

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian deskriptif untuk memperoleh gambaran secara obyektif tentang jumlah *Coliform* menggunakan metode *MOST PROBABLE NUMBER* (MPN) pada susu kedelai yang dijual pedagang kaki lima di wilayah Pogot Surabaya.

3.2 Populasi Dan Sampel

3.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah susu kedelai yang dijual pedagang kaki lima di wilayah Pogot Surabaya.

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah susu kedelai yang dijual pedagang kaki lima di wilayah Pogot Surabaya, sebanyak 16 sampel dari 4 pedagang kaki lima yang masing – masing diambil 4.

Besaran sampel dalam penelitian ini berjumlah 16 dan jumlah sampel ditentukan dengan rumus berikut:

$$\begin{aligned}n &= \frac{N}{1 + N (d)^2} \\n &= \frac{4}{1 + 4 (0.05)^2} \\n &= \frac{4}{1 + 0.01} \\n &= \frac{4}{1.01} \\n &= 3.9603 \\n &= 4\end{aligned}$$

(Kamila L.M, 2014).

Keterangan:

N : Jumlah Populasi

n : Jumlah Sampel

d : Tingkat Signifikan 5% (0.05)

Artinya pada masing – masing perlakuan yakni pada susu kedelai jumlah sampel yang harus diambil sebanyak 4 sampel, sehingga total sampel semuanya adalah 16 sampel.

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

3.3.1 Tempat Penelitian

Penelitian pada pemeriksaan sampel susu kedelai yang dijual pedagang kaki lima di wilayah Pogot Surabaya ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2017 sampai dengan bulan Mei 2018, sedangkan waktu pemeriksaan dilaksanakan pada bulan Juni 2018.

3.4 Variabel Penelitian Dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel penelitian adalah jumlah *Coliform* yang terdapat dalam susu kedelai yang dijual pedagang kaki lima di wilayah Pogot Surabaya.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

- a. Dihitung dengan menggunakan metode *MOST PROBABLE NUMBER* (MPN) adalah suatu metode untuk menghitung jumlah bakteri *Coliform* berdasarkan fermentasi laktosa, dan menghasilkan asam dan gas 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 adanya kondisi sanitasi pada minuman atau pada makanan.
- c. Susu kedelai yang diteliti adalah susu kedelai yang dijual dipinggir jalan atau yang dijual pedagang kaki lima yang berada di wilayah Pogot Surabaya.

3.5 Teknik Pengumpulan Data

Sampel yang dikumpulkan secara keseluruhan yang berjumlah 16 sampel dari 4 pedagang kaki lima, selanjutnya data diambil dari hasil pemeriksaan laboratorium dengan menggunakan metode *MOST PROBABLE NUMBER* (MPN) *Coliform*.

3.6 Tahap Penelitian

3.6.1 Prinsip Pemeriksaan

Dalam metode *MOST PROBABLE NUMBER* (MPN) digunakan medium laktosa cair didalam tabung reaksi yang dicampur dengan bahan dan diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu, dan hasil yang positif bisa dilihat dengan cara mengamati timbulnya kekeruhan, dan terbentuknya gas didalam tabung Durham. Sampel ditanam pada *Lactosa Broth* (LB) diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2 X 24 jam, dari hasil *Lactosa Broth* (LB) yang positif dipindahkan pada *Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLG). Kemudian dari hasil *Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLG) yang positif menunjukkan adanya bakteri *Coliform*.

3.6.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

Autoclave, Beaker Glass, Neraca triple beam, Kaki tiga, Kasa asbes, Kertas pH, Ose, Oven atau Inkubator, Petridisk, Pipet ukur 1 ml dan 10 ml, Pipet tetes, Push ball, Rak tabung, Tabung durham, Tabung reaksi, Api spiritus (Modul Bakteriologi 3, 2017).

