

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Jenis Penelitian**

Jenis penelitian deskriptif merupakan penelitian yang bertujuan untuk mendeskripsikan atau memberikan gambaran terhadap obyek yang diteliti melalui data atau sampel yang telah terkumpul (Sukmadinata, 2006). Pada penelitian ini peneliti memberikan gambaran tentang obyek yang diteliti yaitu minuman sari tebu yang dijual oleh pedagang kaki lima di Kelurahan Sama'an, Kelurahan Sukoharjo dan Kelurahan Merjosari Kota Malang berdasarkan data yang diperoleh untuk dapat diambil kesimpulan secara umum. Desain penelitian yang digunakan yaitu observasional yaitu mengumpulkan data dengan cara melakukan pengamatan secara langsung terhadap obyek penelitian yaitu minuman sari tebu yang dijual oleh pedagang kaki lima di Kelurahan Sama'an, Kelurahan Sukoharjo dan Kelurahan Merjosari Kota Malang untuk melihat bagaimana proses pembuatan minuman sari tebu tersebut.

#### **3.2. Lokasi dan Waktu Pelaksanaan**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2019 s.d Januari 2020 dengan tempat penelitian :

1. Tempat penjualan minuman sari tebu di Kelurahan Sama'an, Kelurahan Sukoharjo dan Kelurahan Merjosari Kecamatan Lowokwaru Kota Malang untuk pengambilan sampel berupa minuman sari tebu
2. Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang untuk analisis total cemaran mikroba, Coliform dan *Escherichia coli*

#### **3.3. Bahan dan Alat**

##### **3.3.1 Bahan :**

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini yaitu media Plate Count Agar (PCA), aquades, aquades steril, NaCl fisiologis, Lactose Broth (LB), Brilliant Green Lactose Broth (BGLB), Eosin Methylene Blue (EMB) agar, Nutrien Agar (NA) miring, larutan pewarnaan gram ungu kristal karbol, safranin, alkohol 96%, lugol, minyak emersi, media

Sulfide Indole Motility (SIM), reagen kovacks, media cair Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP), media agar miring sitrat, alpha naftol, KOH 40%.

### **3.3.2 Alat :**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tabung reaksi, pipet volume, pipet tetes, cawan petri, tabung durham, beaker glass, mikropipet, botol sampel, pinset, pembakar bunsen, neraca analitik, kompor, inkubator, autoklaf, lemari pendingin, rak tabung reaksi, tissue, kapas, label, alkohol, laminar air flow, pipet ukur, gelas arloji, batang pengaduk, bola hisap, korek api, jarum inokulasi (ose) bulat, objek glass, mikroskop, rak pewarnaan, botol aquadest.

## **3.4. Sampel Penelitian**

### **3.4.1 Sampel**

Sampel dalam penelitian ini adalah minuman sari tebu yang dijual di Kelurahan Sama'an, Kelurahan Sukoharjo dan Kelurahan Merjosari di Kecamatan Lowokwaru Kota Malang

### **3.4.2 Teknik Sampling**

Teknik pengambilan sampel dilakukan dengan cara Accidental Sampling yang mana pengambilan sampel dilakukan secara kebetulan bertemu dengan jenis sampel yaitu minuman sari tebu yang dijual di Kelurahan Sama'an, Kelurahan Sukoharjo dan Kelurahan Merjosari di Kecamatan Lowokwaru Kota Malang.

## **3.5. Variabel Penelitian**

### **1. Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah higiene penjamah, sanitasi peralatan, lokasi penjualan

### **2. Variabel Terikat**

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah uji fisik dan uji mikrobiologi

