**BAB IV**

**METODE PENELITIAN**

1. **Jenis dan Desain Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian Deskriptif, desain penelitian yang digunakan adalah Observasional, yaitu menggali data tentang Keamanan Pangan (total cemaran mikroba, *Escherichia coli* dan kandungan (siklamat) minuman es dawet kaki lima di wilayah Kota Malang.

1. **Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan April – Mei 2017

1. **Uji Mikrobiologi**

Analsisis total cemaran mikroba dengan metode(TPC), pada minuman es dawet dilakukan di Laboratorium Biomedik Universitas Muhammdiyah Malang.

1. **Uji *Escherichia Coli***

Analisis kandungan*Escherichia coli* dengan metode MPN pada minuman es dawet dilakukan di Laboratorium Biomedik Universitas Muhammdiyah Malang.

1. **Uji Kimia**

Pengujiuan kandungan pemanis makanan berupa siklamat pada minuman es dawet secara kualitatif dengan metode pengendapan dan kuantitatif dengan metode spektofotometri dilakukan di Laboratorium Akafarma Putra Indonesia Malang.

1. **Alat dan Bahan**
2. **Alat dan Bahan Uji Total Cemaran Mikroba secara Kuantitatif**
3. **Alat:**
* Pinset steril - Rak Tabung Reaksi
* Erlenmeyer steril - Beaker Glass
* Termos/cooling box - Panci
* Cawan Petri - Pipet Volume 1ml
* Erlenmeyer - Mortar
* Tabung Reaksi - Autoklaf
* Timbangan Tripel Beam - Pembakar Bunsen

1. **Bahan:**
* Sampel (es dawet)
* Plate Count Agar (PCA)
* Aquades, Alcohol
1. **Alat dan Bahan Uji *Escherichia coli***
2. **Alat dan Bahan Uji *Escherichia coli***
3. **Alat:**
* 5 tabung reaksi berisi tabung durham dan 10 ml Lactosa Broth Ganda (LBG)
* 10 tabung reaksi berisi tabung durham dan 5 ml Lactose Broth Tunggal (LBT)
* Tabung Bile Green Lactose Broth (BGLB)
* Pipet 10 ml steril
* Pipet 1 ml steril
* Pembakar spirtus
* Incubator 35 °C dan 44,5 °C
* Cawan petri
* Tabung medium Na miring
* Gelas objek
* Jarum ose
1. **Bahan:**
* Media BGLB - Media *Lactose Broth Ganda dan Tunggal*
* Media EMB - Sampel (es dawet)
* Reagen pengecatan gram - Reagen pengecatan spora
1. **Alat Dan Bahan Uji Siklamat**
2. **Alat**
* Pipet Ukur - Labu Ukur
* Pengaduk kaca - Neraca Analitik
* Rak Tabung - Mikropipet
* Gelas Piala/Gelas Beker - Spektofotometer
* Gelas ukur - Kuvet
1. **Bahan**
* Sampel es dawet
* Larutan Bacl₂ 10%
* Larutan NaNO₂ 10%
* HCL 10%
* Aquades
1. **Populasi Sampel**
2. **Populasi**

Populasi dalam penelitian ini adalah minuman es dawet pedagang kaki lima berdasarkan nama dagang di tiga Kecamatan Kota Malang dengan ciri yang sama yaitu pedangang yang berada dipinggir jalan dan menggunakan es batu berupa es balok.

1. **Sampel**

Dari berbagai macam tempat penjualan es dawet, sampel yang diambil merupakan sampel yang berasal dari nama jenis dagang yang berbeda, dengan ciri yang sama yaitu sama-sama diambil di pinggir jalan dan menggunakan es batu yang berupa es balok. Menurut Notoadmodjo (2010) sampel adalah sebagian yang diambil dari keseluruhan objek yang diteliti dan dianggap mewakili seluruh populasi.

1. **Teknik Sampling**

Sampel penelitian yang diambil oleh peneliti sebanyak 5 sampel Teknik Simple Random Sampling adalah subyek memiliki peluang yang sama untuk terpilih sebagai subyek penelitian (Swarjana,I K, 2015). Kristik pengambilan sampel :

1. Memiliki nama jual dan dijual di pinggir jalan, yang mana merupakan sumber kontaminasi pada produk yang dijual.
2. Menggunakan es batu berupa es balok.
3. Minuman olahan yang dicurigai higiene dan sanitasinya rendah pada saat proses pengolahan.
4. **Variabel Penelitian**
5. **Variabel bebas**

Variabel bebas dalam penelitian adalan minuman es dawet pedagang kaki lima berdasarkan nama dagang di tiga Kecamatan Kota Malang .

