

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah Deskriptif yang bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya kandungan *Echerichia coli* pada Tahu Goreng yang di jual di daerah Suramadu.

3.2 Populasi, Sampel dan Sampling

3.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah semua tahu goreng yang dijual di daerah Suramadu di peroleh dengan jumlah populasi sebanyak 30 penjual.

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah sampel tahu goreng yang sejumlah sebanyak 30 dari penjual diambil secara random sampling, dimana setiap penjualnya mempunyai kesempatan yang sama untuk diambil sebagai sampel.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Lokasi pengambilan sampel berada di daerah Suramadu sedangkan tempat pemeriksaan sampel penelitian di lakukan di laboratorium BARISTAN (Balai Riset Dan Standarisasi Industri Surabaya). Jawa Timur. Jalan Ketintang Baru Gg. XVII No.144 Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

1. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari-juli 2013.
2. Pemeriksaan Sampel dilaksanakan pada bulan Mei 2013.

3.4 Variabel Penelitian dan Devinisi Operasional Variabel

3.4.1 Variabel Penelitian

3.4.2 Kandungan *Escherichia coli* pada tahu goreng.

Devinisi Operasional Variabel

Kandungan *Escherichia coli* adalah ditemukannya bakteri *Escherichia coli* dari hasil penelitian sampel tahu goreng dijual di daerah Suramadu maka ditentukan berdasarkan ada atau tidaknya kandungan *Escherichia coli* pada sampel tahu goreng, melalui pemeriksaan laboratorium yang dibedakan menjadi:

- a. Positif, (+) : apabila sampel hasil pemeriksaan mengandung bakteri *Escherichia coli*.
- b. Negatif, (-) : apabila sampel hasil pemeriksaan tidak mengandung bakteri *Escherichia coli*.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah kandungan bakteri *Escherichia coli* pada tahu goreng yang di peroleh melalui observasi langsung.

Cara atau metode yang digunakan untuk memperoleh data pemeriksaan kandungan *Escherichia coli* pada tahu goreng adalah melalui uji laboratorium. Tahap-tahap pemeriksaan yaitu:

3.5.1 Persiapan Sampel atau Sampel Uji (tahu goreng)

1. Bahan : tahu goreng
2. Alat : kantong plastik

Prosedur pengambilan sampel:

1. Sampel diambil dari penjual tahu goreng yang di jual di daerah Suramadu.
2. Mengambil sampel sebanyak 30.
3. Sampel di masukkan dalam kantong plastik steril yang sudah ada labelnya (kode sampel/nomer).
4. Kemudian mengacak sejumlah sampel dari 30 penjual tahu goreng dan mengambil sebanyak 30 penjual tahu goreng.
5. Sampel siap dibawa dan diperiksa di laboratorium BARISTAN.

3.5.2 Pemeriksaan bakteri *Echerichia coli* pada tahu goreng dilakukan dilaboratorium Baristan.

A. Metode Pemeriksaan

MPN(Most Probable Number)

B. Prinsip Pemeriksaan

Pertumbuhan *Echerichia coli* yang ditandai oleh terbentuknya gas di dalam tabung Durham setelah diinkubasi dalam perbenihan sesuai pada suhu 44°C selama 24–48 jam, yang akan di lanjutkan dengan uji biokimia.

C. Alat

1. Alat homogenesial (blender)
2. Penangas air 44–45°C
3. Inkubator $36 \pm 1^\circ\text{C}$
4. Pipet ukur 1 ml dan 10 ml
5. Sengkelit (ose)

6. Labu erlenmeyer
7. Tabung reaksi (150 x 15 mm)
8. Tabung Durham (75 x 10 mm)
9. Cawan petri
10. Mikroskop

D. Bahan

Tahu Goreng

E. Media

1. *Echerichia Coli Broth*
2. *Mac Conkey Broth*
3. *Eosin Methylene Blue (EMB)*
4. *Methyl Red (MR)* dan *Voges proskauer (VP)*
5. *Trypton Broth*
6. *Simmons Citrate Agar*
7. *Nutrient Agar*
8. Pereaksi *Kovac*
9. Larutan *Methyl Red*
10. Pereaksi *Voges Proskauer*
11. Pereaksi untuk pewarnaan Gram
12. Pereaksi *Indole*
13. Larutan *alfa-naftol*
14. Larutan kalium hidroksida (KOH) 40%
15. *Koser's Citrat Medium*

