

**ANALISIS DAN IDENTIFIKASI BAKTERI KOLIFORM PADA ES BATU  
DARI BERBAGAI PENJUAL MINUMAN DI SEKITAR SEKOLAH  
DASAR KELURAHAN WONOKROMO SURABAYA**

**SKRIPSI**



**UIN SUNAN AMPEL  
S U R A B A Y A**

**Disusun Oleh:**

**IKKE ARINA FEBRIYANTI  
NIM: H71216057**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL  
SURABAYA  
2020**

## PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Ikke Arina Febriyanti

NIM : H71216057

Program Studi : Biologi

Angkatan : 2016

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul: "ANALISIS DAN IDENTIFIKASI BAKTERI KOLIFORM PADA ES BATU DARI BERBAGAI PENJUAL MINUMAN DI SEKITAR SEKOLAH DASAR KELURAHAN WONOKROMO SURABAYA". Apabila suatu saat nanti saya melakukan tindakan plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian pernyataan keaslian ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya,

Yang menyatakan,



(Ikke Arina Febriyanti)

NIM. H71216057

## LEMBAR PERSETUJUAN PEMBIMBING

Skripsi oleh

NAMA : Ikke Arina Febriyanti

NIM : H71216057

JUDUL : Analisis dan Identifikasi Bakteri Koliform pada Es Batu dari Berbagai Penjual Minuman di Sekitar Sekolah Dasar Kelurahan Wonokromo Surabaya

Telah diperiksa dan disetujui untuk diujikan.

Surabaya, 16 Juli 2020

Dosen Pembimbing 1



Irul Hidayati, M.Kes  
NIP.198102282014032001

Dosen Pembimbing 2



Hanik Faizah, M.Si  
NIP. 20140019

## PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI

Skripsi Ikke Arina Febriyanti ini telah dipertahankan  
di depan tim penguji skripsi  
di Surabaya, 28 Juli 2020

Mengesahkan,  
Dewan Penguji

Penguji I



Irul Hidayati, M.Kes  
NIP.198102282014032001

Penguji II



Hanik Faizah, M.Si  
NUP.201409019

Penguji III



Esti Tyastirin, M.KM  
NIP.198706242014032001

Penguji IV



Miftakhul Munir, M.Si  
NIP.198107252014031002

Mengetahui,

Plt. Dekan, Fakultas Sains dan Teknologi  
UIN Sunan Ampel Surabaya



Dr. Hj. Evi Fatimatur Rusydiyah, M.Ag.  
NIP. 19732272005012003



**KEMENTERIAN AGAMA**  
**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL SURABAYA**  
**PERPUSTAKAAN**

Jl. Jend. A. Yani 117 Surabaya 60237 Telp. 031-8431972 Fax.031-8413300  
E-Mail: perpustakaan@uinsby.ac.id

---

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademika UIN Sunan Ampel Surabaya, yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : Ikke Arina Febriyanti  
NIM : H71216057  
Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Biologi  
E-mail address : ikkearina20@gmail.com

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif atas karya ilmiah :

Sekripsi     Tesis     Desertasi     Lain-lain (.....)  
yang berjudul :

Analisis dan Identifikasi Bakteri Koliform pada Es Batu dari Berbagai Penjual Minuman di

Sekitar Sekolah Dasar Kelurahan Wonokromo Surabaya

beserta perangkat yang diperlukan (bila ada). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya berhak menyimpan, mengalih-media/format-kan, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data (database), mendistribusikannya, dan menampilkan/mempublikasikannya di Internet atau media lain secara *fulltext* untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan atau penerbit yang bersangkutan.

Saya bersedia untuk menanggung secara pribadi, tanpa melibatkan pihak Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran Hak Cipta dalam karya ilmiah saya ini.

Demikian pernyataan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 5 Agustus 2020

Penulis

(Ikke Arina Febriyanti)

















umumnya disajikan bersama minuman untuk menimbulkan sensasi dingin dan menyegarkan. Minuman yang ditambah dengan es batu sangat populer dikalangan anak-anak sekolah. Anak-anak sekolah cenderung menyukai minuman segar untuk mengatasi rasa haus yang timbul akibat aktivitas mereka yang tinggi selama berada di sekolah (Rahayu *et al.*, 2017). Penjualan minuman dengan banyak rasa dan warna, ditambah dengan es batu, serta dijual dengan harga yang murah membuat anak sekolah semakin tertarik, tanpa memedulikan kelayakan minuman tersebut yang kemungkinan tidak higienis (Prayekti, 2017).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Ruchiyat (2007), menyatakan bahwa terdapat hubungan antara frekuensi konsumsi makanan serta minuman jajanan dengan kejadian diare pada siswa SDN kelas 4, 5, dan 6. Siswa yang lebih sering mengonsumsi makanan dan minuman jajanan di luar kantin, lebih sering menderita penyakit diare. Pernyataan tersebut didukung dengan hasil penelitian Irawati *et al.* (1998), yang mengungkapkan bahwa kebanyakan siswa SD masih tidak dapat memilih jajanan yang bersih dan sehat. Hal tersebut dapat dilihat dari banyaknya kandungan pewarna sintetik hingga kontaminasi bakteri patogen pada jajanan yang dikonsumsi oleh siswa SD.

Kontaminasi bakteri pada es batu dapat berasal dari air yang digunakan sebagai bahan baku. Bahan baku yang berasal dari air sumur atau air mentah yang tidak didahului dengan perebusan dapat memungkinkan terjadinya kontaminasi. Selain air yang digunakan sebagai bahan baku es batu, air yang digunakan untuk mencuci es batu yang akan disajikan juga dapat

memengaruhi keamanan es batu. Menurut beberapa survei, pedagang akan mencuci es batu dengan air PDAM atau air dalam wadah (ember) terlebih dahulu sebelum disajikan. Proses pencucian seperti itu dapat meningkatkan peluang terjadinya kontaminasi, karena bakteri dapat menyebar melalui air (Rahayu *et al.*, 2017). Penggunaan alat pemotong berulang kali pada es batu yang berbeda, peletakan alat yang sembarangan, wadah kemasan es batu maupun minuman yang tidak higienis, serta pemilihan lokasi berjualan di lingkungan yang kumuh dapat menambah kemungkinan terjadinya kontaminasi bakteri (Fajriaty, 2016).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Mahat *et al.* (2015), menunjukkan bahwa 13 dari 30 sampel es batu yang diuji dinyatakan positif terkontaminasi bakteri Koliform fekal, dimana pada 11 sampel cemaran yang terdeteksi sebanyak 1 koloni/100 mL hingga >50 koloni/100 mL. Sedangkan pada 2 sampel cemaran yang terdeteksi sebanyak >50 koloni/100 mL. Penelitian yang dilakukan oleh Rifta *et al.* (2016), menunjukkan bahwa sebanyak 23 sampel dari total 46 sampel es batu dinyatakan positif terkontaminasi bakteri *Escherichia coli* dimana 13 sampel es batu merupakan es batu buatan pabrik, sedangkan 10 sampel sisanya merupakan es batu buatan rumah tangga. Sedangkan pada penelitian yang dilakukan oleh Sumarni *et al.* (2017), menunjukkan bahwa pada 6 sampel es batu yang diuji ditemukan beberapa jenis bakteri Koliform, seperti *Enterobacter sp.*, *Citrobacter sp.*, *Bacillus sp.*, dan *Micrococcus sp.*

Menurut Standar Nasional Indonesia (SNI) 01-3839-1995 yang mengatur mengenai syarat mutu es batu menyatakan bahwa mutu es batu

harus memenuhi syarat air minum, yaitu dalam 100 ml es batu tidak boleh mengandung bakteri koliform. Selain itu, dalam Permenkes RI 2 No.416/Men.Kesehatan/Per/IX/1990 juga dijelaskan bahwa dalam 100 ml air minum tidak boleh mengandung bakteri koliform/*Escherichia coli* (bakteri indikator sanitasi).

Bakteri koliform adalah bakteri yang biasa digunakan sebagai indikator adanya kontaminasi pada bahan pangan dan air (Fardiaz, 1993). Menurut Izani *et al.* (2012), bakteri koliform terutama koliform fekal digunakan sebagai indikator kontaminasi air paling penting. Sebagai indikator kualitas air, semakin sedikit kandungan bakteri koliform dalam air, maka semakin baik kualitas air tersebut. Sedangkan semakin tinggi kandungan bakteri koliform dalam air, maka semakin tinggi pula kemungkinan adanya bakteri patogen lain dalam air tersebut (Widyaningsih *et al.*, 2016). Keberadaan bakteri koliform yang terlalu banyak dalam air dapat menyebabkan penyakit pada tubuh manusia, salah satunya diare. Seseorang yang menderita diare akan mengalami buang air besar dengan bentuk setengah cair atau cair dengan frekuensi sebanyak lebih dari 3 kali sehari. Diare menjadi penyebab kematian kedua pada anak-anak pada tahun 2008 dengan angka kematian sekitar 15% (Kusuma *et al.*, 2016).