1. **Variabel Terikat**

Variabel Terikat dalam penelitian ini adalah total cemaran mikroba, *Escherichia coli* dan bahan tambahan makanan (siklamat).

1. **Definisi Operasional**

Tabel 3 Definisi operasional

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Variable  | Definisi Operasional  | Cara Ukur  | Hasil Ukur | Skala Ukur |
| Total Cemaran Mikroba | Jumlah total koloni mikroba pada minuman es dawet. | Uji Kuantitatif total cemaran mikroba dengan metode TPC | Aman jika total cemaran mikroba yang terdapat dalam minuman es dawet tidak melebihi batas yang ditentukan oleh BPOM yaitu 1 x 104 koloni/gram | Rasio  |
| Cemaran *Escherichia coli* | Jumlah APM *Eserchia coli* dalam minuman es dawet | Uji Kualitatif cemaran *Escherichia coli* dengan metode MPN  | Aman jika tidak mengandung *Escherichia coli*  dalam minuman es dawet  | Ordinal  |
| Kandungan Siklamat  | Kandungan bahan tambahan pagan (siklamat) pada munuman es dawet. | Uji kualitatif kandungan siklamat dengan metode pengendapan  | Terdeteksi apabila terdapat endapan putih pada sampel es dawet | Ordinal  |
| Kandungan Siklamat  | Kandungan bahan tambahan pagan (siklamat) pada munuman es dawet.  | Uji kuantitatif siklamat dengan metode spektrofotometri | Aman jika kandungan siklamat yang terdapat dalam minuman es dawet tidak melebihi batas yang ditentukan oleh BPOM yaitu : 250 mg/kg.  | Rasio  |

1. **Metode Penelitian**
2. **Pengambilan Sampel**
3. Sampel penelitaian yaitu minuman es dawet yang dijual berdasarkan nama jual, menggunakan es batu berupa es balok dan letak penjualan yaitu dipinggir jalan dari tiga Kecamatan di Kota Malang.
4. Sampel minuman es dawet dibeli dengan cara dibungkus dengan menggunakan plastic lalu dimasukan dalam *cooling box* yang berisi es batu*.*
5. **Uji Total Cemaran Mikroba Secara Kuantitatif**

 Data megenai cemaran mikroba minuman es dawet didapat dengan cara menggunakan metode hitung cawan di Laboratorium Biomedik Universitas Muhamadyah Malang. Pada uji total cemaran mikroba pada minuman es dawet, sampel diambil secara keseluruhan yaitu dengan cara menumbuk sampel es dawet pada mortal. Es dawet yang sudah tercampur diambil sebagai sampel. Dengan prosedur kerja sebagai berikut:

Masukkan 1 ml bahan cair (minuman es dawet yang sudah ditumbuk) secara aseptic ke dalam aquadest 9 ml untuk pengenceran 10-1

Pindahkan 1 ml suspensi dari pengenceran 10-1 kedalam larutan 9 ml untuk mendapatkan pengenceran 10-2 (lakukan secara aseptic) lalu aduk hingga homogeny

Buat pengenceran 10-3, dan 10-4 dengan cara yang sama sesuai kebutuhan

Masukkan sebanyak 1 ml suspense dari pengenceran 10-2, 10-3 dan 10-4 ke dalam cawan petri secara duplo

Tambahkan 15 ml PCA yang sudah didinginkan hingga temprature 50°C pada masing-masing cawan yang sudah berisi suspensi

Aduk hingga homogeny (membentuk angka delapan) lalu diamkan sampai menjadi padat

Inkubasikan pada suhu 36°C selama 24 jam dengan meletakkan pada posisi terbalik

Menghitung mikroorganisme menggunakan alat colony counter sesuai dengan SPC.

Gambar 1 Diagram alir uji total cemaran mikroba dengan menggunakan metode hitung cawan (Fardiaz, 1992).