3.6.3 Bahan Dan Reagen

Bahan: Susu Kedelai

Reagen: 1. *Lactosa Broth* (LB I dan LB II)

2. *Brilliant Green Lactosa Broth* (BGLB)

3.6.4 Pembuatan Media:

3.6.4.1 Media *Lactosa Broth* (LB I)

A. Komposisi dari media *Lactosa Broth* (LB I)

Bahan	<i>Lactosa Bouillon I (Single Strength Lactose Broth)</i>	Jumlah
Beef Extract		3 g
Peptone		5 g
Lactose		5 g
Aquades		1000 ml

Sumber: (Buku Pembuatan Media, 1996).

B. Ketentuan untuk membuat media LB I adalah :

13 g in 1 L, 13 in 1 L sama dengan 13 g dalam 1000 ml aquadest.

C. Prosedur pembuatan LB I dalam 450 ml :

- Menyiapkan alat dan bahan.
- Menimbang media LB I (45 tabung, 1 tabung 10 ml) $45 \times 10 = 450 @$ aquades.

Perhitungan : $\frac{13 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times 450 \text{ ml} = 5.85 \text{ gram.}$

- c) Melarutkan dengan aquades 450 ml di erlenmayer.
- d) Memanaskan dengan api bunsen sampai larut sempurna.
- e) Lalu di pH 6.9 ± 0.2 jika kurang asam tambahkan HCL 0.1 N dan jika kurang basa ditambahkan NaOH, 0.1 N.
- f) Mensterilkan menggunakan autoclave.
- g) Menuangkan media pada tabung dengan steril.
- h) Setelah itu, media disimpan ke dalam lemari pendingin agar tidak terjadi kontaminasi.
- i) Membersihkan alat dan bahan seperti semula (Modul Bakteriologi 3, 2017).

3.6.4.2 Media *Lactosa Broth* (LB II)

A. Komposisi dari media *Lactosa Broth* (LB II)

Bahan	Lactosa Bouillon II (<i>Double Strength Lactose Broth</i>)	Jumlah
Beef Extract		6 g
Peptone		10 g
Lactose		10 g
Aquades		1000 ml

Sumber: (Buku Pembuatan Media, 1996).

B. Ketentuan untuk membuat media LB II adalah :

26 g in 1 L, 26 in 1 L sama dengan 26 g dalam 1000 ml aquades.

C. Prosedur pembuatan LB II dalam 450 ml :

- a) Menyiapkan alat dan bahan.
- b) Menimbang media LB II (90 tabung, 1 tabung 5 ml) $90 \times 5 = 450 @$ aquades.

$$\text{Perhitungan : } \frac{26 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times 450 \text{ ml} = 11.7 \text{ gram.}$$

- c) Melarutkan dengan aquades 450 ml di erlenmayer.
- d) Memanaskan dengan api bunsen sampai larut sempurna.

- e) Lalu di pH 6.9 ± 0.2 jika kurang asam tambahkan HCL 0.1 N dan jika kurang basa ditambahkan NaOH, 0.1 N.
- f) Mensterilkan menggunakan autoclave.
- g) Menuangkan media pada tabung dengan steril.
- h) Setelah itu, media disimpan ke dalam lemari pendingin agar tidak terjadi kontaminasi.
- i) Membersihkan alat dan bahan seperti semula (Modul Bakteriologi 3, 2017).

3.6.4.3 Media *Brilliant Green Lactosa Broth* (BGLB)

A. Komposisi dari media *Brilliant Green Lactosa Broth* (BGLB)

Bahan	BGLB (<i>Brilliant Green Lactose Bile Broth</i>)	Jumlah
Peptone		10 g
Lactose		10 g
Aquades		500 ml
Oxgall(Dehidrate)		20 g
Aquades		200 ml

Sumber: (Buku Pembuatan Media, 1996).

B. Ketentuan untuk membuat media BGLB adalah :

40 g in 1 L, 40 in 1 L sama dengan 40 g dalam 1000 ml aquades.

