Tuang media BCA dan tunggu hingga media mengeras. Kemudian inkubasi cawan petri dalam posisi

terbalik pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah masa inkubasi, amati pertumbuhan koloni pada media. Koloni *Bacillus cereus* pada media *Bacillus Cereus Agar* yaitu koloni khas (berwarna putih). Koloni diduga diambil untuk dianalisis lebih lanjut.

4.3 Pewarnaan Gram

Pengecatan gram preparat dicat dengan urutan gram A berisi *Kristal violet*, amoniumoksalat, natrium bikarbonat Smith (2005) selama 1 menit, gram B berisi *Iodium* dan KI lama pengecatan 1 menit, Gram C dekolorisasi campuran acetone dan etanol 50:50 selama 1 menit sampai cat tidak terlihat ungu, gram D *safranin* selama 1 menit setiap pergantian proses dicuci dengan air mengalir. Kemudian hasilnya diamati melalui mikroskop. (Thairu *et al*, 2014).

5. Uji Biokimia

5.1 Uji Pada Media *Kligler Iron Agar* (KIA)

Koloni yang diduga bakteri *Bacillus cereus* diambil dengan bantuan jarum end dan jarum ose lalu ditusuk dan digores pada media KIA. Kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

5.2 Uji Pada Media *Lysine Iron Agar* (LIA)

Koloni yang diduga bakteri *Bacillus cereus* diambil dengan menggunakan jarum end dan jarum ose lalu ditusuk dan digores pada media LIA. Kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

5.3 Uji Pada Media *Sulfide Indole Motility* (SIM)

Koloni yang diduga bakteri *Bacillus cereus* diambil dengan menggunakan jarum end lalu di tusuk pada media SIM. Kemudian media SIM di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

5.4 Uji Pada Media *Simmons Citrate Agar*

Koloni yang diduga bakteri *Bacillus cereus* diambil dengan bantuan jarum end dan jarum ose lalu ditusuk dan digores pada media Citrat. Kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

6. Uji Identifikasi Angka Lempeng Total (ALT)

6.1 Penanaman Sampel pada Media NA

Sampel makanan Latiao sebanyak 25 gram ditimbang dengan timbangan analitik, kemudian dimasukkan ke dalam 225 mL larutan NaCl fisiologis (0,85%) steril untuk menghasilkan pengenceran 1:10. Sampel kemudian dihomogenkan dengan dikocok manual. Selanjutnya, dilakukan pengenceran seri menggunakan larutan NaCl fisiologis (0,85%) hingga konsentrasi 10^{-7} . Setiap konsentrasi pengenceran disiapkan untuk inokulasi ke media kultur. Pindahkan 1 mL suspensi dan pengenceran yang diperlukan ke dalam cawan Petri steril. Tambahkan sekitar 10 mL media dan biarkan memadat di atas permukaan yang dingin. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam pada Media NA.

6.2 Perhitungan Angka ALT

Ambil 1 mL larutan sampel dari pengenceran menggunakan pipet steril. Tuang larutan sampel ke media NA dalam cawan petri steril. Sebarkan larutan sampel secara merata. Kemudian Tuang media NA dan tunggu hingga media mengeras. Kemudian inkubasi cawan petri dalam posisi terbalik pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah masa inkubasi, amati pertumbuhan koloni pada media. Jumlah koloni kemudian dihitung dengan *colony counter*.

7. Uji Angka Kapang Khamir (AKK)

7.1 Penanaman Sampel pada Media PDA

Sampel makanan Latiao sebanyak 25 gram ditimbang dengan timbangan analitik, kemudian dimasukkan ke dalam 225 mL larutan NaCl fisiologis (0,85%) steril untuk menghasilkan pengenceran 1:10. Sampel kemudian dihomogenkan dengan dikocok manual. Selanjutnya, dilakukan pengenceran seri menggunakan larutan NaCl fisiologis (0,85%) hingga konsentrasi 10^{-5} . Setiap konsentrasi pengenceran disiapkan untuk inokulasi ke media kultur. Pindahkan 1 mL suspensi dan pengenceran yang diperlukan ke dalam cawan Petri steril. Tambahkan sekitar 10 mL media dan biarkan memadat di atas permukaan yang dingin. Inkubasi pada suhu 25°C selama 72 jam pada Media PDA.

7.2 Isolasi dan Identifikasi pada Media PDA

Ambil 1 mL larutan sampel dari pengenceran menggunakan pipet steril. Tuang larutan sampel ke media PDA dalam cawan petri steril. Sebarkan larutan sampel secara merata. Kemudian Tuang media PDA dan tunggu hingga media mengeras. Kemudian inkubasi cawan petri dalam posisi terbalik pada suhu 37°C selama ±72 jam. Setelah masa inkubasi, amati pertumbuhan jamur pada media. Jamur kemudian diambil dan dilakukan pengamatan pada mikroskop untuk mengetahui jenis jamur.

7.3 Pewarnaan Jamur

Ambil preparat kemudian sterilkan preparat. Ambil sedikit miselium jamur dari media kemudian, letakkan pada *object glass* yang sebelumnya telah ditetesi air. Tutup dengan *deck glass* dan jangan sampai terbentuk gelembung udara. Amati dengan mikroskop.