Menurut Dinas Kesehatan Kota Surabaya (2017), penyakit sistem pencernaan termasuk penyakit diare digolongkan dalam 10 penyakit yang banyak diderita di Surabaya. Sedangkan menurut Wijaya & Siswandy (2009), wilayah Wonokromo menjadi sumber wabah penyakit di Surabaya Selatan. Kumuhnya lingkungan pemukiman di wilayah ini menjadikan Wonokromo

sebagai sumber wabah penyakit diare. Menurut Izzudin & Risyanto (2014), jumlah lingkungan kumuh di kota Surabaya pada tahun 2002 telah mencapai 37 lokasi dimana salah satunya adalah wilayah Wonokromo yang terletak di Surabaya Selatan, dimana kebanyakan rumah yang ada di wilayah ini tidak sesuai dengan standar kebutuhan dan persyaratan rumah sehat, seperti kondisi kebersihan lingkungan, sanitasi serta kualitas air yang buruk. Buruknya kualitas air di Wonokromo dapat disebabkan oleh salah satu sungai yang melewati daerah tersebut, yaitu Kali Surabaya. Sungai yang biasa digunakan oleh masyarakat dalam kehidupan sehari-hari tersebut telah tercemar oleh limbah domestik dan cemaran mikroba yang berasal dari penduduk yang tinggal di sepanjang pinggir sungai tersebut. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Priyono *et al.* (2013), menyebutkan bahwa pada tahun 2007 sampai tahun 2011, cemaran *Escherichia coli* tertinggi di Kali Surabaya mencapai 50.000 koloni/100 ml. Penggunaan air Kali Surabaya yang tercemar sebagai salah satu sumber penyedia air bagi PDAM mengakibatkan kualitas air PDAM menurun. Pada tahun 2018, jumlah bakteri *E.coli* di aliran Kali Surabaya meningkat menjadi 64.000 koloni/100 ml (Candi, 2018).

Berdasarkan data referensi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, kelurahan Wonokromo tercatat memiliki 12 sekolah dasar dimana 4 diantaranya berlokasi dekat dengan anak sungai dari Kali Surabaya, sedangkan 8 sekolah yang lain berlokasi dekat dengan selokan. Umumnya, para penjual jajanan minuman memilih lokasi tepat di pinggir anak sungai atau selokan dimana lokasi tersebut merupakan lokasi yang tidak higienis











- c. Golongan C, yakni golongan air yang bisa digunakan untuk memenuhi keperluan peternakan dan perikanan.
- d. Golongan D, yakni golongan air yang bisa digunakan untuk memenuhi kebutuhan pertanian serta dimanfaatkan dalam usaha-usaha di perkotaan.

## 2.2 Es Batu

Es batu adalah salah satu produk pangan tambahan yang sangat digemari masyarakat Indonesia karena Indonesia merupakan negara tropis dengan suhu yang cukup hangat (Putri, 2015). Es batu yang sering dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia adalah es batu kristal dan es batu balok (Gambar 2.1). Es batu terbuat dari air minum yang dibekukan pada suhu  $0^{\circ}\text{C}$  dan berubah menjadi massa yang padat. Perubahan tersebut terjadi karena ketidakmampuan molekul hidrogen untuk memutus ikatan dengan molekul hidrogen lainnya, sehingga ikatan antar molekul hidrogen semakin rapat dan menyebabkan air berubah wujud dari cair menjadi padat (Apriana *et. al.*, 2014). Produk pangan ini memiliki banyak manfaat, salah satunya sebagai produk pelengkap yang ditambahkan ke dalam minuman agar memunculkan rasa dingin dan menyegarkan saat dikonsumsi (Putri, 2015). Menurut SNI 01-3839-1995, syarat mutu es batu yaitu tidak boleh mengandung bakteri koliform dalam 100 mL air yang digunakan sebagai bahan pembuatnya.









4°C, *E.coli* akan memasuki fase dormansi atau fase tidur. Pada suhu diatas 50°C, *E.coli* dapat mati dalam waktu kurang dari 10 menit (Sunarko, 2012).

*Escherichia coli* memiliki kemampuan memfermentasi glukosa dengan hasil akhir berupa asam (Hemraj *et al.*, 2013). Bakteri ini juga mampu memfermentasikan karbohidrat dan menghasilkan produk asam, tetapi tidak dapat menghasilkan produk netral seperti aseton. *E.coli* termasuk salah satu bakteri yang tidak menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon (Rahayu & Gumilar, 2017). Menurut Reddy *et al.* (2009), bakteri *E.coli* tidak mampu menghasilkan indol.

### 2.3.2 *Salmonella*

Bakteri *Salmonella* merupakan bakteri yang pada umumnya bersifat patogen dan termasuk ke dalam suku Enterobacteriaceae. Berdasarkan patogenitasnya, suku Enterobacteriaceae dapat dibedakan menjadi 2 macam, yaitu bakteri yang bersifat patogen dan apatogen. Bakteri yang bersifat patogen seperti *Salmonella* dan *Shigella*. Sedangkan yang bersifat apatogen seperti bakteri *Klebsiella* dan *Proteus*.

Bakteri *Salmonella* termasuk dalam bakteri yang bersifat gram negatif yang dapat berkembang biak dengan cara membelah diri. *Salmonella* dapat tumbuh dengan cepat pada suhu kamar (Pelczar & Reid, 1958). *Salmonella* umumnya berbentuk batang atau silindris dengan panjang  $\pm 2 \mu\text{m} - 3 \mu\text{m}$  dan berdiameter  $\pm 0,3 \mu\text{m} - 0,6 \mu\text{m}$  (Gambar 2.4). Bakteri ini memiliki alat gerak berupa flagella peritrika





*Shigella* termasuk ke dalam golongan bakteri yang mampu melakukan fermentasi glukosa dengan menghasilkan asam (Kurniasih, 2014).

Menurut Lighfoot (2003), klasifikasi bakteri *Shigella sp.* adalah sebagai berikut.

Kingdom : Bacteria  
Phylum : Proteobacteria  
Class : Gammaproteobacteria  
Order : Enterobacteriales  
Family : Enterobacteriaceae  
Genus : *Shigella*  
Species : *Shigella sp.*

Bakteri *Shigella sp.* umumnya menginfeksi terbatas pada saluran pencernaan. Bakteri ini mampu menghasilkan endotoksin dan eksotoksin. Endotoksin akan menyebabkan iritasi pada dinding usus. Setelah masa inkubasi sekitar 1-4 hari akan menyebabkan nyeri pada perut, feses encer, dan demam (Jawetz *et al.*, 2008).

Bakteri *Shigella sp.* mampu melakukan fermentasi glukosa tetapi tidak dapat melakukan fermentasi laktosa. *Shigella sp.* juga dapat membentuk gas dan asam dari karbohidrat, serta mampu memfermentasikan manitol. Pada uji sitrat, bakteri ini akan mengubah warna media dari hijau ke biru, karena bakteri ini menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Sedangkan saat ditumbuhkan pada media *Salmonella & Shigella Agar* (SSA), koloni bakteri ini akan tampak halus dan berukuran kecil tidak berwarna (Nygren *et al.*, 2012).















dalam air. Media LB dapat mendeteksi bakteri koliform berdasarkan karakteristik bakteri yang mampu menghasilkan gas dari proses fermentasi laktosa. Komposisi media ini terdiri dari pepton, bubuk Lab-Lemco, serta laktosa dengan pH  $6,9 \pm 0,2$  pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$  (Khotimah, 2016).

Prinsip uji ini, yaitu menginokulasikan sampel air pada tabung reaksi berisi media *Lactose Broth* (LB) dan tabung Durham dalam posisi terbalik, lalu diinkubasi selama 24-48 jam. Apabila muncul gas di bagian dasar tabung, maka sampel tersebut dinyatakan positif terkontaminasi bakteri koliform (Wati, 2017).

## 2. Uji Penegasan (*Confirmed Test*)

Tahap uji penegasan ini dilakukan untuk memastikan dan menegaskan hasil yang dinyatakan positif pada uji penduga. Pada uji ini, media yang digunakan adalah *Brilliant Green Lactose Broth* (BGLB). Media *Brilliant Green Lactose Broth* (BGLB) merupakan media selektif yang mengandung laktosa cair yang menunjang pertumbuhan mikroorganisme gram negatif, seperti koliform. Kandungan garam empedu dalam media ini akan menghambat pertumbuhan mikroorganisme gram positif. Pada suhu  $35-37^{\circ}\text{C}$ , bakteri gram negatif akan tumbuh optimal dan melakukan proses fermentasi laktosa yang menghasilkan gas (Kodari, 2013).

