

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian deskriptif untuk memperoleh gambaran secara obyektif tentang jumlah *Coliform* menggunakan metode MPN pada sambal penyetan yang dijual pedagang kaki lima di jalan Sutorejo Kecamatan Mulyorejo Surabaya.

3.2 Populasi dan sampel

3.2.1 Populasi penelitian

Populasi penelitian ini adalah sambal penyetan yang dijual pedagang kaki lima di jalan Sutorejo Kecamatan Mulyorejo Surabaya.

3.2.2 Sampel penelitian

Sampel yang digunakan adalah sambal penyetan yang dijual pedagang kaki lima di jalan Sutorejo Kecamatan Mulyorejo Surabaya, sebanyak 28 sampel dari 14 pedagang kaki lima yang masing- masing diambil 2 sampel.

3.3 Variabel penelitian dan definisi operasional

3.3.1 Variabel penelitian

Variabel penelitian adalah jumlah *Coliform* yang terdapat dalam sambal penyetan yang dijual pedagang kaki lima di jalan Sutorejo Kecamatan Mulyorejo Surabaya.

3.3.2 Definisi operasional variabel

- A. MPN adalah suatu metode untuk menghitung jumlah bakteri *Coliform* berdasarkan fermentasi laktosa pada tabung ganda.
- B. Bakteri *Coliform* adalah bakteri yang hidup pada saluran pencernaan manusia dan hewan berdarah panas, dan digunakan sebagai indikator adanya cemaran kotoran manusia serta untuk mengetahui kondisi sanitasi pada air atau makanan
- C. Sambal adalah makanan pendamping yang terbuat dari cabe, bawang merah, bawang putih, tomat, trasi dan garam, kemudian diproses melalui penggorengan, tanpa penggorengan (sambal mentah), atau penggorengan yang berulang.
- D. Sambal yang diteliti adalah sambal penyetan (melalui proses penggorengan) yang dijual di pinggir jalan atau pedagang kaki lima di jalan Sutorejo Surabaya.

3.4 Tehnik pengumpulan data

Sampel dikumpulkan secara keseluruhan yang berjumlah 28 sampel dari 14 pedagang kaki lima, selanjutnya data diambil dari hasil pemeriksaan laboratorium dengan menggunakan metode MPN *Coliform*.

3.5 Tahap penelitian

3.5.1 Prinsip pemeriksaan

Dalam metode MPN digunakan medium cair didalam tabung reaksi yang diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu dan hasil positif dapat dilihat dengan

mengamati timbulnya kekeruhan dan terbentuknya gas didalam tabung durham. Spesimen ditanam pada *Lactose Broth* (LB) diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu, hasil LB yang positif dipindahkan pada *Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLB). Hasil BGLB yang positif menunjukkan adanya bakteri *Coliform*.

3.5.2 Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah lampu spirtus, pipet ukur 1 ml dan 10 ml, pipet tetes, erlenmeyer, ose , neraca triple beam, tabung reaksi, tabung durham, rak tabung, autoclave, oven dan inkubator.

3.5.3 Bahan dan reagensia

Bahan dan reagensia yang digunakan dalam penelitian ini adalah Sambal penyetan, Natrium klorida 0.85% atau PZ, *Lactose Broth* (LB), *Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLB) dan *Aquadest*.

3.5.4 Pembuatan media dan reagen

A. Reagen Natrium klorida 0.85% atau PZ

1. Melakukan perhitungan

$$\text{gr} = \frac{0,85\% \times 90 \text{ ml} \times 28}{100 \%}$$

$$= 21.42 \text{ gr}$$

2. 21,42 gr natrium klorida dilarutkan dalam 2.520 ml Aquades dihomogenkan hingga larut sempurna.
3. Menyiapkan 28 erlenmeyer, setiap erlenmeyer di isi 90 ml PZ kemudian ditutup menggunakan kasa.
4. Mensterilisasi dengan autoclave pada suhu 121° C dalam waktu 15 menit.

B. Media *Lactose Broth* (LB I)

1. Melakukan perhitungan

$$\text{gr} = \frac{13 \times 10\text{ml} \times 168 \text{ tabung}}{1000}$$

$$= 36.4 \text{ gr}$$

2. 36,4 gr lactose broth dilarutkan dalam 1680 ml Aquadest
3. Menghomogenkan dan melarutkan di atas api spirtus hingga larut sempurna.
4. Jika sudah larut di suam- suam dan di pH $6.9 \pm 0,2$
5. Jika pH terlalu tinggi tambahkan HCl dan jika pH teralu rendah di tambahkan NaOH
6. Menyiapkan 168 tabung reaksi yang telah terisi oleh tabung durham, setiap tabung diisi 10 ml media LB I di homogenkan lalu di tutup dengan kasa.
7. Mensterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C dalam waktu 15 menit.