F. Cara Kerja

- a. Memasukan 1 strain biakan bakteri yang positif gas pada Lactose Broth dari pengujian Most Probable Number (MPN) bakteri coliform ke dalam tabung yang berisi *Echerichia Coli Broth* yang di dalamnya terdapat tabung Durham terbalik.
- b. Inkubasi dalam penangas air pada suhu 44 – 45°C selama 24 – 48 jam.
- c. Catat tabung yang di dalamnya terbentuk gas. (*Echerichia Coli* dianggap positif jika di dalam tabung terbentuk gas).
- d. Kemudian dilanjutkan ke pemeriksaan *Echerichia Coli* dengan menginokulasi biakan yang membentuk gas ke penanaman pada media EMB dalam cawan petri atau plate.
- e. Diinkubasi pada suhu 35°C selama 18 – 24 jam.
- f. Memilih koloni yang berdiameter 0,5 mm yang berwarna hitam methalic (mengkilat seperti logam) pada EMB sedangkan pada Mac conkey koloni berwarna merah tidak mengkilat lalu di inokulasikan (penanaman dengan cara strain lereng miring pada tabung) di Nutrient Agar setelah itu di inkubasi pada suhu 35°C selama 18 – 24 jam, dan pada waktu yang sama di lakukan pewarnaan Gram sebagai berikut:
 - Membuat preparat dengan cara melingkar yang berdiameter 2 – 3 cm.
 - Fiksasi diatas api spirtus sampai kering.
 - Genangi dengan Gentian violet selama 3 menit, di bilas dengan air kran yang mengalir.
 - Lalu genangi dengan Lugol selama 2 menit tanpa dibilas dengan air yang mengalir.

- Pada sedian preparat genangi Alkohol 95% hingga jernih selama 30 detik, bilas dengan air yang mengalir.
 - Genangi dengan Air Fuchsin (larutan safranin) selama 2 menit lalu bilas dengan air mengalir.
 - Kemudian keringkan dengan kertas saring atau tissue dan periksa dibawah Mikroskop.
- g. Lakukan pengujian IMViC (indol, methyl red, voges proskauer dan sitrat) dari biakan Nutrient Agar pada koloni yang di media EMB. (BARISTAN, 2013)

G. Pengucian IMViC

a. Uji Indol (Air Pepton)

Dari biaka murni Nutrient Agar di ambil 1 mata ose biakan ke dalam trypton broth lalu di inkubasi pada suhu $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$, selama 18 – 24 jam. Kemudian di tambahkan reagen Kovac tetes demi tetes 0,2 – 0,3 ml sampai membentuk warna cincin merah jika hasil positif dan jika terbentuk warna jingga menunjukkan hasil reaksi indol negatif.

Fungsi Indol untuk kemampuan bakteri dalam memecah asam amino trhiptophan menjadi indol dengan bantuan enzim triptophanase.

b. Uji Methyl Red (MR)

Dari biakan murni nutrient agar diambil 1 mata ose biakan ke dalam perbenihan methyl red. Inkubasi pada suhu 35°C selama 48 jam. Kemudian tambahkan 1– 2 tetes methyl red. Warna kuning menunjukkan reaksi negatif sedangkan warna merah (cincin merah) menunjukkan reaksi positif.

Fungsi methyl red untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan asam campur.

c. Uji Voges Proskauer (VP)

Dari biakan murni nutrient agar diambil 1 mata ose biakan ke dalam perbenihan voges proskauer. Inkubasi pada suhu $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 48 jam. Dengan menggunakan pipet, pindahkan 1 ml suspensi kuman dalam tabung, tambahkan 0,6 ml larutan alfa – naftol dan 0,2 ml larutan KOH 40% lalu di kocok, diamkan selama 1 – 2 jam. Jika terbentuk warna cincin merah menunjukkan reaksi positif dan jika warna tidak berubah atau tidak terjadi apa-apa menunjukkan reaksi negatif.