Uji ini dapat dilakukan dengan cara menginokulasikan biakan dari tabung uji penduga ke dalam media *Brilliant Green Lactose Broth* (BGLB), selanjutnya diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu

37°C. Apabila terbentuk gas pada tabung Durham, maka sampel tersebut dinyatakan positif mengandung bakteri koliform. Untuk menentukan jumlah koliform dalam sampel, dapat disesuaikan dengan tabel MPN (Wati, 2017).

### 3. Uji Pelengkap (*Completed Test*)

Uji pelengkap umumnya menggunakan media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA). Media *Eosin Methylene Blue Agar* adalah media yang digunakan dalam uji pelengkap guna mengisolasi bakteri koliform. Komposisi media ini terdiri dari kalium hidrogen fosfat, laktosa, *methylene blue*, eosin Y, serta agar dengan pH  $6,8 \pm 0,2$  pada suhu 25°C. Pertumbuhan bakteri gram positif akan dihambat oleh zat pewarna *methylene blue* dalam kondisi asam. Zat pewarna ini juga akan menghasilkan warna ungu gelap dengan hijau metalik yang mengkilap. Warna hijau metalik mengkilap ini merupakan indikator adanya bakteri koliform yang dihasilkan dari proses fermentasi laktosa (Khotimah, 2016).

Uji ini dilakukan dengan cara menginokulasikan biakan positif dari uji penegasan ke dalam media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) dengan menggunakan metode gores. Kemudian, diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Apabila warna media berubah menjadi warna hijau metalik, maka sampel tersebut dinyatakan positif tercemar bakteri koliform (Wati, 2017).

### 2.5.2 Isolasi Bakteri Non-fermentasi Laktosa

Bakteri non-fermentasi laktosa merupakan jenis bakteri yang tidak mampu memfermentasi laktosa, seperti *Salmonella* dan *Shigella*. Bakteri non-fermentasi laktosa dapat diisolasi dan diidentifikasi melalui beberapa uji, salah satunya adalah uji *Salmonella-Shigella*. Uji *Salmonella-Shigella* merupakan uji yang digunakan untuk mengetahui keberadaan bakteri *Salmonella* dan *Shigella* dalam makanan dan minuman. Media yang biasa digunakan dalam uji ini adalah medium *Salmonella-Shigella Agar* (SSA). *Salmonella-Shigella Agar* (SSA) adalah medium selektif yang mampu mendeteksi keberadaan *Salmonella-Shigella* yang tumbuh dan berkembang biak pada suatu sampel. Medium SSA akan memberikan hasil zona kuning diantara koloni yang tumbuh pada medium. Pertumbuhan bakteri *Salmonella* akan memunculkan koloni berwarna merah, baik dengan maupun tanpa titik tengah yang berwarna hitam. Bakteri *Salmonella* memiliki kemampuan untuk melakukan reduksi tiosulfat menjadi sulfat sehingga akan muncul sebagai koloni hitam. Selain itu, degradasi laktosa yang dilakukan oleh *Salmonella* akan menghasilkan asam yang menyebabkan koloni yang muncul berwarna merah (Puspitasari *et al.*, 2015). Sedangkan koloni bakteri *Shigella sp.* akan muncul dengan warna putih transparan karena ketidakmampuannya dalam memfermentasi laktosa (Wicaksono, 2016).

## 2.6 Identifikasi Bakteri Koliform

### 2.6.1 Pengamatan Mikroskopis

Identifikasi bakteri dengan pengamatan mikroskopis dapat dilakukan dengan melakukan teknik pewarnaan gram. Pewarnaan gram merupakan suatu teknik yang digunakan untuk mengidentifikasi suatu mikroorganisme berdasarkan karakteristik sifat gram, bentuk, ukuran, serta susunan sel (Khotimah, 2016). Dalam teknik pewarnaan ini, isolat bakteri yang telah difiksasi akan ditetesi oleh 4 macam larutan, yaitu kristal violet, larutan iodium, alkohol, dan pewarna safranin. Bakteri yang terwarnai dalam metode ini dikelompokkan menjadi 2 golongan, yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif akan kehilangan warna ungu (kristal violet) saat dicuci dengan menggunakan alkohol dan akan berwarna merah saat diberi pewarna safranin. Sedangkan bakteri gram positif akan memertahankan warna ungu (kristal violet) dan akan tetap berwarna ungu hingga akhir (Rohmah, 2017).

### 2.6.2 Uji Biokimia

Untuk mengidentifikasi keberadaan bakteri koliform dapat dilakukan dengan uji IMVIC (Indol, *Methyl*-red, Voges Proskauer, Citrate). Uji IMVIC adalah suatu uji yang digunakan untuk mengidentifikasi suatu mikroorganisme dari famili Enterobacteriaceae. Uji ini terdiri dari 4 uji, yakni uji indol, uji *Methyl Red*, uji Voges Proskauer, serta uji *Simmons Citrate* (Khotimah, 2016).

### a. Uji Indol

Uji indol merupakan uji yang digunakan untuk mengidentifikasi suatu bakteri dengan cara melihat kemampuan bakteri tersebut dalam melakukan degradasi asam amino triptofan serta menghasilkan indol. Uji ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi suatu bakteri tertentu karena tidak semua bakteri mampu mendegradasi asam amino triptofan. Terdapat beberapa media yang dapat digunakan dalam uji ini, seperti media *Motility Indole Ornithine* (MIO).

Keberadaan indol yang dihasilkan bakteri dapat diketahui dengan cara menambahkan reagen kovac's yang akan memunculkan cincin berwarna merah. reagen kovac's sering digunakan dalam uji indol karena reagen ini bersifat lebih stabil dan lebih aman (Khotimah, 2016).

### b. Uji Methyl Red

Menurut Khotimah (2016), uji *methyl red* adalah suatu uji yang biasa dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri berdasarkan kemampuannya dalam mengoksidasi glukosa dengan hasil akhir berupa produksi asam dengan konsentrasi yang tinggi. Uji ini umumnya menggunakan media *Methyle red-Voges Proskauer*. *Methyle red-Voges Proskauer* (MR-VP) adalah media yang digunakan dalam uji Voges Proskauer (VP) dan *methyl red* (MR) dengan komposisi yang terdiri dari glukosa, pepton, dan fosfat dengan pH  $6,9 \pm 0,2$  (Khotimah, 2016).

Hasil dinyatakan positif apabila warna media *Methyl red-Voges Proskauer* berubah menjadi merah setelah dilakukan penambahan pereaksi *methyl red*. Sedangkan hasil negatif ditandai dengan warna media tetap berwarna kuning setelah dilakukan penambahan pereaksi *methyl red*.

#### c. Uji Voges Proskauer

Uji ini digunakan untuk mendeteksi kemampuan bakteri dalam memproduksi asetoin. Uji ini dapat dilakukan dengan menambahkan KOH dan alfa-naftol pada media *Methyl red-Voges Proskauer* yang telah ditumbuhi bakteri. Hasil dinyatakan positif apabila setelah ditambah alfa-naftol dan KOH akan menghasilkan warna merah. Sedangkan hasil dinyatakan negatif apabila menghasilkan warna kuning-coklat (Khotimah, 2016).

#### d. Uji Citrate

Uji Citrate merupakan uji yang dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri berdasarkan kemampuannya dalam menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Media yang digunakan dalam uji ini adalah *Simmons Citrate Agar* (SCA). Media *Simmons Citrate Agar* adalah media yang digunakan dalam uji sitrat. Media ini mengandung natrium sitrat dan amonium fosfat yang masing-masing memiliki fungsi sebagai sumber karbon dan sumber nitrogen. Media ini memiliki komposisi yang terdiri dari natrium ammonium sulfat, ammonium dihydrogen fosfat, magnesium sulfat, bromotimol

biru, natrium sitrat, natrium klorida, serta agar dengan kandungan pH  $7\pm 0,2$  pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$ . Bromotimol yang terkandung dalam media ini berfungsi sebagai indikator warna, dimana pada pH 6,9 akan berwarna hijau dan pada pH 7,6 akan berwarna biru (Khotimah, 2016). Jika bakteri yang diuji mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbon, maka media akan berubah warna menjadi biru karena terjadi perubahan pH menjadi basa. Sedangkan, jika bakteri tidak mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbon, maka media akan berubah dari hijau menjadi biru yang menandakan bahwa bakteri tersebut tidak memiliki enzim sitrat permease. Enzim sitrat permease adalah enzim pembawa sitrat ke dalam sel untuk digunakan sebagai sumber karbon (Rohmah, 2017).