### 3.6. Definisi Operasional Variabel

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Mutu fisik minuman sari tebu	Mutu fisik minuman sari tebu meliputi warna, bau dan rasa setelah dilakukan proses penggilingan batang tebu	Warna : Panca Indera Pengelihatatan Bau : Panca Indera Pembau Rasa : Panca Indera Pengecap	Dikatakan aman jika sesuai dengan indikator yang telah ditetapkan SNI 3719-2014 yaitu Warna : Hijau Bau : Khas/normal Rasa : Manis	Ordinal
2	Total mikroba pada minuman sari tebu	Cemaran mikroba dengan cara menghitung jumlah mikroorganism e yang terdapat pada minuman sari tebu	Uji total cemaran mikroba menggunakan metode angka lempeng total	Dikatakan aman jika total mikroba (maks $1 \times 10^4$ koloni/ml). Dikatakan tidak aman jika total mikroba melebihi $> 1 \times 10^4$ koloni/ml	Rasio
3	Adanya Escherichia Coli pada	Mengidentifikasi adanya Escherichia Coli pada	Isolasi dan identifikasi Escherichia Coli	Dikatakan aman jika tidak ditemukan Escherichia	Nominal

	minuman sari tebu	minuman sari tebu	menggunakan : 1) Uji MPN 2) Pewarnaan gram 3) Uji IMVIC	Coli pada minuman sari tebu Dikatakan tidak aman jika ditemukan Escherichia Coli pada minuman sari tebu	
4	Penilaian higiene dan sanitasi	Melakukan penilaian form higiene dan sanitasi minuman sari tebu	Penilaian higiene dan sanitasi pada pedagang minuman sari tebu dilakukan dengan menggunakan form penilaian higiene dan sanitasi.	Dikatakan aman jika bobot nilai higiene dan sanitasi pedagang minuman sari tebu sesuai dengan kriteria batas penilaian higiene dan sanitasi Dikatakan tidak aman jika bobot nilai higiene dan sanitasi pedagang minuman sari tebu tidak sesuai dengan kriteria batas	Nominal

				penilaian higiene dan sanitasi	
--	--	--	--	--------------------------------------	--

### 3.7. Metode Penelitian

1. Uji Mutu Fisik Minuman Sari Tebu  
Uji mutu fisik pada sampel minuman sari tebu menggunakan metode uji secara inderawi
2. Uji Angka Lempeng Total  
Uji angka lempeng total pada sampel minuman sari tebu menggunakan metode dengan teknik tuang cawan
3. Uji kualitatif Escherichia Coli  
Pada uji kualitatif Escherichia Coli meliputi Uji MPN, Pewarnaan Gram dan Uji IMVIC
  - a. Uji MPN  
Uji MPN pada sampel minuman sari tebu menggunakan metode uji pendugaan, uji penguat dan uji pelengkap
  - b. Pewarnaan gram  
Uji pewarnaan gram pada sampel minuman sari tebu menggunakan metode uji mikroskopis
  - c. Uji IMVIC  
Uji IMVIC pada sampel minuman sari tebu menggunakan metode uji produksi indol, uji VP, uji MR, uji sitrat

### 3.8. Metode Analisis

1. Cara Pengambilan Sampel  
Membeli sampel minuman sari tebu pada pedagang kaki lima di Kelurahan Sama'an, Kelurahan Sukoharjo dan Kelurahan Merjosari Kecamatan Lowokwaru Kota Malang menggunakan botol kaca yang telah disterilisasi sebelumnya. Sampel minuman sari tebu harus segera diproses, tidak boleh lebih dari 24 jam sejak saat pengambilan sampel. Kemudian sampel diberi label masing-masing.
2. Uji Mutu Fisik Minuman Sari Tebu

#### Warna

Warna sari tebu yang segar memiliki warna hijau sedangkan warna sari tebu yang tidak segar memiliki warna kuning.

#### Aroma

Aroma sari tebu yang segar sangat mudah dikenali sehingga jika terjadi perubahan aroma pada sari tebu maka sari tebu tersebut sudah tidak segar

#### Rasa

Rasa sari tebu yang segar yaitu manis dan segar bila dikonsumsi sedangkan rasa sari tebu yang tidak segar akan berasa asam.

