

## **BAB III METODOLOGI PENELITIAN**

### **3.1 JENIS PENELITIAN**

Jenis penelitian yang digunakan yaitu penelitian observasi deskriptif, dimana peneliti akan melakukan pemeriksaan bakteriologis untuk menganalisis adanya bakteri *coliform* dan mendapatkan nilai Most Probable Number (MPN) pada bubur bayi home industri yang dijual di Kecamatan Sukodono Sidoarjo.

### **3.2 POPULASI dan SAMPEL**

#### **3.2.1 Populasi**

Populasi pada penelitian ini yaitu bubur bayi home industri yang diperjualbelikan secara bebas di Kecamatan Sukodono Sidoarjo.

#### **3.2.2 Sampel**

Metode pengambilan sampel yang digunakan adalah Simple Random Sampling yaitu suatu teknik pengambilan sampel atau elemen secara acak, dimana setiap elemen atau anggota populasi memiliki kesempatan yang sama untuk terpilih menjadi sampel. Sehingga diperoleh sampel bubur bayi sebanyak 6 sampel dari outlet atau produsen yang berbeda di Kecamatan Sukodono Sidoarjo.

### **3.3 WAKTU dan TEMPAT**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Januari hingga Februari 2023.

### **3.4 Alat dan Bahan**

#### **3.4.1 Alat**

Styrofoam box, gelas ukur 100 ml, pipet tetes, pipet ukur 10 ml, tabung reaksi 20 ml (Pyrex), cawan petri, tabung durham, rak tabung, beaker glass 500 ml (Pyrex), erlenmeyer 1000 ml (Pyrex), erlenmeyer 100 ml (Iwaki), spatula, batang pengaduk, stirrer, bola hisap, kaca arloji, mikropipet 1000  $\mu$ L, kaca preparat, ose bulat, bunsen spiritus, hotplate, mikroskop, LAF (Laminar Air Flow), chiller/lemari pendingin, timbangan analitik, oven, autoklaf, dan inkubator.

#### **3.4.2 Bahan**

Sampel bubur bayi home industri, aquadest, *Lactosa Broth (LB)*, *Brilliant Green Lactose Broth (BGLB)*, *Eosyn Methilen Blue Agar (EMB Agar)*, pepton

dilution fluid, alkohol 70%, kristal violet, lugol, alkohol 96%, fuchisia, minyak imersi, kapas, aluminium foil, blue tip, kertas perkamen, kertas label.

### 3.5 VARIABEL PENELITIAN

#### 3.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas (*Independent variable*) pada penelitian ini adalah sampel bubuk bayi organik home industri di Kecamatan Sukodono.

#### 3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat (*Dependent variable*) yaitu bakteri coliform yang terkandung didalam bubuk bayi organik home industri dengan menggunakan metode MPN (Most Probable Number)

### 3.6 DEFINISI OPERASIONAL VARIABEL

No	Variabel	Definisi operasional	Metode dan alat ukur	Skala ukur	Hasil ukur
1	Bubur bayi organik home industri	Bubur bayi home industri adalah bubuk bayi yang diperjualbelikan secara bebas di Kecamatan Sukodono, Kabupaten Sidoarjo	Observasi	-	Pengamatan warna, bau, dan rasa.
2	Bakteri coliform	Bakteri yang di temukan pada bubuk bayi home industri di Kecamatan Sukodono, Kabupaten Sidoarjo	Metode Most Probable Number (MPN)	Nominal	Positif : jika adanya gas dengan syarat kurang dari 10/g.  Negatif : tidak terdapat adanya gas.

### 3.7 METODE PENELITIAN

#### 3.7.1 Sterilisasi Alat dan Media

Sterilisasi yang dilakukan pada penelitian ini terdapat dua cara yakni, sterilisasi basah dan kering. Alat yang digunakan untuk sterilisasi media adalah autoklaf. Adapun cara sterilisasi alat dengan autoklaf adalah sebagai berikut.

Disiapkan autoklaf. Dituang air ke dalam tubuh sterilisator hingga 2/3 dasar keranjang. Alat dan media yang akan di sterilisasi ditata didalam tabung. Sterilisator ditutup dengan cara mempertemukan lubang baut, sambil diputar untuk lebih rapat. Dibuka klep pengatur pengamanan, hidupkan listrik. Bila uap mulai keluar (bunyi mendesis), ditutup klep pengaman, tekanan didalam akan naik dan baca pada alat ukur tekanan sampai 1 Atm (121°C). Jika sudah tercapai, pertahankan selama 15 menit dengan cara klep pengukur tekanan dibuka untuk mengurangi panas. Pada akhir proses, matikan listrik dan tunggu tekanan hingga nol, suhu dibawah 100°C. Dikeluarkan keranjang serta alat dan bahan dari dalam sterilisator. Sedangkan untuk sterilisasi alat dapat menggunakan sterilisasi kering, adapun alat yang dapat di sterilisasi menggunakan metode kering adalah alat dan bahan yang tahan panas seperti beaker glass, batang pengaduk, dan erlenmeyer. Sebelum dilakukan sterilisasi alat dibungkus alumunium foil terlebih dahulu dan dipanaskan didalam oven dengan menggunakan suhu 170°C selama 1,5 jam.

