

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis Penelitian ini menggunakan studi deskriptif. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kualitas es balok yang di produksi dan sudah beredar dikonsumsi oleh masyarakat di wilayah Kecamatan Kepanjen. Dalam penelitian ini parameter yang digunakan yaitu parameter mikrobiologi cemaran bakteri *Coliform* pada es balok.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April 2023 yang berlokasi di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Tabung reaksi (IWAKI), tabung durham, rak tabung reaksi, timbangan, ose jarum, ose bulat, beaker glass (IWAKI), bunsen, pipet volume (PHYREX), pipet ukur (PHYREX), pipet tetes, kapas steril, inkubator, LAF (*Laminar Air Flow*), *autoclave* (GEA), *hotplate* (Thermo), spidol, label, batang pengaduk, erlenmeyer (IWAKI), alumunium foil.

3.3.2 Bahan

Sampel es balok, aquades, media *Lactosa Broth* (LB) (HIMEDIA), media *Brilliant Green Lactosa Bile Broth* (BGLBB) (HIMEDIA).

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah sampel es balok yang diproduksi di wilayah Kecamatan Kepanjen yang akan di analisis kualitas pada air yang digunakan sebagai bahan pembuatan es balok tersebut.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah bakteri *Coliform* yang merupakan parameter mikrobiologi untuk mengetahui layak tidaknya es balok yang di produksi di Kecamatan Kepanjen sebagai bahan tambahan minuman untuk dikonsumsi.

3.5 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Parameter ukur	Skala ukur	Alat ukur	Hasil Ukur
Kandungan bakteri <i>Coliform</i> pada sampel es balok yang ada di Kecamatan Kepanjen	Bakteri <i>Coliform</i> pada sampel es balok yang ada di Kecamatan Kepanjen	Parameter Mikrobiologi berdasarkan jumlah tabung yang positif dan negatif	Rasio	Metode MPN	Memperoleh nilai indeks MPN yang diperoleh dari jumlah tabung yang positif
Es balok	Bahan pelengkap pada minuman yang diolah melalui proses pembekuan	Parameter mikrobiologi berdasarkan jumlah tabung yang positif dan negatif	Nominal	Panca indera	Es balok yang dibeli di beberapa pasar yang ada di Kecamatan Kepanjen

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Sampling

Lokasi pengambilan sampel dengan teknik *purposive* sampling yang dibeli dari 3 pasar paling ramai diantara 18 pasar yang terletak di Kecamatan Kepanjen. Sampel es balok yang sudah dibeli dengan ukuran 40 cm lalu dihancurkan dan dimasukkan ke dalam plastik yang steril dan dibiarkan mencair selama kurang lebih 3 jam. Setelah mencair lalu dimasukkan kedalam botol kaca yang sudah di sterilisasi sebelumnya dengan *autoclave* selama 15 menit di suhu 121°C kemudian botol sampel diberi label dan dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi yang ada di Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang untuk dianalisis (Askrening, 2017).

3.6.2 Sterilisasi alat dan media

Sterilisasi yang dilakukan pada penelitian ini ada dua yaitu, sterilisasi basah dan kering. Media yang digunakan dilakukan sterilisasi basah menggunakan autoklaf dengan waktu 15 menit pada suhu 121°C, suhu ini, didapatkan dari air yang mendidih di dalam *autoclave* berubah menjadi uap. Media yang di sterilisasi dengan *autoclave* dibungkus dengan aluminium foil. Pada sterilisasi kering menggunakan oven selama 60 menit pada suhu 180°C. Untuk sterilisasi kering digunakan pada alat yang tahan panas seperti beaker glass, batang pengaduk, erlenmeyer. Sebelum dilakukan sterilisasi alat dibungkus menggunakan aluminium foil. Sterilisasi bertujuan agar media dan alat yang digunakan tidak terkontaminasi oleh bakteri yang lain (Askrening, 2017).

3.6.3 Pembuatan media

3.6.3.1 Media LB (*Lactose Broth*)

Disiapkan media steril dengan media yang digunakan yaitu *Lactose Broth* (LB) untuk uji penduga. Pada uji penduga media *Lactose Broth* (LB) ditimbang sebanyak 6 g dimasukkan dalam erlenmeyer, dilarutkan dengan aquades sebanyak 450 ml diatas hotplate hingga serbuk larut sempurna, tunggu hingga dingin lalu diisikan media sebanyak 10 ml tiap tabung dan dilengkapi tabung durham dengan posisi terbalik. Lalu media di sterilkan dalam *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit (Askrening, 2017)

3.6.3.2 Media BGLBB (*Brilliant Green Lactose Bile Broth*)

Pada uji penegasan media *Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLBB) ditimbang sebanyak 21 g dimasukkan dalam erlenmeyer dilarutkan dengan aquades sebanyak 450 ml diatas hotplate hingga serbuk larut sempurna, lalu di sterilkan dalam *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit dan di dinginkan dalam lemari es (Askrening, 2017).