### 3. Uji Angka Lempeng Total

Mengambil 1 ml sampel sari tebu dan dilarutkan dalam erlenmeyer yang berisi NaCl fisiologis sebanyak 45 ml untuk mendapatkan pengenceran  $10^{-1}$ . Lalu mengencerkan larutan dengan mengambil larutan pengenceran  $10^{-1}$  sebanyak 1 ml dan dimasukkan dalam tabung reaksi berisi NaCl fisiologis 9 ml untuk mendapatkan pengenceran  $10^{-2}$ . Mengambil larutan pengenceran  $10^{-2}$  sebanyak 1 ml dan dimasukkan dalam tabung reaksi berisi NaCl fisiologis 9 ml untuk mendapatkan pengenceran  $10^{-3}$ . Mengencerkan larutan kembali dengan mengambil larutan pengenceran  $10^{-3}$  sebanyak 1 ml dan dimasukkan dalam tabung reaksi berisi NaCl fisiologis 9 ml untuk mendapatkan pengenceran  $10^{-4}$ . Kemudian mengencerkan kembali larutan dengan mengambil larutan pengenceran  $10^{-4}$  sebanyak 1 ml dan dimasukkan dalam tabung reaksi berisi NaCl fisiologis 9 ml untuk mendapatkan pengenceran  $10^{-5}$ . Dari larutan pengenceran  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , dan  $10^{-5}$  masing-masing larutan dimasukkan dalam cawan petri sebanyak 1 ml, lalu ditambahkan media PCA dalam cawan petri. Cawan petri yang sudah diisi diratakan dengan digoyangkan membentuk angka 8. Dibiarkan sampai memadat, lalu di inkubasi pada inkubator pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Menghitung jumlah koloni yang tumbuh.

Cara perhitungan yaitu : mula-mula hitung semua koloni yang tumbuh dalam setiap cawan petri yang berisi 25-250 koloni dengan

menggunakan *colony counter*. Perhitungan dilakukan sesuai dengan aturan menurut APHA 2002 (Lukman *et al.* 2009). Hitung dengan menggunakan rumus berikut :

$$\text{Jumlah mikroba} = \text{Jumlah Koloni} \times \frac{1}{\text{Tingkat Pengenceran}}$$

#### 4. Uji Kualitatif Escherichia Coli

##### a) Pengujian Most Probable Number (MPN)

Metode ini terdiri dari uji pendugaan, uji penguat dan uji pelengkap

##### a. Uji Penduga

Menggunakan tiga pengenceran tertinggi yaitu  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , dan  $10^{-5}$ . Pada pengenceran  $10^{-3}$  diambil sebanyak 10 ml dalam 3 tabung medium LBDS 9 ml (seri I). Pada pengenceran  $10^{-4}$  diambil sebanyak 1 ml dalam 3 tabung medium LBDS 9 ml (seri II). Pada pengenceran  $10^{-5}$  diambil sebanyak 0,1 ml dalam 3 tabung medium LBSS 9 ml (seri III). Semua medium yang sudah di inokulasikan, diinkubasi pada inkubator dengan suhu  $35^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam sampai dengan 48 jam. Mengamati apabila terjadi kekeruhan dan terbentuknya gas di dalam tabung durham maka reaksinya positif. Mencatat hasil dari pengamatan.

##### b. Uji Penguat

Memipet biakan sebanyak 0,1 ml dari setiap tabung uji penduga yang menghasilkan reaksi positif dan diinokulasikan ke dalam medium BGLBB. Satu seri GLBB yang telah diinokulasikan, di inkubasi pada inkubator dengan suhu  $35^{\circ}\text{C}$ . Satu seri yang lain di inkubasi pada inkubator dengan suhu  $44,5^{\circ}\text{C}$ . Mengamati apabila terjadi kekeruhan dan terbentuknya gas di dalam tabung durham selama 24-48 jam, mencatat hasil dari pengamatan.

##### c. Uji Pelengkap

Mengambil satu ose biakan dari tabung BGLBB yang menunjukkan hasil positif. Lalu digoreskan pada permukaan media EMB dalam cawan petri dan di inkubasikan pada inkubator dengan

suhu 35°C selama 24- 48 jam. Setiap koloni yang berwarna hijau metalik pada setiap seri di inokulasikan dalam medium NA miring. Biakan di inkubasi pada inkubator dengan suhu 35°C selama 24 jam untuk NA miring. Isolat yang dibiakkan pada NA miring akan di uji dengan pewarnaan gram. Jumlah tabung yang positif dicocokkan dari hasil medium BGLBB dengan daftar indeks MPN.

