

BAB III

MATERI DAN METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan dari tanggal 29 Juni 1987 sampai tanggal 21 Juli 1987 di Laboratorium Bakteriologi & Mikologi Kedokteran Hewan Universitas Air langga.

1. Materi Penelitian.

1.1 Sampel penelitian.

Pakan ayam yang digunakan dalam penelitian ini didapat dari enam Poultry Shop di Surabaya yang dijual eceran dalam kemasan kecil. Pakan tersebut diproduksi oleh tiga pabrik pakan yaitu 523 diproduksi oleh PT Charoen Pokphand, PAR-G diproduksi oleh PT Comfeed Indonesia dan AT 53 diproduksi oleh PT Bamaindo Foodstuff yang sama-sama digunakan untuk konsumsi ayam petelur (grower) berumur 14 - 22 minggu dan dalam bentuk butiran, Sampel yang digunakan untuk tiap pabrik adalah 10 kantong plastik (eceran) dari karung atau kemasan 50 kg yang berlainan. Pada penelitian pendahuluan sampel yang digunakan diambil langsung dari pabrik masing-masing 5 sampel untuk tiap pabrik.

1.2 Media dan zat kimia.

Media dan zat kimia yang digunakan dalam penelitian antara lain :

- 1.2.1 Escherichia Coli Broth, sebagai media untuk kuman Coliform dan E. coli.



- 1.2.2 Eosin Methylene Blue Agar, sebagai media untuk mengisolasi dan mendiferensiasi kuman Gram negatif yang berasal dari saluran pencernaan.
- 1.2.3 Larutan Pepton 1%, sebagai media dalam uji Indol.
- 1.2.4 Larutan garam faali steril, untuk pengenceran sampel.

### 1.3 Alat-alat.

Dalam penelitian ini diperlukan alat-alat sebagai berikut ; tabung reaksi, tabung Durham, cawan petri, pipet ukuran 1 ml dan 10 ml, beker gelas ukuran 800 ml, erlenmeyer, autoclave, incubator, ose, neraca, bunsen, mortir, kapas dan kertas pengisap.

## 2. Persiapan.

Media dan reagen yang perlu disiapkan adalah :

### 2.1 Larutan garam faali steril.

Natrium chlorida dilarutkan sebanyak 4,5 g ke dalam 500 ml aquades, dipanaskan di atas panangas air sampai larut, selanjutnya larutan tersebut dibuat agar pHnya tetap  $\pm$  7 dan larutan siap digunakan.

### 2.2 Escherichia Coli Broth.

Media ini setiap literanya mengandung Tryptease pepton 20 g, Laktose 5 g, Bile salt mixture 1,5 g , Dipotasium 4 g, Monopotasium 1,5 g dan Natrium Chlorida 5,5 g. Media ini diambil secara aseptis, kemudian ditimbang seberat 37 g dilarutkan dengan aquades steril sampai satu liter. Selanjutnya dipanaskan di atas penangas air sampai media tersebut larut. Setelah dingin media dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak



9 ml. Tabung reaksi sebelumnya telah diisi dengan tabung Durham, kemudian tabung reaksi digoyang-goyang agar tabung Durham penuh terisi media. Setelah semua tabung Durham terisi media maka semua tabung reaksi ditutup dengan kapas, kemudian dimasukkan ke dalam autoclave dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dan tekanan 15 atmosfer selama 30 menit. Setelah dingin media tetap jernih dan siap digunakan untuk penelitian.

### 2.3 Eosin Methylene Blue Agar.

Media ini setiap liternya mengandung Pepton 10 g, Laktose 10 g, Dipotasium phosphate 2 g, Agar 15 g, Eosin Y 0,4 g. dan Methylene blue 0,065 g. Media ini diambil secara aseptis dan ditimbang seberat 36 g, kemudian dilarutkan ke dalam aquades steril sampai satu liter. Selanjutnya dipanaskan di atas pemanas air sambil diaduk sampai larut. Setelah itu dimasukkan ke dalam autoclave dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dan tekanan 15 atmosfer selama 30 menit. Kemudian didinginkan sampai  $60^{\circ}\text{C}$  sambil digoyang-goyang, agar zat warna yang terkandung teroksidasi secara sempurna. Selanjutnya media dituangkan pada cawan petri steril secara aseptis sebanyak 20 ml dan dibiarkan dalam keadaan tertutup sampai membeku. Setelah beku, cawan petri dibalik dan diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam untuk uji sterilitasnya, apabila setelah semua cawan petri selesai diinkubasikan tidak ada perubahan pada mediana maka dianggap steril dan siap digunakan.



