

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah observasional analitik yaitu untuk mengetahui hubungan antara hygiene sanitasi jasaboga dengan kandungan bakteri *Escherechia coli*.

3.2 Populasi, Sampel dan Sampling

3.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah usaha jasaboga yang berada disekitar pelabuhan dan melayani pelabuhan serta telah terdaftar di Kantor Kesehatan Pelabuhan kelas 1 Surabaya yang keseluruhan berjumlah 32 unit.

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah usaha jasaboga yang telah terdaftar di Kantor Kesehatan Pelabuhan Kelas 1 Surabaya dan telah menjalani pemeriksaan uji kelaikan fisik untuk higiene sanitasi jasaboga. Dengan menggunakan purposive sampling, didapat sampel penelitian sebanyak 30 sampel. Prosedur pengambilan sampel sebagai berikut :

1. Melakukan observasi data usaha jasaboga pada Kantor Kesehatan Pelabuhan Kelas 1 Surabaya.
2. Mengelompokkan unit usaha jasaboga berdasarkan hasil uji kelaikan fisik untuk higiene sanitasi makanan jasaboga.

3. Usaha jasaboga dengan hasil uji kelaikan fisik baik sebanyak 12 unit, sedangkan usaha jasaboga dengan hasil uji kelaikan fisik sedang sebanyak 18 unit.
4. Usaha jasaboga yang telah ditetapkan sebagai sampel penelitian diminta kesediaannya untuk menjadi sampel penelitian dan diambil contoh makanan yang diproduksi untuk diperiksa kandungan bakteri *E.coli*.

3.3 Lokasi Dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

- Lokasi pengambilan sampel penelitian dilakukan di wilayah Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya.
- Lokasi pemeriksaan kandungan bakteri *E.coli* dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Surabaya, jalan Sutorejo No.59 Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari hingga bulan Juni 2012.

3.3.3 Waktu Pemeriksaan

Pemeriksaan kandungan bakteri *E.coli* pada makanan olahan jasaboga dilakukan pada bulan April 2012.

3.4 Variabel Penelitian dan Devinisi Oprasional Variabel

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel Bebas : Higiene Sanitasi Jasaboga

Variabel Terikat : Kandungan *E.coli*

3.4.2 Devinisi Oprasional Variabel

1. Hygiene sanitasi jasaboga dikelompokkan menjadi 2 yaitu :

- a) Baik : yaitu usaha jasaboga di wilayah pelabuhan Tanjung Perak yang telah menjalani uji kelaikan fisik untuk higiene sanitasi jasaboga yang dilakukan oleh Kantor Kesehatan Pelabuhan Kelas 1 Tanjung Perak dan masuk dalam kategori baik.
- b) Sedang : yaitu usaha jasaboga di wilayah pelabuhan Tanjung Perak yang telah menjalani uji kelaikan fisik untuk higiene sanitasi jasaboga yang dilakukan oleh Kantor Kesehatan Pelabuhan Kelas 1 Tanjung Perak dan masuk dalam kategori sedang.

2. Kandungan *E.coli* adalah hasil pemeriksaan bakteriologis pada sampel makanan produksi jasaboga yang kemudian dikelompokkan menjadi 2 :

- a) Memenuhi syarat : sesuai dengan ketentuan PERMENKES nomor 1096 tahun 2011 yang menyatakan bahwa Angka *E.coli* dalam makanan olahan harus 0/gr sampel.
- b) Tidak memenuhi syarat : tidak sesuai dengan ketetapan PERMENKES nomor 1096 tahun 2011 yang menyatakan Angka *E.coli* dalam makanan olahan harus 0/gr sampel. Angka *E.coli* dalam sampel >0/gr sampel.

3.5 Metode Pengumpulan Data

3.5.1 Data Higiene Sanitasi Jasaboga

Data tentang higiene sanitasi Jasaboga berupa uji kelaikan fisik, melihat dari arsip hasil kegiatan Kantor Kesehatan Pelabuhan Kelas 1 Surabaya pada tahun 2011. Observasi data dilakukan di Kantor Kesehatan Pelabuhan Kelas 1 Surabaya dengan langkah – langkah sebagai berikut :

1. Melakukan pengambilan data di Kantor Kesehatan Pelabuhan Kelas 1 jl. Perak Timur No. 514 – 516 Surabaya. Pengambilan data dilakukan atas ijin dari dr. Oenedo Gumerang, MPH M selaku Kepala Kantor Kesehatan Kelas 1.(Lampiran 1 : Surat Perijinan Pengambilan Data)
2. Data diambil dari arsip Bidang Sanitasi dan Pengendalian Resiko Lingkungan yang berupa laporan hasil kegiatan Uji Kelaikan Fisik Higiene Sanitasi Jasaboga yang dilakukan pada tahun 2011.
3. Jasaboga yang terdaftar dan telah menjalani Uji Kelaikan Fisik kemudian dikelompokkan berdasarkan kategori hasil uji kelaikan fisik, yaitu kategori baik dan sedang.