8. Uji Identifikasi Bakteri *Salmonella*

8.1 Penyuburan Bakteri Pada Sampel dengan *Buffer Pepton Water*

Sampel makanan Latiao sebanyak 25 gram ditimbang dengan timbangan analitik, kemudian dimasukkan ke dalam 225 mL *Buffer Peptone Water* (BPW) steril. Larutan ini dihomogenkan dengan dikocok manual. Setelah homogenisasi, tabung atau botol yang berisi larutan BPW dan sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Inkubasi dilakukan tanpa gangguan dalam inkubator untuk memungkinkan pertumbuhan awal (pre-enrichment) bakteri target, khususnya *Salmonella* spp. Setelah inkubasi, cairan hasil penyuburan digunakan untuk tahap penanaman ke media selektif seperti *Selenite Broth* dan SSA.

8.2 Penanaman Sampel pada Media *Selenit*

Ambil 1 mL larutan hasil penyuburan dari BPW menggunakan pipet steril, kemudian masukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 10 mL media *Selenite Broth* steril. Lakukan inokulasi secara aseptik untuk mencegah kontaminasi silang. Tabung kemudian ditutup dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam posisi tegak. Setelah inkubasi, cairan dari media *Selenite Broth* digunakan sebagai sumber inokulum untuk penanaman pada

media padat selektif seperti SSA (*Salmonella-Shigella Agar*). Pertumbuhan awal dalam media *Selenite Broth* memungkinkan *Salmonella* tumbuh lebih subur, memudahkan identifikasi pada tahap berikutnya.

8.3 Penanaman Sampel dan Identifikasi pada Media *Salmonella-Shigella Agar* (SSA)

Ambil 1 ose suspensi dari tabung *Selenite Broth* yang telah diinkubasi menggunakan ose steril. Goreskan secara zig-zag pada permukaan media SSA dalam cawan petri steril menggunakan teknik *streak agar*. Pastikan penggoresan dilakukan secara hati-hati agar koloni dapat terpisah dengan baik. Tutup cawan petri dan inkubasi secara terbalik pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, amati pertumbuhan koloni pada permukaan media. Koloni *Salmonella* umumnya tampak transparan atau agak bening dengan pusat kehitaman (karena produksi H₂S).

8.4 Pewarnaan Gram

Pengecatan gram preparat dicat dengan urutan gram A berisi Kristal *violet*, amoniumoksalat, natrium bikarbonat, Smith (2005) selama 1 menit, gram B berisi *Iodium* dan KI lama penggecatan 1 menit, Gram C dekolorisasi campuran *aceton* dan etanol 50:50 selama 1 menit sampai cat tidak terlihat ungu, gram D *safranin* selama 1 menit setiap pergantian proses dicuci dengan air mengalir. Kemudian hasilnya diamati melalui mikroskop. (Thairu *et al*, 2014).

9. Uji Identifikasi Bakteri *Most Probable Number* (MPN)

9.1 Penanaman Sampel pada Media *Lauryl Broth* (LB)

Masukkan masing-masing 1 mL dari setiap pengenceran ke dalam tiga tabung reaksi yang telah berisi media LB (*Lauryl Broth*) dan dilengkapi dengan tabung Durham. Tabung Durham digunakan untuk menangkap gas yang dihasilkan oleh fermentasi laktosa sebagai indikator keberadaan bakteri koliform. Inkubasi tabung pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, amati pertumbuhan (kekeruhan) dan adanya gelembung gas dalam tabung Durham sebagai indikasi positif. Tabung positif akan dilanjutkan ke tahap konfirmasi dengan media BGLB (*Brilliant Green Lactose Bile Broth*).

9.2 Penanaman Sampel pada Media *Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLB)

Ambil 1 ose dari tabung LB yang menunjukkan hasil positif (adanya kekeruhan dan gas dalam tabung Durham), lalu inokulasikan ke dalam tabung reaksi yang berisi media BGLB yang juga dilengkapi dengan tabung Durham. Lakukan inokulasi secara aseptik untuk menghindari kontaminasi silang. Setelah inokulasi, inkubasi tabung pada suhu 37°C selama 24 jam dalam posisi tegak. Setelah masa inkubasi, amati hasil pertumbuhan. Tabung yang menunjukkan kekeruhan dan pembentukan gas di dalam tabung Durham dinyatakan positif mengandung koliform. Hasil positif dari media BGLB dapat dilanjutkan ke tahap isolasi menggunakan media selektif diferensial seperti *MacConkey Agar* (MCA) untuk identifikasi lebih lanjut terhadap *Escherichia coli*.

9.3 Penanaman Sampel dan Identifikasi pada Media *Mac Conkey Agar* (MCA)

Ambil 1 ose inokulum dari tabung BGLB yang menunjukkan hasil positif dan goreskan secara zig-zag pada permukaan media MCA yang telah *memadat* di dalam cawan petri steril. Gunakan teknik aseptik dan teknik *streak agar* agar koloni dapat terpisah dengan baik. Cawan petri kemudian diinkubasi secara terbalik pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, amati pertumbuhan koloni pada media. Koloni *E. coli* biasanya muncul berwarna merah muda hingga ungu karena fermentasi laktosa. Koloni diduga dapat diambil untuk diuji lebih lanjut menggunakan pewarnaan Gram dan uji biokimia guna mengkonfirmasi identitas mikroorganisme.

9.4 Pewarnaan Gram

Pengecatan gram preparat dicat dengan urutan gram A berisi Kristal *violet*, amoniumoksalat, natrium bikarbonat Smith (2005) selama 1 menit, gram B berisi *Iodium* dan KI lamapengecatan 1 menit, Gram C dekolorisasi campuran acetone dan etanol 50:50 selama 1 menit sampai cat tidak terlihat ungu, gram D *safranin* selama 1 menit setiap pergantian proses dicuci dengan

air mengalir. Kemudian hasilnya diamati melalui mikroskop. (Thairu *et al*, 2014).