

## **BAB 4**

# **MATERI DAN METODE**

## BAB 4 MATERI DAN METODE

### 4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk penelitian eksploratif laboratorik yaitu penelitian yang bertujuan untuk memperdalam pengetahuan mengenai gejala tertentu atau dugaan yang sifatnya masih baru dengan memanfaatkan alat-alat laboratorik (Alfiasari, 2012).

### 4.2. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2015 hingga Juni 2015 di Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Laboratorium Bakteriologi dan Mikrobiologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga.

### 4.3. Materi Penelitian

#### 4.3.1. Bahan penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah susu yang diambil dari 4 peternakan sapi perah di Surabaya yang memiliki sanitasi buruk dengan proses pemerahan yang masih menggunakan cara tradisonal. Bahan lainnya adalah bahan yang digunakan dalam identifikasi *Escherichia coli*, uji sensitifitas dengan metode *diffuse disc*, ekstraksi DNA dengan metode *boilling*, amplifikasi dengan *Polymerase Chain Reaction*, dan elektroforesis: EMBA, *aquadest*, *Pepton Water 1%*, *Kovach*, laktosa, *brilliant green*, suspensi bakteri standart Mac Farland no 1, NaCl fisiologis, media *Muller Hinton Agar* (MHA),

kertas cakram berisi tetrasiklin 30 µg dan sulfonamida 25 µg, *Tris-EDTA* (TE) *buffer* (Vivantis), *master mix*, *destilated water*, primer *tetA* (Macro Gen), primer *sull* (Macro Gen), gel agarosa 2% dan marker.

#### 4.3.2. Alat penelitian

Peralatan yang digunakan untuk pengambilan sampel meliputi tabung reaksi, kapas, pipet hisap, termos (*ice box*). Peralatan yang digunakan untuk identifikasi *Escherichia coli*, uji sensitifitas metode *diffuse disc*, ekstraksi DNA dengan metode *Boilling*, amplifikasi dengan *Polymerase Chain Reaction* dan elektroforesis meliputi cawan petri, *erlenmeyer*, tabung reaksi, tabung Durham, kapas, kompor, ose, bunsen, *micropippet*, tabung *eppendorf*, *microtube*, *white tip*, *yellow tip*, *thermal cycler PCR*, *transluminator-UV*, *vortex*, *gel electrophoresis apparatus*, inkubator, dan autoklaf.

#### 4.4. Definisi Operasional Variabel

- a. Susu sapi segar adalah cairan yang berasal dari ambing sapi yang sehat dan diperoleh dengan cara pemerahan yang benar tanpa mengurangi atau menambah sesuatu komponen atau bahan lain dan tidak mengalami proses pemanasan.
- b. *Escherichia coli* adalah salah satu bakteri koliform fekal dan merupakan bakteri gram negatif yang dapat mencemari susu. Bakteri *Escherichia coli* dapat menyebabkan *foodborne disease*.
- c. Antibiotik adalah senyawa kimia yang dihasilkan oleh berbagai jasad renik atau mikroorganisme yang dapat menghambat atau membunuh pertumbuhan

mikroorganisme lain. Antibiotik memiliki khasiat dalam mengobati berbagai penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli*.

- d. Gen *tetA* adalah gen penyandi dari *Escherichia coli* yang resisten terhadap tetrasiklin.
- e. Gen *sulI* adalah gen penyandi dari *Escherichia coli* yang resisten terhadap sulfonamida.

#### **4.5. Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data**

##### **4.5.1. Pengambilan sampel**

Pengambilan sampel menggunakan metode *Purposive Sampling* yaitu cara pengambilan sampel yang dilakukan dengan memilih subjek berdasarkan kriteria spesifik yang ditetapkan peneliti (Kuntjojo, 2009). Sampel susu diambil dari 4 peternakan sapi perah di Surabaya yang memiliki sanitasi yang buruk dengan kriteria antara lain: (a) kulit dan bulu sapi yang kotor, (b) pemerah tidak menjaga kebersihan pakaian dan badan, (c) alat pemerah yang tidak bersih dan tidak disimpan dengan baik, dan (d) kandang tidak benar-benar terjaga kebersihannya. Pengambilan sampel susu dilakukan pada saat pemerahan pagi hari yaitu pukul 04.00–06.00 WIB. Pada setiap peternakan diambil satu sampel susu sebanyak 10 ml yang diambil dari *milk can* setelah pemerahan selesai. Tiap sampel susu ditempatkan pada tabung reaksi steril dan ditutup dengan kapas steril, kemudian dimasukkan ke dalam termos (*ice box*) (Lukman dan Isroin, 1986).

