

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan MPN *Coliform* pada jamu kunci sirih dan beras kencur.

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah jamu kunci sirih dan beras kencur yang dijual di kelurahan Gading Kenjeran Surabaya.

3.2.2 Sampel

Sampel dalam penelitian ini berjumlah 30 sampel jamu kunci sirih dan beras kencur diambil dari 15 orang penjual jamu dengan pengulangan pemeriksaan dua kali.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di laboratorium Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Januari sampai bulan Juni 2014 sedangkan waktu pemeriksaan dilakukan pada bulan April 2014.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas : Jamu kunci sirih dan beras kencur

Variabel Terikat : MPN *Coliform*

3.4.2 Definisi Operasional

Adapun definisi operasional dari variabel yang digunakan adalah sebagai berikut :

1. MPN adalah singkatan dari Most Probable Number yaitu perkiraan terdekat jumlah kuman yang dinyatakan dalam setiap 100 ml sampel, dengan ragam : (5 x 10 ml, 1 x 1 ml, 1 x 0,1 ml) adalah metode pemeriksaan yang digunakan untuk sampel yang sudah diolah angka kumannya yang diperkirakan rendah.
2. *Coliform* adalah bakteri golongan coli yang biasanya ditunjukkan oleh adanya pembentukan gas di dalam medium BGLB (Brilian Green Lactose bile Broth).
3. Jamu kunci sirih dan beras kencur adalah minuman yang diproses dan diolah dengan cara sederhana dan tradisional, dengan menggunakan alat rumahan yang minim dan terbatas.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan adalah data primer yaitu dari pemeriksaan MPN jamu beras kencur dan kunci sirih yang dilakukan di laboratorium.

3.5.1 Prinsip Pemeriksaan

Volume spesimen yang berbeda-beda jumlahnya dalam seri desimal ditambahkan ke dalam tabung media cair yang sesuai dengan adanya reaksi fermentasi laktose dan pembentukan gas di dalam tabung durham.

Dengan melihat jumlah tabung media biakan yang ditanami dan jumlah tabung yang menunjukkan reaksi positif, dengan timbul gas maka jumlah *Coliform* yang paling mungkin mendekati dengan Tabel MPN sistem 5.1.1.

3.5.2 Metode Pemeriksaan

Untuk pemeriksaan bakteri golongan Coliform pada jamu kunci sirih dan beras kencur digunakan metode sistem tabung ganda.

3.5.3 Persiapan Pemeriksaan

1. Alat yang digunakan dalam pemeriksaan ini meliputi :
 - a. Pipet ukur 10 ml dan 1 ml
 - b. Tabung reaksi dan Tabung durham
 - c. Rak tabung
 - d. Incubator
 - e. Autoclaf
 - f. pH meter
 - g. Ose bulat
 - h. Hotplate
 - i. Erlenmeyer
 - j. Kapas
 - k. Label

2. Media dan Reagensia

Media yang digunakan dalam pemeriksaan adalah :

- a. Media Laktosa Broth Single Strength dan Double Strength
- b. Media BGLB (Brilliant Green Lactosa Bile Broth)

3. Cara Kerja Pembuatan media Lactosa Broth

Media lactosa Broth merupakan media untuk tes perkiraan pada pemeriksaa bakteri golongan coliform, dengan menggunakan tabung ganda.

a. Lactosa Broth Single Strength (Lactosa Bouillon I)

Komposisi : 1. Beef Extract 3gr

2. Pepton 5 gr

3. Laktosa 5 gr

4. Aquades 1000 ml

Dilarutkan semua reagen dengan jalan dipanaskan sampai larut sempurna pH 7,0 : kemudian diisikan kedalam tabung 16x16 mm @ 10 ml (yang sudah ada tabung durham didalamnya) disterilkan dengan autoclave selama 15 menit.

b. Lactosa Broth Double Strength (Lactosa Bouillon II)

Komposisi : Beef ekstrak 9 gr

Pepton 15 gr

Laktosa 15 gr

Aquades 1000 ml

Semua reagen dilarutkan dengan jalan dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian diisikan kedalam tabung 16x16 mm @ 10 ml (yang sudah ada tabung durham di dalamnya) disterilkan.

4. Cara kerja pembuatan BGLB (Brilliant Green Lactosa Bile Broth)

Media ini digunakan untuk tes penegasan pada pemeriksaan bakteri golongan coliform, dengan menggunakan metode tabung ganda. Media ini menghambat pertumbuhan semua bakteri gram positif, juga bakteri Clostridium dan Bacillus yang sering terdapat dalam air.

a. Beef Extract	9 gr
pepton	15 gr
lactosa	15 gr
aquadest	500 ml
b. Oxgall (Dehydrate)	20 gr
aquadest	200 ml

Dicampurkan b.1 dan b.2 kemudian ditambah aquadest sampai 975 ml, pH dijadikan 7,4 kemudian ditambah Brilliant Green 0,1 % sebanyak 13,3 ml, ditambah aquadest sampai 1000 ml ml dimasukkan kedalam tabung 16x16 mm @ 10 ml (yang sudah ada tabung durhamnya). Disterilkan 120° C selama 15 menit. Sebagai ganti oxgall dapat dipakai typol dengan kepekatan 0,2 % (Soewarsono, 1993).