## 2.7 Kelurahan Wonokromo

Menurut Izzudin & Risyanto (2014), Wonokromo merupakan salah satu wilayah di Surabaya dengan lingkungan yang termasuk kumuh. Di wilayah ini, kebanyakan rumah tidak sesuai dengan standar kebutuhan dan persyaratan rumah sehat, seperti kondisi kebersihan lingkungan, sanitasi serta kualitas air yang buruk. Kualitas air di Wonokromo juga terbilang buruk yang disebabkan oleh salah satu sungai yang melewati daerah tersebut, yaitu Kali Surabaya. Sungai yang biasa digunakan oleh masyarakat dalam kehidupan sehari-hari tersebut telah tercemar oleh limbah domestik dan cemaran mikroba yang berasal dari penduduk yang tinggal di sepanjang pinggir sungai tersebut. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Priyono *et al.* (2013), menyebutkan bahwa pada tahun 2007 sampai tahun 2011, cemaran

*Escherichia coli* tertinggi di Kali Surabaya mencapai 50.000 koloni/100 ml. Penggunaan air Kali Surabaya yang tercemar sebagai salah satu sumber penyedia air bagi PDAM mengakibatkan kualitas air PDAM menurun. Pada tahun 2018, jumlah bakteri *E.coli* di aliran Kali Surabaya meningkat menjadi 64.000 koloni/100 ml (Candi, 2018).

Berdasarkan data referensi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, kelurahan Wonokromo tercatat memiliki 12 sekolah dasar dimana 4 diantaranya berlokasi dekat dengan anak sungai dari Kali Surabaya, sedangkan 8 sekolah yang lain berlokasi dekat dengan selokan. Umumnya, para penjual jajanan minuman memilih lokasi tepat di pinggir anak sungai atau selokan dimana lokasi tersebut merupakan lokasi yang tidak higienis sehingga dapat meningkatkan kemungkinan kontaminasi bakteri koliform pada produk jajanan minuman yang dijual.





*Broth*), media EMBA (*Eosin Methylene Blue Agar*), media MIO (*Motility Indole Ornithine*), media MR-VP (*Methyl red-Voges Proskauer*), media SCA (*Simmons Citrate Agar*), media SSA (*Salmonella-Shigella Agar*), kapas, aluminium foil, plastik wrap, kristal violet, safranin, iodin, etanol 96%, aquades, reagen kovac's, alfa naftol 5%, KOH 40%, dan pereaksi *methyl red*.

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Teknik Pengambilan Sampel

Sampel es batu yang akan diuji diambil dari berbagai penjual minuman di sekitar 9 sekolah dasar wilayah kelurahan Wonokromo. Sampel yang telah didapatkan, kemudian dikemas dalam plastik steril dan disimpan pada suhu 25-30°C untuk dicairkan terlebih dahulu sebelum dianalisa. Sampel yang telah diambil diuji di laboratorium tidak lebih dari 24 jam setelah pengambilan.

#### 3.4.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan media pertumbuhan mikroba yang akan digunakan pada penelitian ini disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

#### 3.4.3 Pembuatan Media

##### a. *Lactose Broth* (LB)

Media *Lactose Broth* (LB) ditimbang sebanyak 0,702 gram (untuk 1 resep, *single strength*) dan 0,78 gram (untuk 2 resep, *double strength*) dengan menggunakan neraca analitik, kemudian masing-masing dilarutkan dalam 54 ml dan 30 ml aquades dan

dihomogenkan dengan menggunakan *hot plate stirrer*. Media yang telah larut kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Media *Lactose Broth Double Strength* diambil sebanyak 10 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi besar yang berisi tabung durham dalam posisi terbalik. Sedangkan untuk media *Lactose Broth Single Strength* diambil sebanyak 9 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi kecil yang berisi tabung durham dalam posisi terbalik. Mulut tabung reaksi ditutup dengan menggunakan kapas. Selanjutnya disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

**b. *Brilliant Green Lactose Broth (BGLB)***

Media *Brilliant Green Lactose Broth (BGLB)* ditimbang sebanyak 3,24 gram dengan menggunakan neraca analitik, kemudian dilarutkan dalam 81 ml aquades dan dihomogenkan dengan menggunakan *hot plate stirrer*. Media yang telah larut kemudian diambil sebanyak 9 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Mulut tabung reaksi ditutup dengan menggunakan kapas. Selanjutnya disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

**c. *Eosin Methylene Blue Agar (EMBA)***

Media *Eosin Methylene Blue Agar (EMBA)* ditimbang sebanyak 0,9 gram dengan menggunakan neraca analitik, kemudian dilarutkan dalam 25 ml aquades dan dihomogenkan dengan menggunakan *hot plate stirrer*. Selanjutnya disterilisasi dengan

menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

**d. *Motility Indole Ornithine (MIO)***

Media *Motility Indole Ornithine* (MIO) ditimbang sebanyak 0,15 gram dengan menggunakan neraca analitik, kemudian dilarutkan dalam 5 ml aquades dan dihomogenkan dengan menggunakan *hot plate stirrer*. Media yang telah larut kemudian diambil sebanyak 5 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Mulut tabung reaksi ditutup dengan menggunakan kapas. Selanjutnya media disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

**e. *Methyl red-Voges Proskauer (MR-VP)***

Media *Methyl red-Voges Proskauer* (MR-VP) ditimbang sebanyak 0,5 gram dengan menggunakan neraca analitik, kemudian dilarutkan dalam 10 ml aquades dan dihomogenkan dengan menggunakan *hot plate stirrer*. Media yang telah larut kemudian diambil sebanyak 5 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Mulut tabung reaksi ditutup dengan menggunakan kapas. Selanjutnya media disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

**f. *Simmons Citrate Agar (SCA)***

Media *Simmons Citrate Agar* (SCA) ditimbang sebanyak 0,1125 gram dengan menggunakan neraca analitik, kemudian



### 1) Uji Penduga (*Presumptive Test*)

Uji penduga (*presumptive test*) dilakukan dengan menggunakan 9 tabung reaksi (seri 3-3-3) dimana 3 tabung berisi media *Lactose Broth Double Strength* (untuk 2 resep) dan 6 tabung untuk media *Lactose Broth Single Strength*. Sampel es batu yang telah mencair kemudian diambil sebanyak 10 ml dengan menggunakan pipet volume dan dimasukkan ke dalam 3 seri tabung *Lactose Broth Double Strength* yang berisi tabung durham dalam posisi terbalik. Kemudian, diambil sebanyak 1 ml dan 0,1 ml dengan menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing pada 3 seri tabung *Lactose Broth Single Strength* yang berisi tabung durham dalam posisi terbalik. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37° selama 24 jam, kemudian diamati hasilnya. Hasil positif apabila terbentuk gas pada tabung durham.

### 2) Uji Penegasan (*Confirmative Test*)

Pada tabung yang dinyatakan positif dari uji penduga, diambil sebanyak 1-2 ose dan diinokulasikan ke dalam tabung yang berisi 9 ml media *Brilliant Green Lactose Broth* (BGLB) sebanyak 3 seri. Kemudian, 3 seri tabung *Brilliant Green Lactose Broth* (BGLB) tersebut diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu 37°C. Setelah 2x24 jam, dilakukan pembacaan hasil dengan melihat jumlah tabung *Brilliant Green Lactose Broth* (BGLB)

yang menunjukkan positif terbentuk gas. Kemudian dicocokkan dengan tabel MPN (*Most Probable Number*) (Lampiran 1.).

### 3) Uji Pelengkap (*Completed Test*)

Diambil biakan dari tabung uji penegasan yang dinyatakan positif dengan menggunakan jarum ose, kemudian diinokulasikan dengan menggunakan metode gores pada media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA). Selanjutnya diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C.

#### b. Isolasi Bakteri Koliform Non-fermentasi Laktosa

Diukur sebanyak 25 ml sampel air dengan menggunakan gelas ukur dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer berisi 225 ml media LB (*Lactose Broth*), kemudian dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya, diambil sampel dengan menggunakan jarum ose dan digoreskan pada media SSA. Lalu diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Sampel dinyatakan positif terkontaminasi bakteri *Salmonella* apabila muncul koloni berwarna hitam, sedangkan sampel dinyatakan positif terkontaminasi bakteri *Shigella* apabila muncul koloni yang tidak berwarna.