##### **4.5.2. Identifikasi *Escherichia coli***

Masing-masing sampel susu ditanam pada media *Brilliant Green Bile Broth* (BGBB) yang kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 hingga 24

jam. Hasil positif ditandai dengan adanya perubahan warna dari hijau jernih menjadi hijau keruh yang diikuti terbentuknya gas pada media BGGB, kemudian dilakukan penanaman pada media *Eosin Methylene Blue* (EMBA) dengan menggunakan cara *streak* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 hingga 24 jam. Koloni khas *Escherichia coli* yang tumbuh pada media EMBA akan tampak berwarna hijau metalik. Koloni khas *Escherichia coli* yang tumbuh di EMBA ditanam lagi pada uji indol dengan media *Pepton Water* 1 % dan diinkubasi selama 24 jam pada 37°C. Media *Pepton Water* 1 % yang diduga mengandung *Escherichia coli* dan sudah diinkubasi selanjutnya ditetesi dengan reagen Kovach sebanyak dua atau tiga tetes. Uji positif *Escherichia coli* ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan *Peptone Water* 1 % (Prawesthirini dkk., 2009).

#### 4.5.3. Uji sensitifitas

Uji sensitifitas pada penelitian ini, menggunakan metode *diffuse disc*. Bakteri yang digunakan dalam metode ini memiliki kekeruhan sesuai dengan standart Mac Farland no. 1. Biakan bakteri yang diperoleh dari koloni yang terdapat pada media EMBA ditanam pada tabung reaksi yang berisi 8 ml NaCl fisiologis, selanjutnya dilakukan homogenisasi sampai didapatkan kekeruhan yang sama dengan Mac Farland no. 1. Setelah sesuai dengan standart kekeruhan, selanjutnya diinokulasikan 0,2 ml suspensi sampel tersebut dan diusapkan secara perlahan pada seluruh permukaan media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Bakteri dibiarkan menempel pada media selama 15 menit yang kemudian diletakkan *paper disc* antibiotik tetrasiklin 30µg dan sulfonamida 25 µg pada media tersebut

dengan cakram agak sedikit ditekan agar obat dapat meresap dengan baik. Biakan bakteri diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Hasil pengujian metode ini, ditunjukkan dengan adanya daerah bening atau jernih disekeliling *paper disc* (cakram), sebagai daerah hambatan (zona inhibisi) pertumbuhan kuman. Zona inhibisi hasil penelitian dianalisa dengan interpretasi zona inhibisi standart Kirby-Beuer (Pishesa, 2011).

**Tabel 4.1.** Diameter zona hambat antibiotik

Antibiotik	<i>Resistent</i> (mm)	<i>Intermediet</i> (mm)	<i>Sensitive</i> (mm)
Tetrasiklin 30 µg	≤ 14	15 - 18	≥ 19
Sulfonamida 25 µg	≤ 10	11 - 15	≥ 16

Sumber : (*Clinical and Laboratory Standart Institute*, 2011)

#### 4.5.4. Ekstraksi *Deoxyribo Nucleic Acid*

Ekstraksi DNA *Escherichia coli* menggunakan metode *Boiling*. Sejumlah 200 µl *Tris-EDTA* (TE) *buffer* steril dan 1-2 koloni bakteri ditambahkan dalam tube 1,5 ml kemudian di vortex sampai homogen. Kemudian dilakukan pemanasan pada suhu 90° C selama 10 menit. Setelah itu diamkan pada suhu ruangan selama 1 menit. Lalu dilakukan sentrifugasi 10.000 rpm selama 5 menit dan supernatan siap untuk digunakan sebagai *DNA template*. Koloni bakteri yg digunakan disini adalah koloni pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA).

#### 4.5.5. Amplifikasi dengan *Polymerase Chain Reaction*

Suspensi hasil ekstraksi tersebut, masing-masing sebanyak 5µl volume langsung digunakan sebagai *template* untuk amplifikasi PCR dari fragmen gen *tetA* dan *sull*. 20 µl reaksi PCR terdiri dari 12,5 µl *master mix*, *destilated water* 0,5 µl, primer *reverse* (1 µl), primer *forward* (1 µl) dan *template* DNA 5 µl.

Campuran reagen PCR tersebut kemudian dimasukkan dalam *thermocycler* dengan Pre denaturasi 95°C selama 2 menit, denaturasi 95°C selama 30 detik, *annealing* pada 55°C selama 30 detik, *extension* 72°C dan final *extension* pada 72°C selama 1 menit dengan 30 siklus (Pyatov *et al.*, 2014).