3.6.4 Uji MPN (*Most Probable Number*)

3.6.4.1 Uji Penduga

Pada uji penduga ini menggunakan seri pengujian 5-1-1 yang terdiri dari 7 tabung reaksi dengan menggunakan media *Lactosa Broth*, untuk 5 tabung berisi 10 ml media dan 10 ml sampel, 1 tabung berisi 10 ml media dan 1 ml sampel, 1 tabung berisi 10 ml media dan 0,1 ml sampel. Media *Lactosa Broth* dibagi menjadi 2 yaitu

Lactosa Broth Single Strength (LBSS) dan *Lactosa Broth Double Strength* (LBDS) dibedakan karena konsentrasi sampel lebih besar pada LBDS daripada LBSS (Ula dkk., 2021). Tabung yang berisi sampel 10 ml digunakan untuk LBDS, dan tabung yang berisi sampel 1 ml dan 0,1 ml digunakan untuk LBSS.

Uji penduga diawali dengan mengisikan 10ml media *Lactosa Broth Double Strength* untuk di 5 tabung reaksi dilabeli dengan LBDS, kemudian ditambahkan 10 ml media *Lactosa Broth Single Strength* untuk 1 tabung reaksi dilabeli dengan LBSS1, dan ditambahkan 10 ml media *Lactosa Broth Single Strength* untuk 1 tabung reaksi dilabeli dengan LBSS2. Kemudian ditambahkan sampel es balok yang sudah cair didalam tabung LBDS masing masing 10 ml, tabung LBSS1 sebanyak 1 ml dan LBSS2 sebanyak 0,1 ml. Tabung dikocok hingga homogen, lalu diinkubasi pada suhu 37°C ditunggu selama 1x24 jam. Lalu diamati hasilnya jika terdapat gelembung gas pada tabung durham maka menunjukkan hasil positif (Askrening & Yunus, 2017).

3.6.4.2 Uji Penegasan

Pada uji penegasan menggunakan media BGLBB (*Brilliant green lactosa bile broth*) yang digunakan untuk mendeteksi adanya bakteri *coliform*. Media BGLBB mengandung garam empedu dan laktosa, serta mengandung hijau brilian yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri selain bakteri *coliform*. Komposisi ini menyebabkan media BGLBB mampu membuat bakteri *coliform* tumbuh dengan optimal (SigmaAldrich, 2018). Pada uji penduga hasil yang positif dilanjutkan dengan uji penegas. Masing masing sampel positif ditanam pada media BGLBB dengan standar tabung 5-1-1. Inokulasi dari biakan positif pada media LB ke media BGLBB dilakukan dengan menggunakan ose dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37° C dan ditunggu 1 x 24 jam. Jika terbentuk gas pada beberapa tabung media BGLBB, maka dapat disesuaikan dengan tabel indeks sesuai dengan angka jumlah tabung yang positif (Askrening & Yunus, 2017).

3.7 Pengolahan, Penyajian dan Analisis data.

Data yang diperoleh dari penelitian ini adalah kandungan cemaran bakteri *coliform* pada sampel es balok. Data analisis menggunakan metode MPN.

Data yang dihasilkan akan disajikan dalam bentuk tabel seperti pada tabel dibawah:

Tabel 3.2 Hasil uji penduga

Sampel	Hasil tabung positif							Jumlah tabung positif		
	LBDS (5x10ml)					LBSS1 (1x1ml)	LBSS 2 (1x0, 1ml)	LBDS	LBSS1	LBSS2
	10ml	10ml	10ml	10ml	10ml	1ml	0,1ml			
A1										
A2										
B1										
B2										
C1										
C2										

Tabel 3.3 Hasil uji penegasan

Sampel	5x10ml					1x1ml	1x0,ml	Indeks MPN per 100ml	Ket
A1									
A2									
B1									
B2									
C1									
C2									

Keterangan : A1 = Sampel 1 replikasi 1

A2= sampel 1 replikasi 2

B1= sampel 2 replikasi 1

B2 = sampel 2 replikasi 2

C1= sampel 3 replikasi 1

C2= sampel 3 replikasi 2

Nilai indeks MPN yang dilihat dari jumlah tabung positif dapat mengacu pada tabel indeks MPN seperti tabel dibawah ini :

Tabel 3.4 Tabel MPN untuk mencari nilai indeks MPN

VOLUME			Indeks MPN/100 mL	VOLUME			Indeks MPN/100 mL
1	0	0,1		10	1	0,1	
0	0	0	<2	4	2	1	26
0	0	1	2	4	3	0	27
0	1	0	2	4	3	1	33
0	2	0	4	4	4	0	34
1	0	0	2	5	0	0	23
1	0	1	4	5	0	1	31
1	1	0	4	5	0	2	43
1	1	1	6	5	1	0	33
1	2	0	6	5	1	1	46
2	0	0	5	5	1	2	63
2	0	1	7	5	2	0	49
2	1	0	7	5	2	1	70
2	1	1	9	5	2	2	94
2	2	0	9	5	3	0	79
2	3	0	12	5	3	1	110
3	0	0	8	5	3	2	140
3	0	1	11	5	3	3	180
3	1	0	11	5	4	0	130
3	1	1	14	5	4	1	170
3	2	0	14	5	4	2	220
3	2	1	17	5	4	3	280
3	3	0	17	5	4	4	350
4	0	0	13	5	5	0	240
4	0	1	17	5	5	1	350
4	1	0	17	5	5	2	540
4	1	1	21	5	5	3	920
4	1	2	26	5	5	4	1600
4	2	0	22	5	5	5	≥ 2400

(Farida, 2021)