#### 2.4 Larutan Pepton 1%.

Larutan ini setiap liternya mengandung Pepton 10 g dan Natrium chlorida 10 g. Media ini diambil secara aseptis dan ditimbang sebanyak 10 g, kemudian dilarutkan dalam aquades steril sampai satu liter. Setelah itu dipanaskan di atas penangas air sampai larut. Selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 9 ml, setelah semua tabung reaksi terisi larutan, ditutup dengan kapas, kemudian disterilkan dalam autoclave dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dan tekanan 15 atmosfeer selama 10 menit, setelah dingin siap digunakan untuk uji Indol.

#### 2.5 Reagen Kovach.

Reagen Kovach yang digunakan dengan komposisi sebagai berikut Isoamilalkohol 15 ml dan 10 g. Paradi-methyl aminobenzaldehyde dilarutkan ke dalam 50 ml Hidrochlorida pekat.

### 3. Metode dan Cara Kerja.

Cara kerja yang diterapkan dalam penelitian ini berdasarkan metode "Most Probable Number" (Buckle, 1979). Pakan ayam yang digunakan sebagai sampel didapat dari enam Poultry Shop di Surabaya, yang dijual eceran.

#### 3.1 Pembuatan suspensi sampel.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 30 sampel dari tiga pabrik pakan ternak ayam. Setiap sampel diambil dan ditimbang sebanyak 1 g, kemudian dihaluskan dengan mortir dan dilarutkan



dengan garam faali steril dalam tabung reaksi sebanyak 9 ml sehingga konsentrasinya 10%.

### 3.2 Pemupukan pada media Escherichia Coli Broth.

Dibutuhkan 450 tabung reaksi yang telah terisi media E.C. Broth masing-masing 9 ml dan tabung Durham, yang digunakan untuk pemupukan 30 sampel. Jadi setiap sampel terdiri dari 15 tabung reaksi, yang dibagi menjadi 3 kelompok pengenceran, masing-masing kelompok pengenceran terdiri dari 5 tabung reaksi yang telah diberi tanda sesuai dengan kelompoknya. Tabung reaksi dari kelompok I ditandai dengan a, b, c, d, e, untuk 5 tabung reaksi dari kelompok II ditandai dengan f, g, h, i, j dan 5 tabung reaksi dari kelompok III ditandai dengan k, l, m, n, o. Pemupukan dilakukan dengan menambahkan tabung reaksi a, dengan 1 ml sampel dengan pipet steril, dari tabung reaksi a diambil 1 ml untuk sampel tabung reaksi f, kemudian dari tabung reaksi f diambil 1 ml untuk sampel tabung reaksi k. Pemupukan pada tabung reaksi b, c, d dan tabung reaksi e caranya sama seperti tabung reaksi a. Setelah pemupukan selesai maka terdapat tiga seri pengenceran yaitu  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam. Setelah masa inkubasi selesai dilakukan pembacaan dan pencatatan pada setiap pengenceran terhadap pertumbuhan kuman Coliform dan E. coli, yang ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung Durham.



### 3.3 Pemupukan pada media Eosin Methylene Blue Agar.

Disediakan 90 cawan petri steril yang telah diisi dengan media Eosin Methylene Blue Agar untuk pemupukan 30 sampel. Untuk setiap sampel dibutuhkan 3 cawan petri dan setiap satu cawan petri digunakan untuk 5 pemupukan atau dibagi 5 petak pemupukan dari satu seri pengenceran dalam tiap-tiap sampel dan ditandai sesuai dengan kelompok pengencerannya. Pemupukan dilakukan dengan mengambil sampel dari kelompok pengenceran Escherichia Coli Broth yang sesuai dengan tanda atau kodenya secara streak dengan menggunakan ose steril. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah masa inkubasi dilakukan pembacaan dan perhitungan jumlah kuman berdasarkan tabel Mc Crady's pada semua cawan petri pada satu seri pengenceran, yang menunjukkan pertumbuhan kuman Coliform koloninya berwarna abu-abu bersifat mukoid dan E. coli membentuk koloni berwarna hitam pada pusat koloni dan mengkilat.

### 3.4 Pemupukan dalam larutan Pepton 1% untuk media dalam uji Indol.

Disediakan beberapa tabung reaksi yang telah terisi larutan Pepton 1% sebanyak 9 ml. Pada setiap cawan petri yang dicurigai menunjukkan pertumbuhan koloni kuman E. coli, dilakukan pemupukan pada tabung reaksi yang telah disiapkan, dengan menggunakan ose steril. Setelah selesai pemupukan semua tabung reaksi diberi tanda sesuai dengan kelompok pengencerannya.



Kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Setelah masa inkubasi semua tabung reaksi ditetesi dengan reagen Kovach sebanyak 0,3 ml sambil digoyang. Uji Indol positif ditandai dengan terbentuknya warna merah pada permukaan dari larutan Pepton. Semua tabung reaksi yang menunjukkan reaksi positif dicatat dan dihitung berdasarkan tabel Mc Crady's. Hasil yang didapat merupakan jumlah kuman E. coli dalam tiap ml sampel. Cara kerja yang terinci dapat dilihat dalam skema yang tercantum dalam lampiran 1.

4. Kriteria Penentuan Jumlah Kuman Coliform dan E. coli dalam Tiap Satu ml Sampel.

Penentuan jumlah kuman berdasarkan atas :

- 4.1 Untuk kuman Coliform dihitung dari jumlah cawan petri yang mengalami pertumbuhan koloni kuman Coliform dalam tiap seri pengenceran sampel.
- 4.2 Untuk kuman E. coli dihitung dari jumlah uji Indol yang positif dari tiap seri pengenceran sampel.

5. Rancangan Percobaan.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Percobaan Acak Lengkap. Hasil penelitian ditabulasikan dan dianalisis secara statistik dengan menggunakan Analisis varian (Anava), bila ada perbedaan dilanjutkan dengan uji B.N.T. dengan hipotesis sebagai berikut :



- $H_{0I}$  : Tidak terdapat perbedaan jumlah pertumbuhan kuman Coliform dari ketiga pakan jadi.  
 $H_{1I}$  : Terdapat perbedaan jumlah pertumbuhan kuman Coliform dari ketiga pakan jadi.  
 $H_{0II}$  : Tidak terdapat perbedaan jumlah pertumbuhan kuman E. coli dari ketiga pakan jadi.  
 $H_{1II}$  : Terdapat perbedaan jumlah pertumbuhan kuman E. coli dari ketiga pakan jadi.

$$\text{Jumlah Kwadrat Total (JKT)} = \sum X^2 - \frac{\{\sum (\sum X)\}^2}{t.n}$$

$$\text{Jumlah Kwadrat Perlakuan (JKP)} = \frac{\sum (\sum X)^2}{n} - \frac{\{\sum (\sum X)\}^2}{t.n}$$

$$\text{Jumlah Kwadrat Sisa} = \text{JKT} - \text{JKP}$$

## Sidak Ragam

SK	db	JK	KT	F hitung	F tabel	
					0,05	0,01
Perlakuan	t - 1	JKP	$\frac{\text{JKP}}{t - 1}$	$\frac{\text{KT Perlakuan}}{\text{KT Sisa}}$		
Sisa	t(n-1)	JKS	$\frac{\text{JKS}}{t(n-1)}$			
Jumlah	t.n - 1	JKT				

Keterangan :

- SK : sumber keragaman.      KT : kwadrat tengah.  
 db : derajat bebas.          t : perlakuan.  
 JK : jumlah kwadrat.        n : ulangan.



Ho diterima bila F hitung lebih kecil dari pada F(0,05)  
 H1 diterima bila F hitung lebih besar dari pada F(0,05) atau dengan F(0,01).

Bila H1 diterima maka perhitungan dilanjutkan ke uji B.N.T. atau Beda Nyata Terkecil.

$$\text{BNT} = t_{\text{tabel}} \sqrt{\frac{2 \text{ KT sisa}}{n}}$$

$$\text{BNT } 5\% = t \text{ } 5\% \text{ (db sisa)} \sqrt{\frac{2 \text{ KT sisa}}{n}}$$

$$\text{BNT } 1\% = t \text{ } 1\% \text{ (db sisa)} \sqrt{\frac{2 \text{ KT sisa}}{n}}$$

Matrik Selisih Nilai Rata-rata Perlakuan

Nilai rata-rata	$\bar{X}_1$	$\bar{X}_2$	$\bar{X}_3$ .....	$\bar{X}_t$
$\bar{X}$	0	$\bar{d}_{(1-2)}$	$\bar{d}_{(1-3)}$	$\bar{d}_{(1-t)}$
$\bar{X}$		0	$\bar{d}_{(2-3)}$	$\bar{d}_{(2-t)}$
$\bar{X}$			0	$\bar{d}_{(3-t)}$
.				
.				
$\bar{X}$				0



Keterangan :

$$\bar{d} = \bar{X}_1 - \bar{X}_y$$

$\bar{d}$  lebih kecil dari pada BNT (0,05) maka nilai  $\bar{d}$  diberi tanda ns, berarti tidak berbeda nyata.

$\bar{d}$  lebih besar dari pada BNT (0,05) maka nilai  $\bar{d}$  diberi tanda (\*), berarti berbeda nyata.

$\bar{d}$  lebih besar dari pada BNT (0,01) maka nilai  $\bar{d}$  diberi tanda (\*\*), berarti berbeda sangat nyata.

$$\text{Standar deviasi} = SD = \sqrt{\frac{JK}{n-1}}$$

$$sd = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$