5. Cara Sterilisasi alat dan Media

- a. Mengisi bagian dasar Autoklaf dengan aquades hingga batas tertentu.
- b. Menutup sekat yang berlubang-lubang antara bagian dasar dan bagian atas Autoklaf.
- c. Memasukkan alat dan bahan-bahan yang akan disterilkan.

- d. Menutup Autoklaf dengan seksama dan serapih mungkin, dengan cara berlawanan.
- e. Membuka katup udara agar uap air dapat mengusir udara yang ada dalam Autoklaf pada saat pemanasan.
- f. Apabila suhu telah mencacapai 10°C tutuplah katup udara untuk meningkatkan tekanan uap di dalam Autoklaf.
- g. Perhatikan kenaikan suhu atau tekanan uap apabila telah mencapai 121°C atau tekanan $1,1 \text{ kg/ cm}^2$. Sterilisasi dipertahankan 15 menit setelah suhu atau tekanan uap mencapai batas tertentu.
- h. Membuka katup Autoklaf dengan cara buka-tutup hingga tekanan uap turun.
- i. Membuka tutup Autoklaf dengan hati-hati
- j. Mengeluarkan alat dan bahan-bahan yang telah disterilisasi (Novel dkk, 2010)

3.6 Prosedur Penelitian

Pada pemeriksaan digunakan metode tabung ganda system 5-1-1 untuk sampel yang sudah diolah, maksudnya 5 tabung Lactosa Broth Double Strenght (LB II) untuk diinokulasikan sampel 10 ml, 1 tabung Lactosa Broth Single Strenght (LB I) untuk 1 ml sampel dan 1 tabung Lactosa Broth Single Strenght (LB I) untuk 0,1 ml sampel.

3.6.1 Tes perkiraan (Presumtif)

Disiapkan 5 tabung yang masing-masing berisi media Laktosa Broth Double Strength (Lactosa Bouillon II) sebanyak 10 ml (tabung 1a sampai dengan 5a), 2 tabung yang berisi Lactosa Broth Singgle Strength (Lactosa Bouillon I) sebanyak 10 ml (tabung 1b dan 2b)

Dengan menggunakan pipet steril masukkan sampel masing-masing 10 ml kedalam tabung 1a sampai dengan 5a secara aseptik. Demikian juga kedalam tabung 1b dimasukkan sampel sebanyak 1 ml dan 0,1 ml sampel pada tabung 2b. Setelah semua tabung-tabung tersebut diisi sampel, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam, masing-masing tabung diamati untuk melihat ada atau tidaknya adanya gas.

Adanya gas dapat terlihat pada tabung durham yang ada di dalam media tersebut. Tes perkiraan atau presumtif yang positif ditandai dengan terbentuknya gas, tetapi hal itu belum memastikan adanya bakteri golongan *Coliform* pada sampel tersebut. Media Lactosa Broth dapat juga difermentasi oleh bakteri lain selain *Coliform*. Oleh karena itu tes perkiraan yang positif perlu dilanjutkan dengan test penegasan (confirmed test).

3.6.2 Test Penegasan (Confirmatif)

Dari tiap-tiap tabung test perkiraan yang positif (adanya gas pada tabung durham) dipindahkan 1-2 mata ose (kawat sengkeli) kedalam tabung penegasan yang berisi 10 ml media BGLB (Brilliant Green Lactosa Bile Broth), kemudian tabung-tabung tersebut diinokulasikan pada suhu 37°C selama 24-48 jam . pembacaan dilakukan dengan melihat jumlah tabung BGLB yang menunjukkan adanya gas (Fardiaz, 1989).

3.6.3 Pembacaan Hasil dan Pelaporan

Jumlah tabung yang positif pada tes penegasan dicatat (pada tabung BGLB). Angka yang diperoleh dicocokkan dengan tabel MPN, maka akan diperoleh indeks MPN *Coliform*.

3.7 Teknik Analisa Data

Data indeks MPN kemudian ditabulasikan, untuk mengetahui perbedaan MPN pada jamu beras kencur dan kunci sirih data diuji normalitas datanya dahulu untuk mengetahui apakah data tersebut berdistribusi normal atau tidak. Hasil pengujian pada penelitian ini menunjukkan bahwa data tidak berdistribusi normal maka uji yang digunakan adalah uji Man-Whitney dengan taraf signifikansi 0,05.