

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis atau Rancangan Penelitian

Menggunakan metode deskriptif. karena peneliti hanya ingin mendeskripsikan atau menggambarkan kualitas minuman legen yang dijual di Daerah Tuban berdasarkan keberadaan cemaran bakteri *Escherichia coli*.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi

Semua minuman legen yang dijual di Daerah Tuban Kecamatan Manunggal dan Panyuran .

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah 30 minuman legen yang dijual di Daerah Tuban Kecamatan Manunggal dan Panyuran.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Surabaya. Pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Teknologi Laboratorium Medis Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya, Jalan Sutorejo No. 59 Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan dari bulan Desember 2022 hingga akhir bulan Juni 2023, sedangkan waktu pemeriksaan dilakukan pada bulan Mei 2023.

3.4 Variabel dan Definisi Operasional Variabel

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini adalah ada tidaknya kontaminasi bakteri *Escherichia coli* pada minuman legen yang dijual di Daerah Tuban Kecamatan Manunggal dan Payuran.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

Bakteri *Escherichia coli* adalah bakteri yang akan dicari keberadaannya pada minuman legen, yang ditumbuhkan pada media MC dan EMB dengan ciri – ciri koloni pada masing – masing media MC : adanya koloni bulat berwarna pink dan media akan berwarna merah muda karena bakteri dapat memfermentasi laktosa menjadi asam dengan adanya indikator neutral red. Pada media EMB : adanya koloni bakteri berwarna hijau metalik pada media.

3.5 Teknik Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan dengan uji laboratorium Identifikasi Bakteri *Escherichia coli* pada minuman legen yang dijual di daerah Tuban melalui beberapa tahapan sebagai berikut :

3.6 Prosedur

3.6.3 Cara Sterilisasi Alat Menggunakan *Autoclave*

1. Membuka tutup *autoclave* dan kemudian mengeluarkan sarangan dari dalam *autoclave*.
2. Menambahkan (aquadest) sampai batas yang ditentukan.

3. Kemudian menambahkan sedikit air untuk membasahi sarangan.
4. Lalu memasukan sarangan kedalam *autoclave*.
5. Memasukan media (MC, NB dan EMB) atau alat (erlenmayer, petri dish, dan tabung gendut) yang telah dibungkus menggunakan koran (dengan cara memotong koran menjadi empat bagian kemudian ambil satu koran dan masukan tiga petri dish dan bungkus dengan melipat dua bagian ke atas lalu lipat ke dua ujung koran kebawah). Kemudian sterilkan dengan *autoclave*.
6. Menutup *autoclave* dengan cara mengencangkan skrup penutup secara berlawanan dengan memutarnya searah jarum jam.
7. Kemudian membuka katup uap sambil menyalakan kompor dengan api sedang.
8. Menunggu sampai suara mendesis pada katup uap dan tutup katup uap.
9. Menunggu suhu hingga mencapai 121°C.
10. Jika suhu melebihi 121°C maka harus distabilkan terlebih dahulu dengan cara membuka katup uap secara perlahan hingga suhu stabil mencapai angka 121°C selama 15 menit.
11. Kemudian matikan kompor.
12. Membuka katup uap hingga suhu turun menjadi 0°C
13. Jika suhu sudah turun dan dingin atau tidak ada panas pada *autoclave* maka buka sekrup pada *autoclave* dengan cara silang.

14. Setelah itu mengeluarkan media (MC, NB, dan EMB) dan alat – alat (petri dish, erlenmayer, dan tabung gendut) yang telah disteril.