1. **Uji Kandungan *Escherichia coli***

Data megenai *Eschericia coli* minuman es dawet didapat dengan cara menggunakan metode MPN di Laboratorium Biomedik Universitas Muhamadyah Malang. Uji kandungan *Eschericia coli* pada minuman es dawet diambil secara keseluruhan yaitu dengan cara menumbuk sampel es dawet pada mortal. Es dawet yang sudah tercampur diambil sebagai sampel. Dengan prosedur kerja sebagai berikut:

**Uji Penduga**

Inokulasi 10 ml sampel (es dawet) ke dalam 5 tabung medium LBG (seri 1)

Inokulasi 1 ml sampel (es dawet) ke dalam 5 tabung medium LBT (seri 2)

Inokulasi 0,1 ml sampel (es dawet) ke dalam 5 tabung medium LBT (seri 3)

Inkubasikan semua tabung pada suhu 35°C

Setelah 24 jam, apabila terbentuk asam dan gas, maka reaksinya positif

Tabung-tabung yang tidak menunjukkan adanya gas diinkubasikan kembali. Catat hasl pengamatan

**Uji penguat: Tahap 1 dan 2**

Inokulasikan satu ose biakan dari setiap tabung uji penduga yang positif, masimg-masing ke dalam dua tabung medium BGLB.

Inkubasikan satu seri BGLB yang telah diinokulasikan pada suhu 35°C dan satu seri lainpada suhu 44,5°C.

Amati terbentuknya asam dan gas setelag 24-48 jam . Bila perlu waktu inkubasi diperpanjang lagi.

Catat hasil pengamatan

Cairakan endo agar, tuang ke dalam cawan petri steril, biarkan sampai mengeras

Ambil 1 ose biakan tabung BGLB yang menunjukkan reaksi positif. Inkubasikan ke dalam medium Endo Agar dengan menggesekan di atas permukaan (streak method)

Setelah 24-48 jam, amati adanya koloni bakrteri yang bewarna hijau metalik.

**Uji Pelengkap:**

Koloni-koloni yang bewarna hijau metalik diinokulasikan dalam medium Lactosa Broth dan medium Na miring

Lakukan pengecatatn gram dan pengecatan spora dari biakan yang ditumbuhkan paad Na miring, setelah umur biakan 24 jam.

Amati adanya asam dan gas dalam tabung Lactos Broth yang diinokulasikan dari koloni yang bewarna hijau metalik

Jika timbul asam dan gas, morfologi bakteri berbentuk batang, hasil penegcatan gram negative, dan tidak membentuk spora, maka bakteri yang diisolasi dari biakan bewarna hijau metalik adalah *E. coli*

Gambar 2 Diagram alir uji kandungan *Escherichia coli* dengan metode MPN (Fardiaz, 1992).

1. **Uji Bahan Tambahan Pangan Siklamat Secara Kulitatif dan Kuantitatif**

Uji bahan tambahan makanan dilakukan dengan uji kualitatif dengan metode pengendapan untuk mengetahui ada atau tidak nya kandungan siklamat, apabila terdapat siklamat dilanjutkan dengan uji kuantitatif dengan metode spektofotometri di Laboratorium Akafarma Putra Indonesia Malang. Pada uji kandungan siklamat yang diambil sebagai sampel hayalah air dari minuman es dawet. Dengan prosedur kerja sebagai berikut:

Diagram Alir Uji Kualitatif Siklamat dengan Metode Pengendapan:

Dipipet masing-masing sampel (es dawet) sebanyak 10 ml pada beaker glass

Dituangkan pada tabung reaksi

Ditambahkan 1 ml larutan HCl 10%

Ditambahkan 1  ml Larutan BaCl2 10%.

Ditambahkan1 ml Larutan NaNO210%.

Dihomogenkan menggunakan pengaduk kaca

 Didiamkan selama 24 jam

Diamati perubahan yang terjadi, apabila didapatkan endapan putih berarti sampel mengandung siklamat.

.

Gambar 3 Diagram alir uji kualitatif siklamat dengan metode pengendapan (Rohman, A dalam Falah, 2015).

Diagram Alir Uji Kuantitatif Siklamat dengan Metode Spektrofotometri:

Dipipet masing-masing sampel (es dawet) sebanyak 10 ml pada

Beaker glass

Dituangkan pada tabung reaksi

Ditambahkan 1 ml larutan HCl 10%.

Ditambahkan 1  ml Larutan BaCl2 10%.

Ditambahkan 1 ml Larutan NaNO210%.

Dihomogenkan menggunakan pengaduk kaca selama 24 jam.

Dipipet masing-masing sampel teh sebanyak 1800 µl pada kuvet

Dimasukkan satu persatu kuvet ke dalam spektrofotometer.

Dicatat hasil absorbansi.

Gambar 4 Diagram alir uji kuantitatif siklamat dengan metode spektrofotometri (Rohman, A dalam Falah, 2015).

