BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan merupakan penelitian deskriptif. Menurut (Syapitri et al., 2010) penelitian deskriptif merupakan penelitian untuk melihat gambaran fenomena yang terjadi di dalam suatu populasi tertentu. Pada Penelitian ini digunakan untuk mengidentifikasi dan menganalisis keberadaan cemaran bakteri *Escherichia coli* pada sampel produk perikanan yaitu ikan kakap merah dengan metode yang digunakan adalah metode kualitatif dan semikuantitatif untuk mengetahui adanya kontaminasi bakteri dan nilai APM pada sampel ikan kakap merah.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Kegiatan penelitian ini akan dilaksanakan pada tanggal 6 Januari hingga 28 Februari tahun 2025. Tempat pelaksanaan penelitian ini dilakukan di Badan Pengendalian dan Pengawasan Mutu Hasil Kelautan dan Perikanan Surabaya 1, yang berlokasi di Jl. Raya Bandara Ir. H. Juanda No. 23, Semambung, Sidoarjo, Jawa Timur.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah sampel surveilan(Syapitri et al., 2010) ikan kakap merah yang diperoleh dari perusahaan perikanan di wilayah Sidoarjo dan kota sekitarnya yang diuji di Badan Pengendalian dan Pengawasan Mutu Hasil Kelautan dan Perikanan Surabaya I pada periode 6 Januari hingga 28 Februari tahun 2025.

3.3.2 Sampel

Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah seluruh ikan kakap merah baik dalam bentuk ikan segar utuh dan fillet ikan yang diuji di Badan Pengendalian dan Pengawasan Mutu Hasil Kelautan dan Perikanan Surabaya I selama periode 6 Januari hingga 28 Februari tahun 2025.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain adalah neraca analitik, kertas timbang, sendok timbang, hotplate, batang pengaduk, erlenmeyer, bunsen, labu ukur, bag filter, stomacher, mikropipet, mikrotip, tabung reaksi, tabung durham, pipet boy, pinset, rak tabung, inkubator, ose bulat, waterbath, cawan petri, botol scot.

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini antara lain adalah produk perikanan segar yang akan diuji, kapas, benang, kertas tahan panas, serta beberapa larutan dan media kultur yang digunakan untuk analisis mikrobiologi, antara lain Butterfield's Phosphate Buffer (BFP), Levine's Eosin Methylene Blue agar (L-EMB), Lauryl Tryptose Broth (LTB), Escherichia Coli Broth (EC Broth), Plate Count Agar (PCA), Tryptophan Broth (TB), MRVP Broth, Simmon's Citrate Agar, serta reagen seperti MR, VP (Alpha Napthol + KOH 40 %), dan Kovac serta aquades.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Independen (Variabel Bebas)

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu sampel ikan kakap merah yang diuji di Badan Pengendalian dan Pengawasan Mutu Hasil Kelautan dan Perikanan Surabaya I .

3.5.2 Variabel Dependen (Variabel Terikat)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah cemaran bakteri *Escherichia coli* pada ikan kakap merah yang diuji Badan Pengendalian dan Pengawasan Mutu Hasil Kelautan dan Perikanan Surabaya I.

3.6 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Skala	Hasil Ukur
Cemaran bakteri *Escherichia coli* pada ikan kakap merah	Bakteri gram negatif yang merupakan bakteri patogen pada ikan kakap merah yang diuji di BPPMHKP Surabaya 1 pada periode bulan Januari hingga Februari tahun 2025	Uji APM (Angka Paling Mungkin) 1. Uji Penduga 2. Uji Penegasan	Nominal	1. (+) Gas tabung durham dan keruh pada media 2. (+) Koloni berwarna hijau metalik
		Uji Biokimia 1. Uji Indol 2. Uji MR 3. Uji VP 4. Uji Sitrat 5. Uji Gas Laktosa	Nominal	1. (+) Cincin merah 2. (+) Warna merah pada media 3. (+) Warna merah pada media 4. (+) Warna biru pada media 5. (+) Gas tabung durham dan keruh pada media

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Penyiapan Contoh

Dengan menerapkan teknis aseptis, sampel ikan segar utuh difillet, dipotong kecil – kecil sedangkan sampel fillet ikan dipotong kecil – kecil dengan berat 25 gram dan dihomogenkan dengan stomacher. Kemudian dilakukan pengenceran dengan 3 seri tabung.

3.7.2 Sterilisasi Alat

Alat yang digunakan harus disterilkan terlebih dahulu menggunakan oven pada suhu 170 - 180°C selama 2 jam. Untuk media

yang akan digunakan disterilisasi menggunakan autoklaf dengan metode panas uap selama 20 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm.