### **3.7.2 Pembuatan Media dan Pelarut**

#### **1. Peptone dilution fluid**

Ditimbang pepton dilution sebanyak 12,75 gram dan dilarutkan di dalam aquadest 500 ml lalu diaduk hingga homogen. Setelah itu, disterilisasi dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya disimpan pada lemari pendingin.

#### **2. Media LB (Lactosa Broth)**

Ditimbang 13 gram serbuk Lactose Broth dan dilarutkan dalam 1000 ml aquades, kemudian dimasukkan sebanyak 9 ml kedalam tabung pembiakan yang berisi tabung durham dalam posisi terbalik dan ditutup kapas. Setelah itu, disterilisasi dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

#### **3. Media BGLB (Brilliant Green Lactose Broth)**

Ditimbang 20 gram serbuk Brilliant Green Lactose Broth (BGLB) dan dilarutkan dalam 500 ml aquades. Kemudian dimasukkan media sebanyak 9 ml kedalam tabung pembiakan yang berisi tabung durham dalam posisi terbalik dan ditutup kapas. Setelah itu, disterilisasi dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

#### 4. Media EMB Agar

Media Eosin Methylene Blue (EMB) Agar ditimbang sebanyak 14,4 gram EMB Agar menggunakan neraca analitik, kemudian dilarutkan dengan aquades 400 ml dalam gelas beaker dan diaduk sampai homogen. Selanjutnya dipanaskan media diatas hot plate hingga mendidih, kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Lalu disiapkan cawan petri dan selanjutnya larutan EMBA dimasukkan ke dalam cawan petri sebanyak 20 ml setiap cawan petri dan ditunggu hingga memadat.

#### 3.7.3 Preparasi Sampel

Sampel diambil dengan menggunakan sendok steril dengan jumlah sampel yang digunakan sebanyak 6 sampel yang diperoleh dari 6 pedagang kaki lima dengan 6 merk yang berbeda di Kecamatan Sukodono, yakni dari pedagang A dengan merk BB, pedagang B dengan merk BM, pedagang C dengan merk BS, pedagang D dengan merk BR, pedagang E dengan merk BK dan pedagang F dengan merk BU. Sampel uji dibuat dengan 3 seri pengenceran yaitu,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ . Pengenceran awal, sampel dilakukan dengan mencampurkan 5 gram sampel bubuk bayi ke dalam 45 ml peptone dilution fluid, dan dihomogenkan lalu diberi label pengenceran  $10^{-1}$ . Kemudian dalam mendapatkan pengenceran  $10^{-2}$  suspensi awal diambil sebanyak 1 ml lalu dimasukan ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml pepton dilution fluid dan dihomogenkan. Demikian dengan pengencer  $10^{-3}$ , suspensi diambil sebanyak 1 ml dari pengenceran  $10^{-2}$ , lalu dimasukan kedalam tabung reaksi berisi 9 ml peptone dilution fluid dan dihomogenkan (Zelpina et al., 2020).

#### 3.7.4 Uji Penduga

Pada uji penduga disiapkan 9 tabung (seri 3-3-3) untuk pengenceran bertingkat. Masing-masing tabung yang berisi tabung durham terbalik ditambahkan dengan media Lactosa Broth (LB) sebanyak 9 mL kemudian disterilkan menggunakan autoklaf. Ditambahkan dengan sampel uji. Pada 3 tabung seri pertama ( $10^{-1}$ ) dimasukan 1 mL sampel yang telah dilarutkan dengan menggunakan pelarut PDF pada tabung pertama ( $10^{-1}$ ). Pada 3 tabung seri kedua ( $10^{-2}$ ) dimasukan 1 mL sampel makanan yang telah dilarutkan dengan pelarut PDF pada tabung kedua ( $10^{-2}$ ). Pada 3 tabung seri ketiga ( $10^{-3}$ ) dimasukan 1 ml sampel makanan yang telah dilarutkan dengan PDF pada tabung ketiga ( $10^{-3}$ ). Sembilan

tabung yang telah terisi sampel diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati apakah terbentuk gas pada tiap-tiap tabung. Terbentuknya gas dan perubahan media menjadi keruh menandakan tes penduga positif. Kemudian tabung yang positif dibandingkan dengan tabel MPN dan diperoleh nilai angka paling mungkin (APM) yang selanjutnya dibandingkan dengan Peraturan BPOM No. 13 Tahun 2019 Tentang Batas Maksimal Cemaran Mikroba Pada Pangan Olahan dengan ketentuan syarat 10 koloni/g (Zelpina et al., 2020).

