

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan studi deskriptif. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kualitas es batu yang beredar di Dusun Bulukrajan. Dalam penelitian ini parameter yang digunakan adalah parameter mikrobiologi cemaran *Coliform* pada es batu.

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada 24-31 Januari 2022 yang bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang

3.3 Alat dan bahan

3.3.1. Alat

Tabung reaksi, autoclave, tabung Durham, cawan petri, ose jarum, ose bulat, bunsen, rak tabung reaksi, beaker glass, pipet volume, pipet tetes, inkubator, kapas steril, spidol

3.3.2. Bahan

Aquades, sampel es batu, media Lactose Broth tunggal, media Lactose Broth Ganda, media Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLBB), Eosin Methylen Blue (EMB).

3.4 Variabel penelitian

3.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah sampel es batu yang beredar di Dusun Bulukrajan yang akan di analisis kualitasnya.

3.4.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah bakteri *Coliform* yang menjadi parameter mikrobiologi penentu kualitas es batu.

3.5 Definisi Operasional variabel

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Kandungan bakteri <i>coliform</i> pada sampel es batu	Ada tidaknya bakteri <i>Coliform</i> yang teridentifikasi pada sampel es batu	MPN (<i>Most Probable Number</i>)	(+) dalam uji penduga apabila terdapat gas pada tabung durham atau (+) dalam uji penegasan apabila terdapat gas dalam tabung durham (+) dalam uji konfirmasi apabila terdapat koloni bakteri berwarna hijau metalik	Rasio

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1. Pembuatan media LB tunggal

Ditimbang media lactosa broth sebanyak 1,95 gram dan dilarutkan pada 150 mL aquades. Dipanaskan dan dihomogenkan menggunakan kompor listrik. Setelah media dingin, dipipet sebanyak 10 mL ke dalam tabung reaksi yang telah berisi tabung durham terbalik kemudian ditutup menggunakan kapas. Selanjutnya di sterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian didinginkan hingga suhu 40-50°C dan disimpan dalam lemari es (Wati, 2017)

3.6.2. Pembuatan media LB ganda

Ditimbang media lactosa broth sebanyak 9,1 gram dan dilarutkan pada 350 mL aquades. dipanaskan dan dihomogenkan menggunakan kompor listrik. Setelah media dingin, dipipet sebanyak 10 mL ke dalam tabung reaksi yang telah berisi tabung durham terbalik kemudian ditutup menggunakan kapas. Selanjutnya di sterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian didinginkan hingga suhu 40-50°C dan disimpan dalam lemari es (Wati, 2017)

3.6.3. Pembuatan media BGLB

Ditimbang media brilliant green lactose broth (BGLB) sebanyak 18 gram dan dilarutkan pada 450 mL aquades. dipanaskan dan dihomogenkan menggunakan kompor listrik. Setelah media dingin, dipipet sebanyak 10 mL ke dalam tabung reaksi yang telah berisi tabung durham terbalik kemudian ditutup menggunakan kapas. Selanjutnya di sterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian didinginkan hingga suhu 40-50°C dan disimpan dalam lemari es (Wati, 2017)

3.6.4. Pembuatan media EMB

Ditimbang media Eosin Methylen Blue sebanyak 15,75 gram dan dilarutkan dalam aquades 420 mL, kemudian dihomogenkan dan dipanaskan menggunakan kompor listrik. Setelah itu di sterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah dingin, dituang ke dalam plate yang sudah di sterilkan. Didinginkan dan disimpan dalam lemari es (Wati, 2017)

3.6.5. Sampling

Lokasi pengambilan sampel di Desa Bulukandang, Kecamatan Prigen, Pasuruan. Sampel es batu yang sudah dibeli dimasukkan dalam plastik steril dan dibiarkan mencair. Setelah mencair sampel dimasukkan ke dalam botol kaca yang sudah di sterilkan. Sampel kemudian dibawa ke laboratorium untuk di analisis.

3.6.6. Uji Penduga

Disiapkan 5 tabung berisi 10 mL media LB ganda dan diberi label LBG, 1 tabung berisi 10 mL LB tunggal dan diberi label LBT1, dan 1

tabung lagi berisi 10 mL media LB tunggal diberi label LBT2. Dipipet sampel es batu yang sudah dicairkan ke dalam tabung label LBG masing-masing 10 mL, tabung label LBT1 Sebanyak 1 mL, dan tabung label LBT2 sebanyak 0,1 mL. Tabung dikocok perlahan agar homogen, kemudian diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 2x24 jam. Setelah itu diamati timbulnya gas pada tabung durham atau kekeruhan pada media. Adanya gas atau kekeruhan menunjukkan hasil positif. (Wati, 2017)

3.6.7. Uji Penegasan

Disiapkan 7 tabung berisi 10 mL media BGLB. Hasil positif pada media LB diinokulasikan menggunakan ose pada media BGLB. Kemudian semua tabung diinkubasi pada suhu 44°C selama 2x24 jam. Setelah itu diamati timbulnya gas pada tabung durham, adanya gas menunjukkan hasil positif. (Wati, 2017)

3.6.8. Uji Pelengkap

Hasil positif pada uji penegasan dipindahkan ke dalam media EMB secara aseptik menggunakan ose bulat. Kemudian diinkubasi pada suhu pada suhu 35-37°C selama 24±2 jam. Hasil dinyatakan positif apabila terdapat koloni kehijauan dengan kilap logam (Putri, 2015)

3.7 Pengolahan, Penyajian dan Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini adalah kandungan cemaran bakteri *Coliform* pada sampel es batu. Data dianalisis menggunakan metode MPN (*Most probable Number*). Data yang diperoleh dapat disajikan dalam bentuk tabel yang berisi sampel, jumlah tabung positif dan indeks cemaran *Coliform* per 100 mL sampel.

Tabel 3.2 Contoh penyajian data hasil uji penduga

Sampel	Hasil uji tabung positif							Jumlah tabung positif		
	LB Ganda (LBG)					LBT1	LBT2	LBG	LBT1	LBT2
	10	10	10	10	10	1	0,1			
S1										
S1(2)										
S2										
S2(2)										
S3										
S3(2)										

Tabel 3.3 Contoh penyajian data hasil uji penegasan

Sampel	Hasil uji tabung positif						Jumlah tabung positif			
	LB Ganda (LBG)					LBT1	LBT2	LBG	LBT1	LBT2
	10	10	10	10	10	1	0,1			
S1										
S1(2)										
S2										
S2(2)										
S3										
S3(2)										

Tabel 3.4 Contoh penyajian data uji MPN

Sampel	Nilai MPN/100 ml	Indeks MPN/100 ml permenkes	Keterangan
S1			
S1(2)			
S2			
S2(2)			
S3			
S3(2)			

Tabel 3.5 Contoh penyajian data hasil uji penegasan

Sampel	Koloni hijau metalik	keterangan
S1		
S1(2)		
S2		
S2(2)		
S3		
S3(2)		

Tabel 3.6 Tabel MPN formula Thomas

Jumlah Tabung (+) Gas Pada Penanaman			Index Mpn Per 100 MI
5x10ml	1x1 ml	1x 0,1 ml	
0	0	0	0
0	0	1	2
0	1	0	2
0	1	1	4
1	0	0	2
1	0	1	4
1	1	0	4
1	1	1	7
2	0	0	5
2	0	1	8
2	1	0	8
2	1	1	10
3	0	0	9
3	0	1	13
3	1	0	12
3	1	1	16
4	0	0	17
4	0	1	21
4	1	0	22
4	1	1	27
5	0	0	67
5	0	1	84
5	1	0	265
5	1	1	≤ 979