C. Media *Lactose Broth* (LB II)

1. Melakukan perhitungan

$$\text{gr} = \frac{26 \times 10\text{ml} \times 84 \text{ tabung}}{1000}$$

$$= 36,4 \text{ gr}$$

2. 36,4 gr lactose broth dilarutkan dalam 840 ml Aquadest
3. Menghomogenkan dan melarutkan di atas api spirtus hingga larut sempurna.
4. Jika sudah larut di suam- suam dan di pH $6.9 \pm 0,2$

5. Jika pH terlalu tinggi tambahkan HCl dan jika pH teralu rendah di tambahkan NaOH
6. Menyiapkan 84 tabung reaksi yang telah terisi oleh tabung durham, setiap tabung diisi 10 ml media LB II dihomogenkan lalu di tutup dengan kasa.
7. Mensterilisasi dengan autoclave pada suhu 121° C dalam waktu 15 menit.

D. Media *Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLB)

1. Melakukan perhitungan
$$\text{gr} = \frac{40 \times 10\text{ml} \times 252 \text{ tabung}}{1000}$$
$$= 168 \text{ gr}$$
2. 168gr BGLB dilarutkan dalam 2520 ml Aquadest
3. Menghomogenkan dan melarutkan di atas api spirtus hingga larut sempurna.
4. Jika sudah larut di suam- suam dan di pH 7,2 ± 0,2
5. Jika pH terlalu tinggi tambahkan HCl dan jika pH teralu rendah di tambahkan NaOH
6. Menyiapkan 252 tabung reaksi yang telah terisi oleh tabung durham, setiap tabung diisi 10 ml media BGLB dihomogenkan lalu di tutup dengan kasa.
7. Mensterilisasi di autoclave pada suhu 121° C dalam waktu 15 menit.

3.5.5 Prosedur pemeriksaan

A. Metode pemeriksaan

Penanaman dengan menggunakan ragam (3-3-3) yaitu 3 x 10 ml, 3 x 1 ml dan 3 x 0,1 ml, ragam ini digunakan untuk spesimen yang diperkirakan mengandung bakteri *Coliform* tinggi.

B. Penanganan sampel

Sampel di timbang 10 gr secara steril dengan menggunakan gelas arloji steril dan di dekat api spirtus yang menyala untuk mengindari kontaminasi, 10 gr sampel di masukkan dalam Erlenmeyer yang terisi 90 ml PZ steril lalu di homogenkan.

C. Prosedur pemeriksaan

1. Memipet sampel dengan menggunakan pipet ukur yang steril lalu dimasukkan kedalam
 - 3 tabung LB II @10 ml.
 - 3 tabung LB I @ 1 ml.
 - 3 tabung LB I @ 0,1 ml.
2. Kemudian di inkubasi pada inkubator suhu 37°C selama 24 sampai 48 jam.
3. Pada *Lactose Broth* yang menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya gas dalam tabung durham dilanjutkan penanaman pada media *Brilliant Green Bile Broth* dengan menggunakan ose steril 1 hingga 2 mata ose.
4. Penanaman ke dalam *Brilliant Green Bile Broth* disesuaikan dengan jumlah tabung yang positif dari masing- masing seri *Lactose Broth*.

5. Setelah ditanam pada *Brilliant Green Bile Broth* , di inkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37 °C.
6. Setelah diinkubasi maka dicatat *Brilliant Green Bile Broth* yang menunjukkan gas positif dalam tabung durham, lalu jumlah tabung yang positif dari tiap-tiap seri dicocokkan pada tabel MPN *Coliform*.

3.6 Tabulasi Data

Tabel hasil pemeriksaan sambal penyetan yang dijual pedangang kaki lima di jalan Sutorejo Kecamatan Mulyorejo Surabaya sebagai berikut :

Tabel 3.1 Contoh tabel hasil pemeriksaan tes presumtif dan tes confirmatif MPN *Coliform* dari 28 sampel sambal penyetan

No	Kode sampel	Tes Presumtif LB			Hasil	Tes Confirmatif BGLB			Hasil MPN Tabel
		3 x 10 ml	3 x 1 ml	3 x 0,1 ml		3 x 10 ml	3 x 1 ml	3 x 0,1 ml	

Tabel 3.2 Contoh tabel hasil pemeriksaan MPN *Coliform* yang memenuhi dan tidak memenuhi (SNI) nomor 7388 tahun 2009.

No	Kode sampel	Hasil MPN Tabel	Hasil MPN Sesungguhnya	MS	TMS

3.7 Tehnik analisis data

Data yang sudah terkumpul kemudian disesuaikan dengan Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan nomor 7388 tahun 2009 selanjutnya di prosentasikan.