#### 4.5.6. Elektroforesis

Sebanyak 5 µl produk amplifikasi dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa 2% yang terendam dalam tank yang berisi TE *buffer*. Dimasukkan juga marker ke dalam sumur gel agarosa untuk mengetahui ukuran DNA produk PCR, kemudian elektroforesis dijalankan selama 30 menit dengan tegangan konstan 110 volt. Elektroforesis dihentikan dan gel diangkat untuk diamati di bawah sinar Ultra Violet (UV) setelah 30 menit. Hasil yang diperoleh berupa pola pita DNA (*band DNA*) dengan ukuran 178 bp untuk gen *tetA* dan 160 bp untuk gen *sull* (Pyatov *et al.*, 2014).

**Tabel 4.2.** Primer yang digunakan dalam Penelitian

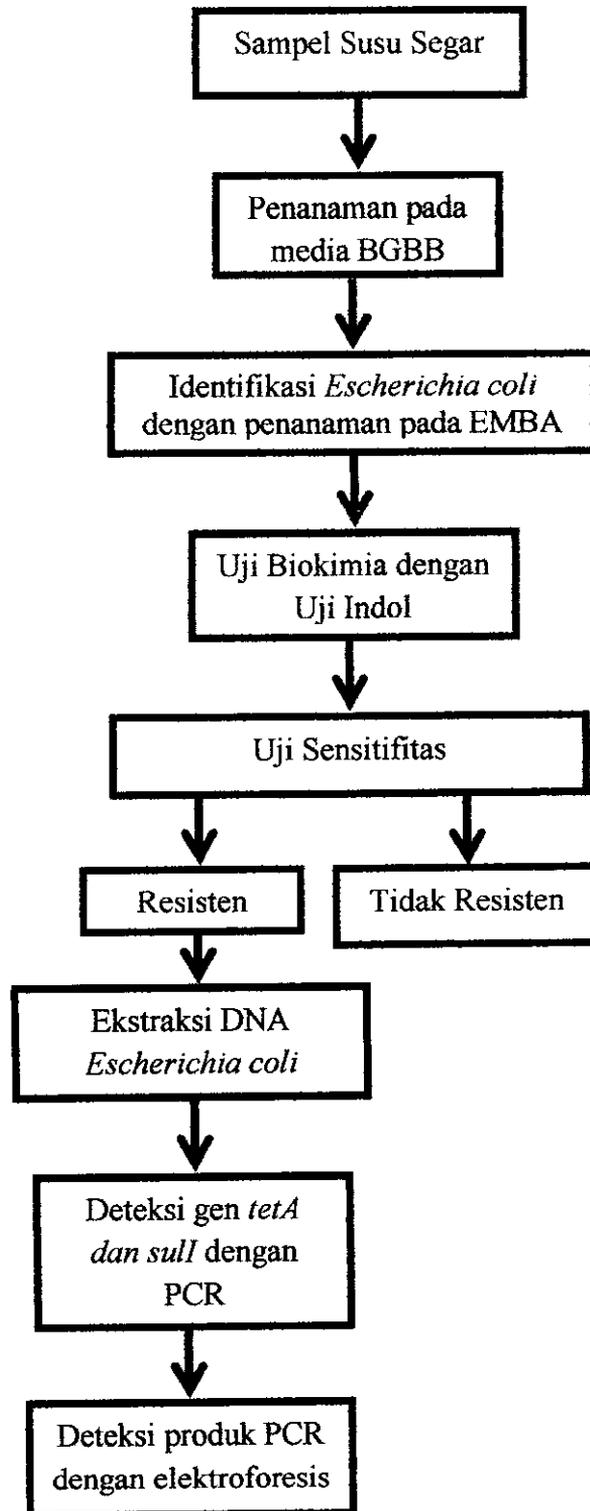
Target Gen	Primer Sequence	Size (bp)
<i>tetA</i>	F: 5'- TGT CCG ACA AGT TGC ATG AT-3'	178
	R: 5'- CCT TGA ACG GCC TCA ATT T-3'	
<i>Sull</i>	F: 5'- GAC GAG ATT GTG CGG TTC TT-3'	160
	R: 5'- CCG ACT TCA GCT TTT GAA GG-3'	

Sumber: (Pyatov *et al.*, 2014)

#### 4.6. Pengolahan Data

Data yang ada secara kualitatif dipaparkan secara deskriptif.

#### 4.7. Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.1. Kerangka Operasional Penelitian