### 3.4.5 Identifikasi Bakteri Koliform

Identifikasi bakteri koliform dilakukan dengan 2 cara, yaitu dengan pengamatan mikroskopis dan uji biokimia, kemudian bakteri diidentifikasi berdasarkan karakteristiknya menurut buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Brenner *et al.*, 1925) dan



selama 24 jam. Setelah diinkubasi, ditambahkan reagen kovac's sebanyak 5 tetes ke dalam tabung dan didiamkan selama 10 menit. Hasil dinyatakan positif apabila terbentuk lapisan merah pada permukaan biakan.

## 2) Uji *Methyl red*

Diambil koloni yang tumbuh dari media EMBA dengan menggunakan jarum ose dan diinokulasikan ke dalam media *Methyl red-Voges Proskauer* (MR-VP). Lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, ditambahkan pereaksi *methyl red* sebanyak 5 tetes ke dalam tabung. Hasil dinyatakan positif apabila warna media berubah menjadi merah yang menandakan terbentuknya asam.

## 3) Uji *Voges-Proskauer*

Diambil koloni yang tumbuh dari media EMBA dengan menggunakan jarum ose dan diinokulasikan ke dalam media *Methyl red-Voges Proskauer* (MR-VP). Lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, ditambahkan alfa naftol 5% sebanyak 15 tetes dan KOH 40% sebanyak 10 tetes kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex mixer* dan didiamkan. Hasil dinyatakan positif apabila terbentuk cincin berwarna merah muda.

## 4) Uji *Citrate*

Diambil koloni yang tumbuh dari media EMBA dengan menggunakan jarum ose dan diinokulasikan ke dalam media











Menurut SNI 01-2897-1992 tentang cara uji cemaran mikroba, jumlah tabung yang positif pada uji penegasan kemudian dicocokkan dengan tabel MPN (Lampiran 1) untuk mendapatkan indeks MPN. Dari indeks MPN yang telah didapatkan, seluruh sampel dinyatakan tidak memenuhi atau tidak layak konsumsi karena menunjukkan indeks MPN yang melebihi batas normal yang tertulis pada SNI 01-3839-1995, yaitu 0/100 mL. Jumlah cemaran koloni bakteri koliform tertinggi, yaitu lebih dari 2400 koloni/100 mL dan jumlah cemaran terendah sebanyak 21 koloni/100 mL.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dengan menggunakan metode MPN, diketahui bahwa sampel yang diambil di sekitar SD Al-Furqaan, SD Aisyah, dan SD Budi Dharma memiliki jumlah cemaran bakteri koliform tertinggi, yaitu >2400 koloni/100 mL. Sedangkan pada sampel yang diambil di sekitar SDN Wonokromo I/390 memiliki jumlah cemaran bakteri koliform terendah, yaitu 21 koloni/100 mL.

Berdasarkan survei yang dilakukan peneliti dengan mengamati cara penyajian minuman segar oleh penjual, kontaminasi bakteri koliform tersebut dapat berasal dari beberapa faktor, yang dijelaskan dalam tabel 4.1.



terjadinya kontaminasi, karena bakteri dapat menyebar melalui air. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Fajriaty (2016), mengungkapkan bahwa penggunaan alat pemotong berulang kali pada es batu yang berbeda, peletakan alat yang sembarangan, wadah kemasan es batu maupun minuman yang tidak higienis, serta pemilihan lokasi berjualan di lingkungan yang kumuh dapat menambah kemungkinan terjadinya kontaminasi bakteri.

Pada sampel MIS Yaphiston, sampel yang didapatkan tidak murni hanya es batu saja melainkan telah dicampur ke dalam minuman, sehingga sebelum diuji harus dipisah terlebih dahulu antara es batu dan minumannya. Hal ini menyebabkan kontaminasi yang didapatkan tidak hanya berasal dari es batu, tetapi juga bisa berasal dari air minum yang digunakan dalam pembuatan minuman tersebut. Sedangkan pada 8 sekolah yang lain, sampel yang didapatkan berupa es batu murni yang belum dicampur ke dalam minuman, sehingga dapat dipastikan kontaminasi berasal dari es batu. Indeks MPN yang didapatkan pada sampel MIS Yaphiston melebihi batas yang telah ditentukan, yaitu sebanyak 150 koloni/100 mL. Indeks tersebut sama dengan indeks yang didapatkan pada SD Muhammadiyah 24 dan SDN Wonokromo III/392. Hal ini menunjukkan bahwa baik kontaminasi tidak berasal dari air minum maupun es batu saja, karena kontaminasi juga dapat berasal dari faktor eksternal seperti berasal dari alat pemotong, wadah penyimpanan es batu, dan wadah kemasan minuman.

Pada beberapa penelitian sebelumnya juga terdapat adanya kontaminasi bakteri koliform pada es batu. Pada penelitian yang dilakukan oleh Mako *et al.* (2014), mengungkapkan bahwa sebanyak 93 dari 250 sampel es batu dinyatakan positif terkontaminasi bakteri koliform. Sedangkan pada penelitian yang dilakukan oleh Setiawan *et al.* (2018), menyatakan bahwa seluruh sampel yang diuji dinyatakan positif terkontaminasi bakteri koliform dengan jumlah cemaran tertinggi sebanyak >2400 koloni/200 mL. Kontaminasi bakteri dapat berasal dari air yang digunakan sebagai bahan baku es batu tidak direbus dengan benar sehingga bakteri dalam air tidak mati. Selain itu, kontaminasi juga dapat berasal dari kemasan es batu yang dibiarkan terbuka. Pada penelitian yang dilakukan Falcao *et al.* (2002), sebanyak 60 sampel es batu yang diambil dari 6 lokasi berbeda dinyatakan positif terkontaminasi bakteri koliform dengan total cemaran koliform tertinggi sebanyak 1200 koloni/100 mL. Kontaminasi bakteri tersebut dapat berasal dari air yang digunakan sebagai bahan baku merupakan air yang tidak matang serta alat pemotong es batu yang tidak bersih dan higienis.

#### 4.2.3 Uji Pelengkap

Hasil yang dinyatakan positif pada uji penegasan, selanjutnya dilakukan uji pelengkap yang bertujuan untuk mengetahui adanya bakteri *Escherichia coli* pada sampel dengan menggunakan media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) (Sunarti, 2016). Komposisi media ini terdiri dari kalium hidrogen fosfat, laktosa, *methylene blue*, eosin Y, serta agar dengan pH  $6,8 \pm 0,2$  pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$ . Pertumbuhan bakteri



Isolat C memiliki karakteristik koloni berwarna merah muda menyala (Gambar 4.4c). Sedangkan isolat D memiliki karakteristik koloni berwarna merah muda (Gambar 4.4d). Isolat C dan isolat D diduga merupakan bakteri *Enterobacter aerogenes* dan *Klebsiella pneumoniae*. Hal tersebut sesuai dengan teori Jawetz (2009), yang menyatakan bahwa bakteri *Enterobacter aerogenes* dan *Klebsiella pneumoniae* memiliki kemampuan melakukan fermentasi laktosa yang tidak secepat bakteri *Escherichia coli* dengan hasil produksi asam lemah sehingga koloni yang tumbuh berwarna merah muda. Hasil yang telah didapat kemudian dilanjutkan dengan identifikasi menggunakan teknik pewarnaan gram dan uji biokimia (IMVIC).

#### **4.3 Isolasi bakteri non fermentasi laktosa**

Untuk bakteri koliform yang tidak mampu memfermentasi laktosa, seperti bakteri *Salmonella* dan *Shigella* akan dilakukan uji *Salmonella-Shigella*. Media yang digunakan dalam uji ini adalah media *Salmonella Shigella Agar* (SSA). Media SSA adalah media selektif yang mampu mendeteksi keberadaan bakteri *Salmonella* dan *Shigella* yang tumbuh dan berkembang biak pada suatu sampel. Media ini mengandung garam empedu, brilliant green, dan tiosulphate yang berfungsi untuk menghambat bakteri gram positif dan bakteri koliform lainnya. Media SSA juga mengandung pepton yang berfungsi sebagai nutrisi pertumbuhan bakteri (Splittstoesser & Vanderzant, 1992). Kandungan sodium tiosulphate dalam media ini akan bereaksi dengan enzim tiosulphate reduktase yang dihasilkan oleh bakteri dari genus *Salmonella* sehingga terbentuk endapan atau bintik berwarna hitam











*Proteus mirabilis* tersebut sesuai dengan teori pada buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Brenner *et al.*, 1925), yang menjelaskan bahwa bakteri *Proteus mirabilis* bersifat gram negatif dan berbentuk basil. Bakteri ini menunjukkan hasil negatif pada uji indol. Sedangkan pada uji *methyl-red*, uji voges proskauer, dan uji citrate menunjukkan hasil positif.