3.7.3 Pembuatan Media

3.7.3.1 Butterfield's Phosphate Buffer (BFP)

Dibuat larutan stok dengan melarutkan 34 gram KH_2PO_4 dalam 500 mL aquades. Atur pH menggunakan NaOH IN hingga pH menjadi 7,2. Setelah pH sesuai, larutan ditambahkan aquades hingga volumenya mencapai 1 liter.

Dibuat larutan kerja dengan pipet 10 ml larutan stok dan diencerkan hingga 1L dengan menggunakan aquades. Larutan ini kemudian disterilkan dengan autoklaf.

3.7.3.2 Lauryl Tryptose Broth (LTB)

Sebanyak 17,8 g serbuk LTB, lalu dilarutkan aquades 500 ml. Selanjutnya dihomogenkan di dalam beaker glass yang diberi magnetic stirrer menggunakan hot plate, dipanaskan hingga larutan menjadi kuning bening atau larut sempurna. Media disterilisasi menggunakan autoklaf. Larutan media yang steril dipipet sebanyak 9 ml ke dalam tabung reaksi yang berisi tabung durham.

3.7.3.3 Escherichia Coli Broth (EC Broth)

Sebanyak 18,5 g serbuk EC Broth, lalu ditambahkan aquades 500 mL. Selanjutnya dihomogenkan di dalam beaker glass yang diberi magnetic stirer menggunakan hot plate, dipanaskan hingga larutan menjadi kuning bening atau larut sempurna. Media disterilisasi menggunakan autoklaf. Larutan media yang steril dipipet sebanyak 9 ml ke dalam tabung reaksi yang berisi tabung durham.

3.7.3.4 Levine's Eosin Methylen Blue (L-EMB) Agar

Sebanyak 18,73 gram serbuk L-EMB dilarutkan dalam 500 ml aquades. Media dipanaskan menggunakan hot plate pada suhu hingga mendidih sambil diaduk menggunakan magnetic stirrer. Setelah larutan media mendidih dan larut sempurna, media

disterilisasi menggunakan autoklaf. Larutan media yang telah disterilisasi dituang dalam cawan petri sebanyak lebih kurang 15 ml. Larutan media yang telah disterilisasi dituang dalam cawan petri dan didiamkan hingga padat.

3.7.3.5 Plate Count Agar (PCA)

Sebanyak 11,75 gram serbuk PCA dilarutkan dalam 500 ml aquades. Media dipanaskan menggunakan hot plate hingga mendidih sambil diaduk menggunakan magnetic stirrer. Setelah larutan media mendidih dan larut sempurna, media disterilisasi menggunakan autoklaf. Larutan media yang telah disterilisasi dituang dalam tabung reaksi dan di miringkan.

3.7.3.6 Tryptophan Broth (TB)

Sebanyak 3,75 gram serbuk TB dilarutkan dalam 250 ml. aquades. Media dipanaskan menggunakan hot plate sambil diaduk menggunakan magnetic stirrer. Media disterilisasi menggunakan autoklaf. Larutan media yang telah disterilisasi dipipet sebanyak 5 ml ke dalam tabung reaksi.

3.7.3.7 MR-VP Broth

Sebanyak 4,25 gram serbuk MR-VP dilarutkan dalam 250 mL aquades. Media dipanaskan menggunakan hot plate sambil diaduk menggunakan magnetic stirrer. Setelah itu media disterilisasi menggunakan autoklaf. Larutan media steril dipipet ke dalam tabung reaksi sebanyak $\pm 3 - 5$ mL untuk uji MR dan uji VP.

3.7.3.8 Simmon's Citrat Agar

Sebanyak 12,14 gram serbuk Simmon’s Citrat Agar dilarutkan dalam 500 Ml aquades. Media dipanaskan menggunakan hot plate sambil diaduk menggunakan magnetic stirrer. Setelah larutan media mendidih dan larut sempurna, larutan media di sterilisasi menggunakan autoklaf. Larutan media steril dipipet sebanyak ± 5 ml ke dalam tabung Reaksi. Sebelum media beku miringkan tabung hingga agar miring 4 - 5 cm.

3.7.4 Persiapan Pengujian

Sampel ditimbang sebanyak 25 g kemudian tambahkan 225 mL larutan Butterfield's phosphate buffer dalam bag filter. Selanjutnya dihomogenkan selama 2 menit dengan stomacher. Homogenat ini merupakan larutan dengan pengenceran 10^{-1}. Menyiapkan pengenceran 10^{-2} dengan cara melarutkan 1 ml larutan 10^{-1} ke dalam 9 ml larutan pengencer BFP. Setiap pengenceran dilakukan pengocokan minimal sebanyak 25 kali dengan vortex. Memindahkan dengan menggunakan mikropipet, sebanyak 1 mL larutan dari setiap pengenceran ke dalam 3 tabung LTB yang berisi tabung durham. Menginkubasi tabung- tabung tersebut pada suhu 35°C, memperhatikan gas yang terbentuk setelah diinkubasi selama 48 jam.