1. **Metode Analisis**
2. **Metode Analisis Cemaran Mikroba dengan Metode TPC**

Dalam metode hitung Cawan, sampel memerlukan perlakuan pengenceran sebelum ditumbuhkan pada medium agar (PCA) di dalam cawan petri. Pengenceran biasanya dilakukan secara decimal yaitu 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000. Kemudian cara di lakukan dengan metode pemupukan dengan metode tuang (pour plate). Dalam metode tuang, sejumlah contoh 1 ml dari penegenceran yang dikehendaki dimasukkan ke dalam cawan petri kemudian ditambah agar (PCA) cair steril yang telah didiginkan 50°C sebanyak 15 ml dan diputar membentuk huruf angka delapan supaya menyebar rata. Setelah itu diinkubasi selama 24 jam. Jumlah koloni dalam contoh dapat dihitung sebagai berikut :

Koloni per ml jumlah koloni dalam cawan x 1

atau per gram faktor penegnceran

Menurut Fardiaz (1992) untuk melaporkan hasil analisis mikrobiologi dengan cara hitung cawan digunakan suatu standart yang disebut Standart Plate Count (SPC) sebagai berikut :

1. Cawan yang dipilih dan dihitung adalah yang mengandung jumlah koloni antara 30 dan 300
2. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan satu kumpulan koloni yang besar dimana jumlah koloninya diragukan dapat dihitung sebagai satu koloni
3. Satu deretan rantai koloni yang terlihat sebagai sauatu garis tebal dihitung sebagai satu koloni.

Dalam SPC ditentukan cara pelaporan dan perhitungan koloni sebagai berikut :

1. Hasil yang dilaporkan hanya terdiri dari dua angka yaitu angka pertama (satuan) dan angka kedua (desimal). Jika angka yang ketiga sama dengan atau lebih besar dari 5, harus dibulatkan satu angka lebih tinggi pada angka kedua. Sebagai contoh 1,7x103 unit koloni/ml atau 2.0 x 106 unit koloni/gr.
2. Jika pada semua pengenceran dihasilkan kurang dari 30 koloni pada cawan petri, berarti pengenceran yang dilakukan terlalu tinggi. Oleh Karena itu jumlah koloni pada pngenceran terendah yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai kurang dari 30 dikalikan dengan besarnya pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya dicantumkan didalam tanda kurung.
3. Jika pada semua pengenceran dihasilkan lebih dari 300 koloni pada cawan petri brarti pengenceran yang dilakukan terlalu rendah. Oleh karena itu, jumlah koloni pada pengenceran tertinggi yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai lebih dari 300 dikalikan dengan faktor pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan didalam tanda kurung.
4. Jika pada cawan dari dua tingkat pengenceran dihasilkan koloni dengan jumlah antara 30 dan 300, dan perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah dari kedua pengenceran tersebut lebih kecil atau sama dengan dua, dilaporkan rata-rata dari kedua nilai tersebut dengan memperhitungkan faktor pengenceranya. Jika perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah lebih besar dari 2 yang dilaporkan hanya hasil yang kecil.
5. Jika digunakan dua cawan petri (duplo) per pengenceran data yang diambil harus dari kedua cawan tersebut, tidak boleh diambil salah satu. Oleh karena itu, harus dipilih tingkat penegnceran yang mengahsilkan kedua cawan duplo dengan koloni diantara 30 dan 300.
6. **Metode Analisis Kandungan Bakteri *Escherichia coli* dengan Metode MPN**

Apabila terdapat warna hijau metalik pada media menandakan adanya bakteri *Escherichia coli* pada sampel es dawet. Data yang telah didapat dianalisis secara deskriptif.

1. **Metode Analisis Kandungan Siklamat dengan Metode** **Endapan**

Apabila terdapat endapan putih pada sampel menandakan adanya kandungan siklamat pada es dawet. Data yang telah didapat dianalisis secara deskriptif.

1. **Metode Analisis Kandungan Siklamat dengan Metode Spektrofotometri**

Apabila terdapat endapan putih pada sampel menandakan adanya kandungan siklamat pada es dawet lalu dilanjutkan pada uji kuantitatif siklamat dengan menggunakan metode spektrofotometri kemudian dianalisis secara deskriptif apakah bahan tambahan pangan pemanis siklamat yang digunakan ada atau tidak.

1. **Pengolahan, Penyajian, dan Analisis Data**
2. Total Cemaran Mikroba

Data total cemaran mikroba pada minuman es dawet dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel.

1. Kandungan *Escherichia coli* pada minuman es dawet dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel.
2. Kandungan Siklamat

Data kandungan siklamat pada minuman es dawet dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel apakah bahan tambahan pangan yang digunakan terdapat kandungan siklamat atau tidak.