Isolat B teridentifikasi sebagai bakteri *Escherichia coli*. Pada media EMBA, bakteri ini tumbuh dengan koloni berwarna hijau metalik. Hal ini sesuai dengan teori Holt *et al.* (1994), yang menyatakan bahwa koloni *Escherichia coli* yang tumbuh pada media EMBA akan berwarna hijau metalik. Menurut Matuwo (2012), warna hijau metalik yang dimunculkan oleh koloni *Escherichia coli* disebabkan oleh kemampuan fermentasi laktosa dan *methylene blue* yang dimiliki oleh bakteri ini. Bakteri *E.coli* tampak berbentuk batang pendek (coccobasil) dan berwarna merah yang menandakan bakteri ini bersifat gram negatif. Bakteri *Escherichia coli* dinyatakan positif pada uji MR dan indol, sedangkan pada uji citrate dan VP dinyatakan negatif. Karakteristik isolat bakteri *Escherichia coli* tersebut sesuai dengan teori pada buku *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria* (Barrow & Feltham, 1993), yang menjelaskan bahwa bakteri *Escherichia coli* memiliki karakteristik gram negatif, berbentuk batang pendek, MR positif, indol positif, citrate negatif, dan VP negatif. Pada penelitian yang dilakukan Khotimah (2016), isolat bakteri *Echerichia coli* dinyatakan positif pada uji indol dan uji MR, serta menunjukkan hasil negatif pada uji VP dan uji citrate.

Isolat C teridentifikasi sebagai bakteri *Enterobacter aerogenes*. Saat ditumbuhkan di media EMBA, koloni bakteri ini berwarna merah muda. Menurut Jawetz (2009), kemampuan fermentasi laktosa yang dimiliki oleh bakteri *Enterobacter aerogenes* tidak terlalu cepat dengan hasil produksi asam lemah, sehingga koloni yang tumbuh berwarna merah muda. Pada pengamatan mikroskopis, bakteri ini menunjukkan sifat gram negatif dan berbentuk basil. Sedangkan pada uji biokimia, bakteri ini menunjukkan hasil positif pada uji methyl red dan uji citrate, sedangkan pada uji voges proskauer dan uji indol dinyatakan negatif. Karakteristik isolat bakteri *Enterobacter aerogenes* tersebut sesuai dengan teori pada buku *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria* (Barrow & Feltham, 1993), yang menyatakan bahwa bakteri *Enterobacter aerogenes* memiliki karakteristik MR positif, citrate positive, VP negatif, dan indol negatif. Bakteri ini berbentuk basil dan bersifat gram negatif.

Isolat D teridentifikasi sebagai bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Koloni bakteri ini yang tumbuh pada media EMBA berwarna merah muda. Seperti bakteri *Enterobacter aerogenes*, bakteri ini memiliki kemampuan fermentasi laktosa yang tidak secepat bakteri *E. coli* dengan hasil produksi asam lemah, sehingga memunculkan koloni berwarna merah muda (Jawetz, 2009). Bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang telah diuji menunjukkan hasil positif pada uji *methyl-red*, uji voges proskauer, dan uji citrate. Sedangkan pada uji indol menunjukkan hasil negatif karena tidak terbentuk cincin berwarna merah pada bagian atas media. Karakteristik isolat bakteri *Klebsiella pneumoniae* tersebut sesuai dengan teori pada buku *Cowan and Steel's Manual for the*

*Identification of Medical Bacteria* (Barrow & Feltham, 1993), yang menyatakan bahwa bakteri ini memiliki karakteristik MR positif, VP positif, citrate positif, dan indol negatif. Hasil yang didapat juga sesuai dengan penelitian Ajayasree *et al.* (2018), dimana bakteri *Klebsiella pneumoniae* dinyatakan negatif pada uji indol yang menandakan bahwa bakteri ini tidak dapat menghasilkan indol. Bakteri ini dinyatakan positif pada uji *methyl-red*, uji voges proskauer, dan uji citrate. Berdasarkan teori yang dinyatakan oleh Gaurav *et al.* (2013), *Klebsiella pneumoniae* memiliki kemampuan untuk memfermentasikan laktosa dan karbohidrat dengan hasil akhir berupa asam dan gas. Bakteri ini tidak mampu menghasilkan indol, tetapi mampu menghasilkan asetoin dan dapat menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon.

Isolat E teridentifikasi sebagai bakteri *Shigella sp.* Koloni bakteri ini yang ditumbuhkan pada media SSA berwarna putih transparan dengan permukaan yang halus. Sesuai dengan teori Zaraswati (2006), yang menyatakan bahwa koloni bakteri *Shigella sp.* yang tumbuh pada media SSA memiliki permukaan halus serta tidak berwarna atau putih transparan. *Shigella sp.* berbentuk basil dan menunjukkan warna merah saat pengamatan mikroskopik, menandakan bahwa bakteri ini bersifat gram negatif. Bakteri *Shigella sp.* dinyatakan positif pada uji indol dan uji *methyl-red*. Sedangkan untuk uji voges proskauer dan uji citrate dinyatakan negatif. Karakteristik isolat bakteri *Shigella sp.* yang didapatkan sesuai dengan teori pada buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Brenner *et al.*, 1925), yang menjelaskan bahwa bakteri genus *Shigella* memiliki karakteristik hasil positif

pada uji indol dan *methyl red* serta menunjukkan hasil negatif pada uji voges proskauer dan uji citrate. Hasil yang didapat juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Gaurav *et al.* (2013), yang menyatakan bahwa isolat yang diduga bakteri *Shigella sp.* menunjukkan hasil positif pada uji indol dengan terbentuknya cincin berwarna pada media. Pada uji *methyl-red* juga dinyatakan positif karena menunjukkan perubahan warna media menjadi berwarna merah. Sedangkan pada uji voges proskauer dinyatakan negatif karena warna media tidak berubah menjadi warna merah muda atau merah.

Isolat F teridentifikasi sebagai bakteri *Salmonella sp.* Koloni bakteri ini tumbuh berwarna merah dengan bintik kehitaman pada media SSA. Menurut Zaraswati (2006), bakteri *Salmonella sp.* yang tumbuh pada media SSA akan berwarna merah atau hitam. Beberapa koloni *Salmonella sp.* dapat memunculkan bulatan berwarna hitam di tengah koloni sebagai hasil dari produksi gas H<sub>2</sub>S. Menurut Cappucino & Sherman (1983), produksi gas H<sub>2</sub>S berasal dari kandungan sodium thiosulphate dalam media SSA yang dirombak oleh bakteri dengan menggunakan enzim reduktif tiosulfat reduktase. Kemudian gas H<sub>2</sub>S akan bereaksi dengan ion ferric atau ferric citrate membentuk endapan hitam ferrous sulfida yang tampak seperti bintik hitam pada koloni. Pada uji biokimia yang telah dilakukan, isolat bakteri *Salmonella sp.* menunjukkan hasil positif pada uji methyl red dan uji citrate, serta menunjukkan hasil negatif pada uji voges proskauer dan uji indol. Karakteristik bakteri *Salmonella sp.* yang didapatkan sesuai dengan teori pada buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Brenner *et al.*, 1925), yang menyatakan bahwa bakteri genus *Salmonella* memiliki karakteristik

indol negatif, VP negatif, dan citrate positif. Hasil yang didapat juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan Muhammed & Alan (2016), bakteri *Salmonella sp.* menunjukkan hasil negatif pada uji voges proskauer dan uji indol, yang menandakan bahwa bakteri tersebut tidak mampu menghasilkan indol dan asetoin. Menurut Reddy *et al.* (2009), bakteri *Salmonella sp.* tidak mampu memfermentasikan laktosa, sukrosa atau salicin tetapi mampu memfermentasikan glukosa yang dapat memproduksi gas dan asam. Sumber nutrisi dari bakteri ini adalah sitrat yang digunakan sebagai satu-satunya sumber karbon. Bakteri ini tidak mampu menghasilkan indol dan asetoin.