C. Prosedur pembuatan BGLB dalam 700 ml :

- a) Menyiapkan alat dan bahan.
- b) Menimbang media BGLB (140 tabung, 1 tabung 10 ml) $140 \times 10 = 1400$ @ aquades.

$$\text{Perhitungan : } \frac{40 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times 1400 \text{ ml} = 56 \text{ gram.}$$

- c) Melarutkan dengan aquades 1400 ml di erlenmayer.
- d) Memanaskan dengan api bunsen sampai larut sempurna.

- e) Lalu di pH 6.9 ± 0.2 jika kurang asam tambahkan HCL 0.1 N dan jika kurang basa ditambahkan NaOH, 0.1 N.
- f) Mensterilkan menggunakan autoclave.
- g) Menuangkan media pada tabung dengan steril.
- h) Setelah itu, media disimpan ke dalam lemari pendingin agar tidak terjadi kontaminasi.
- i) Membersihkan alat dan bahan seperti semula (Modul Bakteriologi 3, 2017).

3.6.5 Prosedur Pemeriksaan MPN Sistem (5 – 1 – 1)

a. Metode Pemeriksaan

Penanaman dengan menggunakan sistem (5 – 1 – 1), yaitu 5 x 10 ml, 1 x 1 ml, dan 1 x 0.1 ml. Ragam ini digunakan untuk spesimen atau sampel yang diperkirakan mengandung bakteri *Coliform* rendah.

b. Prosedur Pemeriksaan

Hari pertama :

1. Disiapkan pipet ukur yang steril
2. Disiapkan 5 tabung LB II, tiap tabung di isi 10 ml sampel susu kedelai secara steril
3. Disiapkan 1 tabung LB I, di isi 1.0 ml sampel susu kedelai
4. Disiapkan 1 tabung LB I, di isi 0.1 ml sampel susu kedelai
5. Kemudian media LB I dan LB II yang sudah ditambah sampel diinkubasi dengan oven atau inkubator pada suhu 37°C selama 1 X 24 jam.

Hari kedua :

1. Dibaca media LB I dan LB II

2. Apabila didapatkan hasil positif (+) maka dari media LB I dan LB II dilanjutkan penanaman ke media BGLB dengan menggunakan ose steril 1 hingga 2 mata ose.
3. Penanaman ke media BGLB disesuaikan dengan jumlah tabung yang positif dari masing-masing seri LB.
4. Setelah ditanam ke media BGLB kemudian diinkubasi dengan oven atau inkubator pada suhu 37 °C selama 1 X 24 jam.

Hari ketiga :

1. Pembacaan hasil MPN dengan menggunakan sistem (5 – 1 – 1).
2. Catat hasil.

3.7 Tabulasi Data

Tabel hasil pemeriksaan susu kedelai yang dijual pedagang kaki lima di wilayah Pogot Surabaya sebagai berikut:

Tabel 3.1 Contoh tabel hasil pemeriksaan tes presumtif dan tes confirmatif *Most Probable Number (MPN) Coliform* dari 16 sampel susu kedelai.

No	Kode Sampel	Tes <i>presumtif</i> LB			Hasil	Tes <i>confirmatif</i> BGLB			Hasil MPN Index	Hasil Rata - rata	MS	TMS
		5 x 10 ml	1 x 1 ml	1 x 0.1 ml		5 x 10 ml	1 x 1 ml	1 x 0.1 ml				

Tabel 3.2 Contoh tabel hasil pemeriksaan *Most Probable Number (MPN) Coliform* yang memenuhi syarat dan tidak memenuhi syarat Standart Nasional Indonesia (SNI) 20/ml nomor: 7388 tahun 2009.

No	Kode Sampel	Hasil MPN Index	Hasil Rata - rata	Memenuhi Syarat (MS)	Tidak Memenuhi Syarat (TSM)

3.8 Teknik Analisis Data

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