Rumus perhitungan MPN :

$$\text{MPN} = \frac{\text{nilai MPN tabel}}{100} \times \text{faktor pengenceran yang ditengah}$$

Jika timbul kekeruhan dan gas, maka bakteri yang diisolasi dari biakan berwarna hijau metalik adalah Escherichia Coli.

#### b) Pewarnaan Gram

Membersihkan objek glass dengan alkohol samoai bebas dari lemak, dipanaskan diatas nyala api spirtus. Membuat preparat smear dari biakan koloni yang tumbuh pada media NA miring. Lalu mengeringkan di udara dan di fiksasi diatas nyala api spirtus. Kemudian meneteskan Kristal Violet sebanyak 2-3 tetes, lalu di diamkan selama 1 menit dan dibilas dengan menggunakan air mengalir. Selanjutnya meneteskan larutan lugol iodine dan di diamkan selama 1 menit lalu di bilas dengan air mengalir. Kemudian preparat diberi larutan etanol 96% setetes demi setetes selama 10 detik dan membilas dengan air mengalir. Lalu meneteskan larutan safranin, didiamkan selama 45 detik dan dibilas dengan air mengalir. Mengeringkan preparat dengan kertas tissue yang ditempelkan di sisi belakang ulasan (jangan sampai merusak ulasan) dan dikeringkan di udara. Mengamati preparat dengan perbesaran 40x, kemudian jika sudah ditemukan dilanjutkan dengan menggunakan perbesaran 100x menggunakan minyak emersi. Hasil pewarnaan gram negatif akan berwarna merah dan bakteri gram positif akan berwarna ungu.



c) Uji IMVIC

1) Uji Produksi Indol

Menginokulasikan koloni dari media EMB pada media SIM. Di inkubasi pada inkubator dengan suhu 35°C selama 24 jam. Meneteskan pereaksi indol 1-3 tetes. Hasil reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada lapisan atas media, sedangkan hasil reaksi negatif ditandai dengan terbentuknya cincin kuning.

2) Uji Voges-Proskauer (VP)

Mengambil biakan dari media EMB lalu di inokulasikan ke dalam tabung berisi 10 ml media MR-VP. Di inkubasi pada inkubator dengan suhu 35°C selama 48 jam. Memindahkan 5 ml MR-VP ke dalam tabung reaksi. Menambahkan 0,6 ml larutan  $\alpha$ -naphthol dan 0,2 ml KOH 40%. Lalu digoyang-goyang, hasil positif ditandai dengan adanya warna merah muda eosin dalam waktu 2 jam

3) Uji Methyl Red (MR)

Mengambil biakan dari media EMB lalu di inokulasikan ke dalam tabung berisi 10 ml media MR-VP. Di inkubasi pada inkubator dengan suhu 35°C selama 48 jam. Menambahkan 2 tetes sampai dengan 5 tetes indikator MR pada tabung. Hasil positif ditandai dengan adanya warna merah dan hasil negatif ditandai dengan adanya warna kuning.

4) Uji Sitrat

Menginokulasikan koloni dari media EMB ke dalam agar miring sitrat. Di inkubasi pada inkubator dengan suhu 35°C selama 96 jam. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya kekeruhan.

### **3.9. Pengolahan, Penyajian, dan Analisis Data**

#### **3.9.1 Uji Mutu Fisik Minuman Sari Tebu**

Data karakteristik mutu fisik minuman sari tebu diolah dan disajikan dalam bentuk tabel selanjutnya dianalisis secara deskriptif

#### **3.9.2 Uji Angka Lempeng Total**

Data uji angka lempeng total minuman sari tebu diolah dan disajikan dalam bentuk tabel selanjutnya dianalisis secara deskriptif

#### **3.9.3 Uji MPN**

Data uji MPN minuman sari tebu diolah dan disajikan dalam bentuk tabel selanjutnya dianalisis secara deskriptif

#### **3.9.4 Pewarnaan Gram**

Data hasil pewarnaan gram minuman sari tebu diolah dan disajikan dalam bentuk tabel selanjutnya dianalisis secara deskriptif

#### **3.9.5 Uji IMVIC**

Data uji IMVIC minuman sari tebu diolah dan disajikan dalam bentuk tabel selanjutnya dianalisis secara deskriptif