Pada penelitian ini didapatkan 6 isolat bakteri yang teridentifikasi, yaitu *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Shigella sp.*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella sp.*, dan *Klebsiella pneumoniae*. Hal tersebut sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa terdapat berbagai jenis koliform yang ditemukan dalam es batu. Pada penelitian yang dilakukan oleh Nichols *et al.* (2000), menyatakan bahwa beberapa sampel positif terkontaminasi bakteri koliform dan *Escherichia coli*. Sedangkan pada penelitian yang dilakukan Murphy & Mephram (1988), mengungkapkan bahwa es batu yang diuji terkontaminasi oleh bakteri *Citrobacter*, *Enterobacter*, dan *Klebsiella*. Pada penelitian yang dilakukan oleh Falcao *et al.* (2002), sebanyak 60 sampel yang diambil dari 6 lokasi berbeda dinyatakan terkontaminasi oleh 50 strain bakteri *Escherichia coli*. Keenam bakteri yang ditemukan pada sampel es batu tersebut berbahaya dan dapat mengakibatkan penyakit pada tubuh manusia. Bakteri *Escherichia coli* dapat menyebabkan penyakit diare. Diare adalah penyakit infeksi pada saluran pencernaan akibat adanya bakteri *Escherichia*











- Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. 1925. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Second Edition Volume Two Part B The Gammaproteobacteria. Michigan State University, USA.
- Brooks, G.F., Butel, J.S., Morse, S.A., 2004. *Jawetz, Melnick, & Adelberg Mikrobiologi Kedokteran*. 23rd ed. McGraw-Hill Companies Inc., New York.
- Brooks, G. F. et al. 2013. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*, 26th Edition. *Journal of Chemical Information and Modeling*.
- Candi, S., 2018. *Dipenuhi Sampah, Mangrove Wonorejo Terancam Jadi "TPA"*. Diakses pada tanggal 4 April 2019 pada pukul 12.04 WIB. <http://m.detik.com>.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2010. *Persyaratan Kualitas Air Minum PerMenkes RI No.492/MENKES/PER/IV/2010*. DEPKES Ris. Jakarta.
- Edwin, G.W.P. 2019. Pola Resistensi Cephalosporin Generasi III dan Meropenem pada Bakteri *Klebsiella Pneumonia* di Laboratorium Kesehatan Daerah Lampung Tahun 2017. *Skripsi*. Universitas Lampung, Bandar Lampung.
- Elfidasari, D., Noriko, N., Mirasaraswati, A., Feroza, A., Canadianti, S.F., 2013. Deteksi Bakteri *Klebsiella pneumonia* pada Beberapa Jenis Rokok Konsumsi Masyarakat. *J. AL-AZHAR Indones. SERI SAINS DAN Teknol.* 2, 41–47.
- Engelkirk, P.G., Burton, G.R.W. *Burton's Microbiology for the Health Sciences* 8th Edition. Philadelphia.
- Entjang, I. 2003. *Mikrobiologi dan Parasitologi untuk Akademi Keperawatan dan Sekolah Tenaga Kesehatan yang Sederajat*. Citra Adtya Bakti, Bandung.
- Fajriaty, N.R., 2016. Perbedaan Jumlah Keberadaan Bakteri *Escherichia coli* pada Es Batu yang Berbahan Baku Air PDAM dan Non PDAM pada Penjual Minuman Disekitar Stadion Manahan Surakarta. *Naskah Publikasi*. Universitas Muhammadiyah, Surakarta.
- Falcao, J.P., Dias, A.M.G., Correa, E.F., Falcao, D.P. 2002. Microbiological Quality of Ice Used to Refrigerate Foods. *Food Microbiology*. 19: 269-276.
- Fardiaz, S. 1993. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. Raja Grafindo Perkasa, Jakarta.
- Food and Environmental Hygiene Department. 2005. *The Microbiological Quality of Edible Ice from Ice Manufacturing Plants and Retail Businesses in Hongkong*. The Government of the Hongkong Special Administrative, Queensway.

- Gaurav, A., Singh, S.P., Gill, J.P.S., Kumar, R., Kumar, D. 2013. Isolation and Identification of *Shigella spp.* from Human Fecal Samples Collected from Pantnagar, India. *Vetworld*. 376-379.
- Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T.G. 2004. *Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition. Springer.
- Handini, S. 2009. Tingkat Pengetahuan Siswa Madrasah Tsanawiyah (MTs) Al-Sa'adah Pondok Jaya terhadap Demam Tifoid Tahun 2009. *Skripsi*. UIN Syarif Hidayatullah, Jakarta.
- Hadi, B., Bahar, E., Semiarti, R. 2014. Uji Bakteriologis Es Batu Rumah Tangga yang Digunakan Penjual Minuman di Pasar Lubuk Buaya Kota Padang. *J. Kesehat. Andalas* 3, 119-122.
- Hemraj, V., Diksha, S., Avneet, G. 2013. A Review On Commonly Used Biochemical Test For Bacteria. *Innovare Journal of Life Science* 1(1): 1-7.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., William, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative BACTERIOLOGY*. Lippicoli William and Wilkins, New York.
- Irawati, A., Tjukarni, Santi, D. 1988. Penelitian Pemberian Tambahan Pengetahuan Gizi dan Kesehatan Pada Murid Sekolah Dasar. *Penelitian Gizi dan Makanan* Jilid 21. Depkes, Bogor.
- Izani, N.N.J., Zulaikha, A.R., Noorr, M.M.R., Amri, M.A., Mahat, N.A. 2012. Contamination of Faecal *Coliform* in Ice Cubes Sampled From Food Outlets in Kubang Kerian, Kelantan. *Tropical Biomedicine* 29(1): 71-76.
- Izzudin, M., Risyanto. 2014. Pengaruh Sosial Ekonomi Penghuni terhadap Permukiman Kumuh di Kecamatan Wonokromo Kota Surabaya. *Jurnal Bumi Indonesia*, 1-8.
- Jawetz, E.J., Melnick, Adelberg, 2006. *Mikrobiologi Kedokteran*. EGC, Jakarta.
- Jawetz, E., G. E. Melnick., & C. A. Adelberg. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi 23. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A., Brooks, G.F., Butel, J.S., Ornston, L.N. 2013. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi 25. EGC. Jakarta.
- Kemenkes RI. 2010. *Pneumonia Balita Jendela Epidemiologi* Volume 3. Kemenkes RI, Jakarta.
- Kemenkes RI. 2011. *Profil data kesehatan Indonesia tahun 2011*. Kemenkes RI, Jakarta.

- Kemenkes RI. 2015. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2015*. Kemenkes RI, Jakarta.
- Khotimah, L., 2016. Analisis Cemaran Bakteri *Coliform* dan Identifikasi *Escherichia coli* pada Es Batu Kristal dan Es Balok di Kelurahan Cibubur Jakarta Timur Tahun 2016. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah, Jakarta.
- Kodari, A.K., 2013. Deteksi Bakteri Patogen Dalam Es Balok Yang Dijual di Depot Es Balok di Pasar Tradisional Bandar Lampung. *Skripsi*. Universitas Lampung, Bandar Lampung.
- Kunkel, D. 2004. *Shigella dysenteriae*. Diakses pada tanggal 26 Juni 2019 pada pukul 12.14 WIB. <http://www.ciriscience.org/thumbimage.php?id=57>.
- Kurniasih, D. 2014. Efektivitas Ekstrak Lidah Buaya (Aloe Vera) Sebagai Antibakteri Pada Pertumbuhan *Shigella dysenteriae* Secara In Vitro. *Skripsi*. Fakultas Keguruan Dan Ilmu Pendidikan, Universitas Pasundan. Bandung.
- Kusnaedi. 2010. *Mengolah Air Kotor untuk Air Minum*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Kusuma, E.A., Rasyid, R., Endrinaldi, 2016. Identifikasi Bakteri *Coliform* pada Air Kobokan di Rumah Makan Kelurahan Andalas Kecamatan Padang Timur. *J. Kesehat. Andalas* 4, 845–849.
- Kuswiyanto, 2015. *Bakteriologi 1*. EGC, Jakarta.
- Lightfoot, D. 2003. *Shigella Chapter 17: Foodborne Microorganism of Public Health Significance* Edisi Ke-6. Australian Institute of Food Science and Technology, Sydney.
- Lubis, P.A.H., 2015. Identifikasi Bakteri *Escherichia coli* serta *Salmonella sp.* yang Diisolasi Dari Soto Ayam. *Skripsi*. UIN Syarif Hidayatullah, Jakarta.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, D.P., 2009. *Brock Biology of Microorganisms*, 12th Edition. ed. Pearson Benjamin-Cummings, San Francisco.
- Mahat, N.A., Ahmad, M., Wahab, A. 2015. Presence of Faecal *Coliform* and Selected Heavy Metals in Ice Cubes From Food Outlets in Taman Universiti, Johor Bahru, Malaysia. *Tropical Biomedicine*, 32(2): 471-477.
- Mako, S.L., Harrison, M.A., Sharma, V., Kong, F. 2014. Microbiological Quality of Packaged Ice from Various Sources in Georgia. *Journal of Food Protection*. 27(9): 1546-1553.
- Murphy, F.J., Mephram, P. 1988. Microbial Quality of Ice Cube: A Survey. *British Food Journal*. 90(3): 120-122.