3.5.2 Data Kandungan *E.coli*

Data tentang kandungan bakteri *E.coli* didapatkan dari hasil pemeriksaan bakteriologi pada sampel makanan produksi jasaboga dengan menggunakan metode MPN *E.coli*. Pemeriksaan kandungan bakteri *E.coli* dilakukan di laboratorium mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Surabaya dengan langkah-langkah sebagai berikut :

3.5.2.1 Persiapan Sampel Makanan

Alat : Kantung plastik steril, label

Bahan : Makanan olahan (sayuran matang)

Prosedur :

- a. Melakukan pengambilan sampel secara acak sesuai dengan kriteria yang ditentukan (sayuran matang, masak kering atau tumis).
- b. Kemudian sampel dimasukkan ke dalam kantong plastik dan diberi label kemudian diproses di laboratorium.

3.5.2.2 Pemeriksaan Kandungan *E.coli*

1. Metode Pemeriksaan :

Metode MPN ragam 5.1.1 digunakan untuk menentukan kandungan bakteri *E.coli*. (Fardiaz,1993)

2. Prinsip Pemeriksaan :

Dalam metode MPN digunakan medium cair di dalam tabung reaksi, dimana perhitungan dilakukan berdasarkan jumlah tabung yang positif. Hasil positif menunjukkan bahwa medium ditumbuhi oleh mikroba setelah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu. Pengamatan tabung yang positif dapat dilihat dengan mengamati timbulnya kekeruhan, atau terbentuknya gas dalam tabung Durham untuk mikroba pembentuk gas.(Fardiaz,1993)

2. Alat :

Incubator, Autoclave, api spiritus/Bunsen, tabung Durham, tabung reaksi, ose bulat, cawan petry, Erlenmeyer, pipet ukur 10 ml dan 1 ml, gelas ukur 100 ml, beaker glass, neraca, blender, sendok plastic atau pengaduk.

3. Bahan Pemeriksaan :

Makanan olahan (sayuran matang)

Aquadest steril

4. Media Pemeriksaan :

1) LB II (*Laktose Broth*)

LB I (*Laktose Broth*)

Prosedur Pembuatan :

- a. Penimbangan media dilakukan sesuai dengan kebutuhan.

Komposisi :

$$\text{gr media LB II} = \frac{26}{1000} \times \text{volume aquadest}$$

$$\text{gr media LB I} = \frac{13}{1000} \times \text{volume aquadest}$$

- b. Media dimasukkan ke dalam beaker glass lalu dilarutkan dengan aquadest sebanyak volume yang dibutuhkan.
- c. Media yang telah dilarutkan, dipanaskan diatas api spiritus hingga larut sempurna. Ukur pH media, pH LB = 7,0. Jika

pHterlalu asam tambahkan NaOH 0,1 N dan jika terlalu basa tambahkan HCl 0,1 N.

- d. Media dituang dalam tabung reaksi sebanyak 10 ml tiap tabung, lalu masukkan tabung Durham. Bolak-balik tabung reaksi hingga tidak terdapat gelembung dalam tabung Durham.
- e. Tabung ditutup dengan kapas berlemak, bungkus dengan Koran dan ikat dengan tali.
- f. Steril menggunakan autoclave.(Suwarsono,1996)

2) BGLB (*Brilliant Green Laktose Blue*)

- a. Penimbangan media dilakukan sesuai kebutuhan.

$$\text{Komposisi : gr media} = \frac{40}{1000} \times \text{volume aquadest}$$

- b. Media dimasukkan ke dalam beaker glass kemudian dilarutkan dengan aquadest sebanyak yang dibutuhkan.
- c. Media yang telah larut dipanaskan di atas api spiritus hingga larut sempurna. Ukur pH media, pH BGLB = 7,1. Masukkan ke dalam tabung reaksi, lalu masukkan tabung Durham. Bolak-balik tabung reaksi hingga tidak ada gelembung udara dalam tabung Durham.
- d. Tabung ditutup dengan kapas berlemak. Bungkus dengan Koran dan ikat dengan tali. Steril menggunakan autoclave.(Suwarsono,1996)