### **3.7.5 Uji Konfirmasi**

Hasil sampel yang positif maupun tidak pada tes perkiraan dapat dilanjutkan dengan memasukkan sampel ke dalam media Brilliant Green Lactose Broth (BGLB) untuk uji konfirmasi. Untuk uji konfirmasi, memindahkan sebanyak 1 atau 2 mata ose inokulasi cairan dari tabung LB yang positif maupun negatif ke dalam tabung reaksi yang berisi media BGLB sebanyak 9 ml dan terdapat tabung durham terbalik. Sampel diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Diamati tabung yang didalamnya terdapat gas. Dilakukan pengamatan, hitung tabung yang positif dan dicocokkan dengan tabel MPN untuk mengetahui jumlah total *Coliform*.

### **3.7.6 Uji Pelengkap**

Tes pelengkap dilakukan dengan menanam hasil positif uji konfirmasi sebanyak 1 ose ke media Eosin Metylen Blue Agar (EMBA) dengan cara media yang telah memadat digoreskan dengan hasil positif dari tes konfirmasi. Sampel diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif pada media EMBA (ditandai dengan penampakan fisik nwarna hijau metalik). Media EMBA adalah media selektif dan diferensial yang digunakan untuk isolasi bakteri gram negatif dari spesimen klinis dan non-klinis.

### **3.7.7 Uji Pewarnaan Gram**

Diambil satu ose biakan bakteri dari hasil uji pelengkap, kemudian diletakkan pada objek glass. Dibasahi dengan larutan zat warna karbol gentinviolet (Karbol kristal violet, karbol metilviolet) dan didiamkan beberapa menit kemudian dicuci dengan air. Kemudian disiram dengan larutan iodium dan dibiarkan terendam dalam waktu yang sama setelah itu dicuci dengan air dan dikeringkan. Langkah selanjutnya, preparat didekolorisasi atau ditambahkan dengan alkohol atau

campuran alkohol dan aseton sampai semua zat warna tampak luntur dari film. Preparat dicuci dengan air, lalu preparat diberi warna kontras (counterstain) seperti safranin, karbolfuksin encer, air fluksin, tengguli bismack, atau pironin B. Langkah terakhir yaitu preparat dicuci dengan air kemudian dikeringkan untuk selanjutnya dianalisis dengan menggunakan mikroskop

### **3.8 PENGOLAHAN dan PENYAJIAN DATA**

#### **3.8.1 Pengolahan Data**

Data diolah dengan memberikan kode untuk setiap sampelnya, pada penelitian ini peneliti memberikan kode sebagai berikut :

- Blanko
- Sampel 1 Replikasi 1 = BB 1
- Sampel 1 Replikasi 2 = BB 2
- Sampel 2 Replikasi 1 = BM 1
- Sampel 2 Replikasi 2 = BM 2
- Sampel 3 Replikasi 1 = BS 1
- Sampel 3 Replikasi 2 = BS 2
- Sampel 4 Replikasi 1 = BR 1
- Sampel 4 Replikasi 2 = BR 2
- Sampel 5 Replikasi 1 = BK 1
- Sampel 5 Replikasi 2 = BK 2
- Sampel 6 Replikasi 1 = BU 1
- Sampel 6 Replikasi 2 = BU 2

#### **3.8.2 Penyajian Data**

Data akan disajikan dalam bentuk tabel yang menunjukkan ada atau tidaknya bakteri *Coliform* pada sampel bubuk bayi home industri kemudian dijabarkan dalam bentuk narasi, sehingga menggambarkan karakteristik dan tujuan penelitian

**Tabel 3. 1 Uji Organoleptik Pada Bubur Bayi Home Industri Di Kecamatan Sukodono**

Sampel	Gambar	Uji warna	Uji bau	Uji rasa
BB				
BM				
BS				
BR				
BK				
BU				

**Tabel 3. 2 Uji Penduga Pada Bubur Home Industri**

Sampel	10 <sup>-1</sup>			10 <sup>-2</sup>			10 <sup>-3</sup>			Kombinasi positif	Hasil indeks MPN	Keterangan
BB 1												Tidak Memenuhi Persyaratan/ Memenuhi Persyaratan
BB 2												Tidak Memenuhi Persyaratan/ Memenuhi Persyaratan
BM 1												Tidak Memenuhi Persyaratan/ Memenuhi Persyaratan
BM 2												Tidak Memenuhi Persyaratan/ Memenuhi Persyaratan
BS 1												Tidak Memenuhi Persyaratan/ Memenuhi Persyaratan
BS 2												Tidak Memenuhi Persyaratan/ Memenuhi Persyaratan
BR 1												Tidak Memenuhi Persyaratan/ Memenuhi persyaratan
BR 2												Tidak Memenuhi Persyaratan/ Memenuhi persyaratan
BK 1												Tidak Memenuhi Persyaratan/ Memenuhi persyaratan
BK 2												Tidak Memenuhi Persyaratan/ Memenuhi persyaratan