- Natalia, L.A. 2014. Kajian Kualitas Bakteriologis Air Minum Isi Ulang di Kabupaten Blora Melalui Metode *Most Probable Number*. *Skripsi*. Universitas Negeri Semarang, Semarang.
- Nichols, G., Gillespie, I., Louvois, J.D. 2000. The Microbiological Quality of Ice Used to Cool Drinks and Ready-to-Eat Food From Retail and Catering Premises in the United Kingdom. *Journal of Food Protection*. 63(1): 78-82.
- Ninyoman, K. 2013. *Mengenal Penyakit Pneumonia (ISPA)*. Diakses pada tanggal 12 April 2019 pada pukul 15.44 WIB. <http://www.diskes.baliprov.go.id/id/MENGENAL-PENYAKIT-PENUMONIA--ISPA->.
- Noviyanti, L. 2017. Profil Resistensi *Enterobacter spp.* Asal Ayam Broiler di Kabupaten Bogor terhadap Antibiotik. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Nygren Bl, Schilling KA, Blanton EM, Silk BJ, Cole DJ, Mintz ED. 2012. Foodborne Outbreaks Of Shigellosis. *Epidemiology And Infection. The USA* 141(2): 233–241.
- Patel, S.S., Chauhan, H.C., Patel, A.C., Shrimali, M.D., Patel, K.B., Prajapati, B.I., Kala, J.K., Patel, M.G., Rajgor, M., Patel, M.A. 2017. Isolation and Identification of *Klebsiella pneumoniae* from Sheep-case Report. *Int. J. Curr. Microbial. App. Sci* 6(5): 331-334.
- Pelczar, M.J., Chan, E.C.S. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi* Volume 2. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Pelczar, M.J., Chan, E.C.S. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Pelczar, M.J., Reid, R.D. 1958. *Microbiology*, Second Edition. ed. McGraw Hill Company Inc, New York.
- Prayekti, E. 2017. Analisis Mikrobiologi Jajanan Minuman di Sekitar Sekolah Dasar pada Wilayah Jemurwonosari, Surabaya. *Jurnal SainHealth* 1(2): 92-96.
- Priyono, T.S.C., Yuliani, E., Sayekti, R.W. 2013. Studi Penentuan Status Mutu Air di Sungai Surabaya Untuk Keperluan Bahan Baku Air Minum. *Jurnal Teknik Pengairan* 4, 53-60.
- Puspitasari, I., Indriyanti, N., Yulita, V., Rusli, R., 2015. Pengujian Kualitas Aspek Mikrobiologi Air Minum Isi Ulang. *Pros. Semin. Nas. Kefarmasian Ke-1* 1–10.

- Putri, N.D. 2015. Identifikasi Bakteri *Escherichia coli* pada Es Batu yang Dijual Warung Nasi di Kelurahan Pisangan Tahun 2015. *Skripsi*. UIN Syarif Hidayatullah, Jakarta.
- Rahayu, S.A., Gumilar, M.H. 2017. Uji Cemaran Air Minum Masyarakat Sekitar Margahayu Raya Bandung dengan Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*. *IJPST* 4(2): 50-56.
- Rahayu, W.P., Wafiyah, Q., Nurjanah, S., Nurwitri, C.C., 2017. Tingkat Kepatuhan Pedagang Minuman Es terhadap Cara Produksi Pangan yang Baik di Kota Bogor. *Ind. J. Teknol. Dan Manaj. Agroindustri* 6, 145–151.
- Reddy, U., Arya, S., Jyothi, Rekha. 2009. Evaluation of Microbiological assays of Antibiotics. *Pharmacologyonline* 2: 697-706.
- Restuaty, A., 2016. Uji Kualitas Bakteri *Escherichia coli* pada Depot Air Minum Isi Ulang di Kecamatan Bandung Wetan. *Skripsi*. Universitas Pasundan, Bandung.
- Rifta, R., Budiyo, Darundiati, Y.H., 2016. Studi Identifikasi Keberadaan *Escherichia coli* pada Es Batu yang Digunakan Oleh Pedagang Warung Makan di Tembalang. *J. Kesehat. Masy.* 4, 176–185.
- Rohmah, N.S. 2017. Isolasi dan Identifikasi Bakteri yang Berpotensi Sebagai Agen Bioremediasi Timbal (Pb) dari Lumpur Lapindo. *Skripsi*. UIN Malualana Malik Ibrahim, Malang.
- Ruchiyat, A. 2007. Hubungan Antara Higiene Perorangan, Frekuensi Konsumsi dan Sumber Makanan Jajanan dengan Kejadian Diare. *Naskah Publikasi Skripsi*. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Saadah, F.P., 2017. Analisis Bakteri *Coliform* Dalam Es Batu Dari Berbagai Kantin Di Universitas Islam Negeri Raden Intan Lampung. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Raden Intan, Lampung.
- Sari, R. & Apridamayanti, P. 2014. Cemaran Bakteri *Escherichia coli* dalam Beberapa Makanan Laut yang Beredar di Pasar Tradisional Kota Pontianak. *KARTIKA JURNAL ILMIAH FARMASI*. 2(2): 14-19.
- Seputro, D. 2005. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. EGC, Jakarta.
- Setiawan, B., Fika, R., Trisna, M., Utami, R. 2018. Determination of *Coliform* Bacteria Contamination on Household Ice Cube in Bukittinggi. *International Journal of Green Pharmacy*. 12(2):
- Shrotriya, A. 2015. An Introduction To Shigellosis And Strategies Against Potent Drug. *International Journal Of Pharmacy & Life Sciences*. 6: 8-9.
- Soemarno. 2002. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Klinik Akademi Analisis Kesehatan Yogyakarta*. Departemen Kesehatan RI.

- Splittstoesser, D.F., Vanderzant, C. 1992. *Compendium of method for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association, Washington DC.
- Sumarni, Sayuti, I., Suryawati, E., 2017. Identification of *Coliform* Bacteria in the Ice Cubes and Ice Crystals Used Fruit Juice Seller and Stalls Around the University of Riau as the Potential Development of Teaching High School Biology Module. *J. Online Mhs.* 4, 1–15.
- Sunarko I. 2012. Disinfeksi bakteri *Escherichia coli* dengan menggunakan kavitas hidrodinamika. *Skripsi*. Fakultas Teknik Kimia, Depok.
- Sunarti, R.N. 2016. Uji Kualitas Air Minum Isi Ulang Disekitar Kampus UIN Raden Fatah Palembang. *Jurnal Bioilmi.* 2(1): 40-50.
- Tantri, B.U.N. 2016. Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*, *Shigella sp.*, dan *Salmonella sp.* pada Air Sumur di wilayah Pembuangan Limbah Tahu dan Limbah Ikan Kota Bandar Lampung. *Skripsi*. Universitas Lampung, Bandar Lampung.
- Todar. 2008. *Classification of Escherichia coli*. Diakses pada tanggal 26 Juni 2019 pada pukul 16.47 WIB. <http://textbookofbacteriology.net/e.coli.html>.
- Waluyo, L. (2004). *Mikrobiologi Umum*. Malang: UMM Press.
- Warren, B.P. 2015. *Enterobacter sp.* Diakses pada tanggal 26 Juni pada pukul 13.36 WIB. [http://genome.jgi-psf.org/ent\\_6.home.html](http://genome.jgi-psf.org/ent_6.home.html).
- Wati, L. 2017. Identifikasi Bakteri *Coliform* pada Es Batu yang Dicampur pada Makanan dan Minuman Oleh Penjual di Kelurahan Anduonohu Kota Kendari. *Karya Tulis Ilmiah*. Politeknik Kesehatan, Kendari.
- WHO/UNICEF Joint statement. 2004. *Clinical management of acute diarrhea*. Diakses pada tanggal 28 Juni 2019 pada pukul 09.28 WIB. <http://www.who.int/>.
- WHO. 2006. *Pneumonia: The Forgotten Killer of Children*. New York.
- Wicaksono, A.R. 2016. Identifikasi Bakteri *Escherichia coli* dan *Shigella sp.* terhadap Jajanan Cilok pada Lingkungan SD Negeri di Cirenden, Pisangan, dan Cempaka Putih. *Skripsi*. UIN Syarif Hidayatullah, Jakarta.
- Widiyanti, N.L.P.M., Ristiati, N.P., 2004. Analisis Kualitatif Bakteri Koliform pada Depo Air Minum Isi Ulang di Kota Singaraja Bali. *J. Ekol. Kesehat.* 3, 64–73.
- Widyaningsih, W., Supriharyono, Widyorini, N., 2016. Analisis Total Bakteri Coliform di Perairan Muara Kali Wisu Jepara. *Diponegoro J. Maquares* 5, 157–164.