3) EMB (*Eosin Methyline Blue*)

Prosedur Pembuatan :

- a. Media ditimbang sesuai dengan kebutuhan.

$$\text{Komposisi : gr media} = \frac{36}{1000} \times \text{volume aquadest}$$

- b. Media dilarutkan dengan aquadest sebanyak volume yang dibutuhkan dalam erlenmeyer.
- c. Kemudian dipanaskan di atas api spiritus hingga larut sempurna. Ukur pH dengan kertas pH. pH EMB = 7,2. Apabila terlalu asam dapat ditambahkan NaOH 0,1 N dan jika terlalu basa tambahkan NaCL 0,1 N.
- d. Media dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 10 ml tiap tabung. Tutup tabung dengan kapas berlemak, bungkus dengan koran dan ikat dengan tali.
- e. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C dalam 15 lube.
- f. Setelah proses steril selesai, media dituang ke dalam cawan petry steril. Diamkan hingga beku.(Pradhika,2008)

4) Simoni Citrat

Prosedur Pembuatan :

- a. Media ditimbang sesuai dengan kebutuhan

$$\text{Komposisi : gr media} = \frac{23}{1000} \times \text{volume aquadest}$$

- b. Kemudian dilarutkan dengan aquadest sebanyak yang dibutuhkan.
- c. Media yang telah larut dipanaskan diatas api spiritus hingga larut sempurna. Ukur pH media, pH Simoni Citrat = 6,8-7,0
- d. Media dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak 2,5 ml tiap tabung. Tutup dengan kapas berlemak, bungkus dengan Koran dan ikat dengan tali.
- e. Sterilisasi dilakukan menggunakan autoclave.
- f. Setelah sterilisasi selesai, tabung dimiringkan hingga terbentuk lereng dan tidak terbentuk dasar. Biarkan hingga beku. (Suwarsono, 1996)

5) Voges Proskauer dan Methyl Red

Prosedur Pembuatan :

- a. Penimbangan media dilakukan sesuai kebutuhan.

$$\text{gr Pepton} = \frac{0,5}{80} \times \text{volume aquadest}$$

$$\text{gr K}_2\text{HPO}_4 = \frac{0,5}{80} \times \text{volume aquadest}$$

$$\text{gr Glukosa} = \frac{0,5}{80} \times \text{volume aquadest}$$

- b. Media dimasukkan ke dalam beaker glass, larutkan dengan aquadest sebanyak yang dibutuhkan. Panaskan di atas api spiritus hingga larut sempurna.

- c. Ukur pH media, pH VP/MR = 7,1. Tuang ke dalam tabung reaksi sebanyak 2,5 ml tiap tabung. Tutup dengan kapas berlemak.
- d. Kemudian dibungkus dengan Koran dan ikat dengan tali, kemudian steril menggunakan autoclave.(Suwarsono,1996)

6) Indol

Prosedur :

- a. Penimbangan media dilakukan sesuai dengan kebutuhan.

$$\text{Komposisi : gr NaCl} = \frac{5}{1000} \times \text{volume aquadest}$$

$$\text{gr Peptone} = \frac{10}{1000} \times \text{volume aquadest}$$

- b. Media dimasukkan ke dalam beaker glass, larutkan dengan aquadest sebanyak yang dibutuhkan. Panaskan di atas api spiritus hingga larut sempurna.
- c. Ukur pH media dengan kertas pH, pH Indol = 7,0. Tuang ke dalam tabung reaksi sebanyak 2,5 ml tiap tabung.
- d. Ditutup dengan kapas berlemak. Bungkus dengan Koran dan ikat dengan tali, kemudian steril menggunakan autoclave.(Suwarsono,1996)

5. Prosedur Pemeriksaan

1. Hari Pertama

- a) Persiapan Sampel

Sampel makanan olahan (sayuran) ditimbang 10 gram tanpa kuah atau dengan sedikit kuah. Sampel kemudian dihaluskan dengan cara diblender lalu dimasukkan dalam 90 ml Pz steril.

b) Tes Pendugaan

Prosedur :

1. Sampel yang telah diencerkan dipipet dengan pipet ukur steril sebanyak 10 ml lalu masukkan ke dalam media LB II, 1 ml ke dalam LB I, dan 0,1 ml ke dalam LB I yang lain.
2. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
3. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya gas dalam tabung Durham.