3.6.4 Pembuatan Media Pemupuk *Bouillon/ Nutrient Broth*

1. Menyiapkan alat (petri dish, Erlenmayer, pengaduk, kertas pH, gelas ukur, timbangan digital, kaca arloji, Bunsen, pipet tetes, kasa abses, kapas, kassa, kaki tiga, korek api) dan bahan (media *Nutriet Broth*, Larutan NaOH 0,1 N, Larutan HCL 0,1 N, *Aquadest*) dan membersihkan semua alat yang akan digunakan.
2. Melakukan perhitungan untuk semua tabung yang akan dibuat.

$$35 \times 3 = 105 \text{ mL (Aquadest)}$$

$$\frac{8,0 \times 105}{1000} = 0,84 \text{ gram (pH : 7,2)}$$
3. Melakukan penimbangan untuk setiap bahan dengan neraca digital.
4. Memindahkan media dari gelas arloji ke beaker glass.
5. Melarutkan dengan aquadest.
6. Memanaskan atau mendidihkan di atas api spirtus sampai benar – benar homogen dan larut dengan sempurna.
7. Mengangkat beaker glass dan kemudian di suam – suam.
8. Mengukur uji pH menggunakan pH media (apabila pH terlalu asam tambah dengan NaOH, apabila terlalu basa tambah dengan HCL).
9. Setelah itu menutup media dengan kapas kasa dan melabeli setiap media dengan kode sampel.

10. Melakukan sterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada tekanan 1 atm pada suhu 121 °C selama \pm 15 menit.
11. Meletakkan pada rak tabung dengan posisi tegak.
12. Media siap untuk digunakan atau disimpan.

3.6.6 Pembuatan Media *Mac Conkey (MC)*

1. Menyiapkan alat (petri dish, Erlenmayer, pengaduk, kertas pH, gelas ukur, timbangan digital, kaca arloji, bunsen, pipet tetes, kasa asbes, kaki tiga, korek api) dan bahan (media MC, Larutan NaOH 0,1 N, Larutan HCL 0,1 N, *Aquadest*). Dan membersihkan semua alat yang akan digunakan.
2. Melakukan perhitungan media MC sesuai jumlah petri yang akan dibuat.

$$35 \times 20 = 700 \text{ mL (Aquadest)}$$

$$\frac{50,0 \times 700}{1000} = 35 \text{ gram (pH : 7,3)}$$
3. Melakukan penimbangan media dengan neraca digital.
4. Memindahkan media dari gelas arloji ke Erlenmeyer.
5. Melarutkan kedalam Erlenmayer menggunakan aquadest sesuai volume yang akan dibuat (telah diukur dengan gelas ukur).
6. Memanaskan atau mendidihkan di atas api spirtus sampai benar – benar homogen atau larut sempurna.
7. Mengangkat Erlenmeyer dan di suam – suam.
8. Melakukan uji pH menggunakan pH media (apabila pH terlalu asam tambah dengan NaOH, apabila terlalu basa tambah HCL).

9. Jika pH sudah sesuai, menutup Erlenmayer dengan kapas kasa dan memberi label (identitas).
10. Melakukan sterilisasi menggunakan *autoclave* pada tekanan 1 atm pada suhu 121 °C selama \pm 15 menit.
11. Menuang media dari Erlenmeyer ke Petri dengan volume 15 – 20 mL. meratakan media dengan membentuk pola angka delapan secara perlahan.
12. Menunggu sampai media memadat.
13. Media siap dipakai.

3.6.7 Pembuatan Media *Eosin Methylen Blue (EMB)*

1. Menyiapkan alat (petri dish, erlenmayer, beaker glass, pengaduk, kertas pH, gelas ukur, timbangan digital, kaca arloji, Bunsen, pipet tetes, kasa abses, kaki tiga, korek api) dan bahan (media EMB, Larutan NaOH 0,1 N, Larutan HCL 0,1 N, Aquadest). Dan membersihkan alat yang akan digunakan.
2. Melakukan perhitungan media EMB sesuai dengan jumlah Petri yang akan dibuat.

$$35 \times 20 = 700 \text{ mL (Aquadest)}$$

$$\frac{35,96 \times 700}{1000} = 25,2 \text{ gram (pH : 7,4)}$$

3. Melakukan penimbangan media dengan neraca digital.
4. Memindahkan media dari gelas arloji ke Erlenmeyer.
5. Melarutkan dengan aquadest sesuai volume yang akan dibuat (telah diukur dengan gelas ukur).