3.7.5 Uji Pendugaan *E.coli*

Dari setiap tabung LTB (lauryl tryptose broth) yang positif kemudian diinokulasi ke tabung-tabung EC Broth sebanyak 9 ml yang berisi tabung durham dengan menggunakan jarum ose. Inkubasi EC Broth selama 48 jam pada suhu 45,55ºC . Inkubasi tabung-tabung EC Broth pada 48 jam. Tabung positif ditandai dengan kekeruhan dan gas dalam tabung durham.

3.7.6 Uji Penegasan *E.coli*

Dari tabung-tabung EC broth yang positif dengan menggunakan jarum Ose digores ke L-EMB (Levine's eosin methylene blue) agar. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35ºC ± 0,5ºC. Koloni *E. coli* terduga memberikan ciri yang khas (typical) yaitu berwarna hijau metalik tanpa disertai warna hitam di bagian tengah. Diambil sampai 1 koloni (1 ose) (typical) *E. coli* dari masing-masing L-EMBA dan goreskan ke media PCA (plate count agar) miring dengan menggunakan jarum Ose. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C ± 0,5°C untuk uji biokimia.

3.7.7 Uji Biokimia

3.7.7.1 Produksi *Indol*

Pada uji ini diinokulasikan 1 ose dari PCA miring kedalam TB (tryptone broth) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35ºC. Uji indol dilakukan dengan menambahkan 0,3 mL pereaksi kovacs. Reaksi positif jika terbentuk cincin merah pada lapisan bagian atas media dan negatif bila berbentuk cincin warna kuning.

3.7.7.2 Uji *Voges Proskauer*

Pada uji ini diinokulasikan 1 ose dari PCA miring ke dalam MR-VP Broth. Diinkubasi selama 48 jam pada suhu 35 ± 0,5 ºC. Ditambahkan 0,6 mL larutan alpha naphtol dan 0,2 mL 40% KOH. Tabung dikocok dan didiamkan selama 5 menit. Reaksi positif jika terbentuk warna merah muda eosin sampai merah delima (ruby).

3.7.7.3 Uji *Methyl red*

Pada uji ini tabung dengan MR-VP broth diinkubasikan kembali selama 48 jam pada suhu 35ºC ± 0,5ºC. Kemudian ditambahkan 0,4 ml indikator methyl red pada setiap MR-VP broth. Reaksi positif jika terbentuk warna merah dan negatif jika berbentuk warna kuning.

3.7.7.4 Uji Sitrat

Pada uji ini diambil 1 ose dari PCA miring dan digoreskan ke permukaan simmon citrate agar. Diinkubasi selama 96 jam pada suhu 35ºC ± 0,5ºC. Reaksi positif jika terjadi pertumbuhan dan media berubah warna menjadi biru, reaksi negatif jika tidak ada pertumbuhan dan media tetap hijau.

3.7.8 Produksi Gas Laktosa

Pada uji ini diinokulasikan 1 ose dari PCA miring kedalam LTB. Inkubasi kembali selama 48 jam pada suhu 35ºC ± 0,5ºC reaksi positif jika menghasilkan gas pada tabung durham.

3.8 Pengolahan, Penyajian dan Analisis Data

Pengolahan data dilakukan setelah didapatkan hasil dari penelitian adanya kontaminasi cemaran bakteri *Escherichia coli* pada ikan kakap merah. Penyajian data akan disajikan dalam bentuk tabel yang menunjukkan ada atau tidaknya bakteri pada uji APM dan uji biokimia kemudian dijabarkan dalam bentuk narasi, sehingga menggambarkan karakteristik dan tujuan penelitian.

Tabel 3. 2 Pengujian APM

No	Kode Sampel	Hasil Uji APM								
		Replikasi 1			Replikasi 2			Replikasi 3		
		10^{-1a}	10^{-1b}	10^{-1c}	10^{-2a}	10^{-2b}	10^{-2c}	10^{-3a}	10^{-3b}	10^{-3c}

Tabel 3. 3 Pengujian Biokimia

Sampel	Uji Biokimia	Hasil
	Indol	
	MR	
	VP	
	Sitrat	
	Gas Laktosa (LTB)	
	Interpretasi	
	Keterangan	

Hasil positif tabung uji APM dibandingkan dengan gambar lampiran 1. untuk menggambarkan nilai APM/g. Sedangkan uji biokimia dibandingkan dengan lampiran 2 untuk mengidentifikasi keberadaan bakteri *Escherichia coli* pada sampel. Apabila hasil uji biokimia tidak sesuai dengan karakteristik kedua biotipe *E.coli* dapat dinyatakan bakteri yang diuji bukan *Escherichia coli* sehingga hasilnya dinyatakan negatif untuk keberadaan bakteri tersebut.