2. Hari Kedua

Tes Penegasan

Prosedur :

1. Setelah inkubasi selama 24 jam dalam suhu 37°C, dilakukan pengamatan terhadap tabung Durham pada media LB II dan LB I. Catat jumlah tabung yang positif.
2. Larutan pada setiap tabung yang positif kemudian diambil sebanyak dua mata ose dan ditanamkan pada media BGLB.
3. Inkubasi 37°C selama 24 jam.

4. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya gas dalam tabung Durham.

3. Hari Ketiga

Uji Penguat Coliform

Terbentuknya gas dalam Lactose Broth atau BGLB tidak selalu menunjukkan jumlah bakteri coli karena mikroba lainnya mungkin juga ada yang dapat memfermentasi laktosa dengan membentuk gas. Oleh karena itu dilakukan uji penguat pada agar EMB. Pada EMB koloni *E.coli* berwarna *Methalic Sheen*.

Prosedur :

1. Lakukan pengamatan terhadap media BGLB, catat semua tabung yang positif.
2. Larutan dari tabung BGLB yang positif diambil sebanyak dua mata ose kemudian diinokulasikan pada media EMB.
3. Inkubasi 37°C selama 24 jam.

4. Hari Keempat

Uji IMVIC

IMVIC merupakan singkatan dari Indol, Methyl Red, Voges Proskouer, dan Simol Citrat. Uji IMVIC dilakukan untuk memastikan bahwa koloni yang ditumbuhkan pada media EMB adalah koloni *E.coli*.

Prosedur :

1. Koloni yang diduga *E.coli* kemudian ditanam pada media IMVIC.
2. Inkubasi 37°C selama 24 jam.

5. Hari Kelima

a) Uji Biokimia

Uji biokimia dilakukan terhadap media Voges proskouer, Methyl Red dan Indol yang sebelumnya telah ditanami mikroba dari koloni yang diduga *E.coli* dari media agar EMB.

1. Uji VP (*Voges Proskouer*)

Prosedur :

- a. Media VP yang telah ditumbuhi kuman diberi KOH 40 % sebanyak 3 tetes kemudian dikocok.
- b. Lalu ditambahkan 6 tetes α Naftol kemudian kocok.
- c. Hasil positif jika timbul warna merah pada media.

2. Uji MR (*Methyl Red*)

Prosedur :

- a. Media MR yang telah ditumbuhi kuman, ditambahkan 3-4 tetes reagen Methyl Red.
- b. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya cincin merah.

3. Uji Indol

Prosedur :

- a. Media Indol yang telah ditumbuhi kuman ditambahkan 2-3 tetes reagen Kovac.
 - b. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya cincin merah.
- b) Perhitungan Nilai MPN *E.coli*

Prosedur :

- a. Media BGLB yang menunjukkan hasil gas positif pada hari ketiga dan telah dipastikan positif *E.coli*, dicari nilai MPN pada tabel MPN atau dapat menggunakan rumus berikut :

$$MPN = \frac{\text{Jumlah Tabung Positif} \times 100}{\sqrt{\text{Jumlah Sampel Tabung (-)} \times \text{Jumlah Semua Sampel}}}$$

(Fardiaz,1993)

3.6 Tabulasi Data

Data yang telah diperoleh dari pemeriksaan kandungan bakteri *E.coli* pada sampel makanan olahan dan hasil uji kelayakan fisik kemudian ditabulasikan dalam tabel berikut :

Tabel 3.3 Kandungan *E.coli* Berdasarkan Higiene Sanitasi Jasaboga

Kode Sampel	Hasil Uji Kelaikan Fisik		Kandungan <i>E.coli</i>	
	Baik	Sedang	Per gr Sampel	Keterangan (MS/TMS)

Keterangan :

MS : Memenuhi Syarat Angka *E.coli* pada Makanan 0/gr sampel

TMS : Tidak Memenuhi Syarat, Angka *E.coli* pada Makanan >0/gr sampel

Berdasarkan keterangan yang diperoleh dari tabel di atas, kemudian dibuat table kontingensi berikut :

Tabel 3.4 Makanan Olahan Berdasarkan Higiene Sanitasi Jasaboga dan Kandungan Bakteri *E.coli*

Hasil Uji Kelaikan Fisik	Kandungan <i>E.coli</i>				Jumlah	
	MS		TMS			
	Σ	%	Σ	%	Σ	%
Baik						
Sedang						
Jumlah						

3.7 Metode Analisis Data

Untuk mengetahui hubungan antara higiene sanitasi jasaboga dengan kandungan *E.coli* pada sampel makanan yang diproduksi, data dianalisis dengan uji Chi-Square.