Fungsi voges proskauer untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan acetyl methyl carbinol.

d. Uji Simmons Citrat

Dari biakan murni nutrient agar diambil 1 mata ose biakan ke dalam perbenihan Simmons Citrat. Inkubasi pada suhu 35°C selama 48 – 96 jam. Jika terbentuk perubahan warna dari hijau menjadi biru prusian menunjukkan reaksi positif dan jika tidak terjadi perubahan warna maka menunjukkan reaksi negatif (pada perbenihan simmons citrat) dan adanya kekeruhan pada perbenihan Koser's citrat menunjukkan reaksi positif.

Fungsi simmons citrat untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menggunakan citrat sebagai karbon tunggal /sebagai hidrat arang.

e. Uji Urea

Jika terjadi perubahan warna dari orange menjadi merah muda menunjukkan hasil positif sedangkan jika negatif tidak terjadi perubahan warna.

Fungsi Urea untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghidrolise urea menjadi NH_3 dan CO_2 .

f. Uji Semi Solid

Jika terbentuk kabut di sekitar lereng tusukan menunjukkan reaksi positif sedangkan tidak terbentuk kabut di sekitar lereng tusukan maka reaksi negatif.

Fungsi semi solid untuk mengetahui pergerakan kuman.

g. Uji TSIA (Triple Sugar Iron Agar)

Fungsi TSIA untuk mengetahui atau mengidentifikasi Enterobacteriaceae berdasarkan 3 macam gula-gula serta memproduksi H_2S .

h. Uji Gula – gula

- Positif Gas : terbentuk perubahan warna dari biru menjadi warna kuning dan di dalam tabung durham terbentuk gelembung udara (gas).
- Positif : terbentuk perubahan warna dari biru menjadi kuning.
- Negatif : tidak terjadi perubahan warna pada media (warna tetap).

Fungsi Gula – gula untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menfermentasikan karbohidrat dalam (suasana asam) dan memproduksi gas.

(Baristan, 2013)

H. Hasil dinyatakan sebagai berikut:

- I. Amati terbentuk tidaknya gas dalam tabung Durham. Jika terbentuk gas dapat dinyatakan Angka Paling Mungkin (APM) *Escherichia coli*.
- II. Tegaskan hasil uji pewarnaan Gram dan reaksi biokimia. Jika pewarnaan Gram menunjukkan adanya bakteri berbentuk batang yang warna muda (Gram negatif) serta reaksi biokimia menunjukkan uji indol , methyl red , voges proskauer ,uji citrat negatif maka dapat dinyatakan penegasan adanya *Escherichia coli*.

Sifat – sifat bakteri Coliform dengan Uji IMViC

Indol	Methyl Red	Voges proskauer	Citrat	Type
+	+	–	–	<i>Typical Escherichia coli</i>
–	+	–	–	<i>Atypical Escherichia coli</i>
+	+	–	+	<i>Typical Intermediate</i>
–	+	–	+	<i>Atypical Intermediate</i>
–	–	+	+	<i>Typical Escherichia aerogenes</i>
+	–	+	+	<i>Atypical Escherichia aerogenes</i>

3.7.4 Tabulasi Data

Data yang di peroleh ditabulasikan sebagai berikut:

Tabel 3.2 Tabulasi Data Penelitian Hasil Pemeriksaan Kandungan *Echerichia coli* Pada Tahu Goreng.

No	Kode sampel	Hasil kandungan <i>Echerichia coli</i>	Hasil (+) atau (-)
1			
2			
3			
4			
5			
-			
30			

3.8 Metode Analisa Data

Data yang telah di peroleh dari hasil penelitian dikelompokkan dan dianalisa data kemudian ditabulasikan secara deskriptif yang hasil pemeriksaan dengan menghitung prosentase positif atau negatif kandungan *Echerichia coli* pada tahu goreng.