6. Memanaskan atau mendidihkan di atas api spiritus sampai benar – benar homogen dan larut sempurna.
7. Mengangkat Erlenmeyer dan suam – suam.
8. Melakukan uji pH menggunakan pH media (apabila pH terlalu asam tambah NaOH, apabila terlalu basa tambah HCL).
9. Jika pH sudah sesuai, menutup Erlenmayer dengan kapas kasa dan memberi label (identitas).
10. Melakukan sterilisasi dengan menggunakan autoklave pada tekanan 1 atm pada suhu 121°C selama ± 15 menit.
11. Menuang media dari Erlenmeyer ke Petri dengan volume 15 – 20 mL. meratakan dengan membentuk pola angka delapan secara perlahan.
12. Menunggu media sampai padat.
13. Media siap dipakai.

3.6.8 Prosedur Pewarnaan Gram

1. Menyiapkan alat (Objek glass, ose bulat, api spiritus, jembatan pewarnaan, pz steril, pewarna gram mikroskop, oil immersion) dan bahan (koloni pada media MC).
2. Membersihkan kaca objek dengan alkohol agar bebas lemak, atau dengan memfiksasi di atas nyala api bunsen.
3. Memijarkan ose hingga membara dan dinginkan.
4. Karena bakteri yang akan diperiksa terdapat pada medium padat (media agar), maka meneteskan Pz steril atau Nacl terlebih dahulu dengan ose bulat.

5. Membuat sediaan preparat dengan cara melingkar diatas objek glass dengan diameter 2x3cm.
6. Mengeringkan preparat dan melakukan fiksasi, mengeringkan preparate dilakukan dengan mengangin – anginkan pada suhu ruang.
7. Memfiksasi preparate dilakukan dengan cara melewati prepat di atas nyala api bunsen sebanyak 3 kali.
8. Meletakkan preparat pada jembatan pewarnaan.
9. Menggenangi preparat dengan Kristal Violet 0,5% dan tunggu selama 1 menit.
10. Membilas preparat dengan air mengalir.
11. Kemudian genangi preparat dengan Lugol selama 1 menit, buang Lugol yang menggenangi preparat.
12. Membilas preparate dengan air mengalir
13. Menggenangi preparat dengan Alkohol 70%, biarkan selama 10 – 30 detik.
14. Membilas preparat dengan air mengalir.
15. Menggenangi preparat dengan Carbol Fuchsin 0,5% selama 1 menit.
16. Membilas preparat dengan air mengalir.
17. Mengeringkan preparat dan mengamati dibawah mikroskop menggunakan Oil Imersion pada perbesaran 100X.

3.6.9 Persiapan Sampel Uji

1. Legen diperoleh dari penjual legem yang ada di Daerah Tuban.

2. Pengumpulan sampel uji dilakukan dengan membeli minuman legen pada 30 penjual, kemudian dituang pada botol coklat kaca , pada saat penuangan dilakukan tepat didepan nyala api lilin agar sampel tetap steril dan pada tutup botol dilakuakn swab menggunakan kapas alkohol.
3. Legen dibawa menggunakan botol coklat kaca steril yang diletakan pada ice box supaya legen tetap dalam keadaan dingin.

3.7 Prosedur Pemeriksaan Sampel

1. Hari pertama pemeriksaan :

- a. Menyalakan api spirtus dengan korek api.
- b. Memberi masing – masing tabung yang berisi media bouillon broth dengan label sesuai dengan kode sampel yang akan dimasukan.
- c. Memipet 1 ml sampel legen menggunakan spuit 1cc untuk ditanam kedalam media bouillon broth dan inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.

2. Hari kedua pemeriksaan :

- a. Menyalakan api spirtus dengan korek api.
- b. Memberi masing – masing label pada media MC sesuai dengan kode sampel yang akan diinokulasi dari media bouillon broth.
- c. Memijarkan ose bulat pada api spirtus sampai membara.
- d. Mengambil sampel pada tabung media bouillon broth dengan menggunakan ose bulat yang sudah dingin.

- e. Lalu mengambil plate yang berisi media MC, plate dibuka dengan posisi $\pm 22^\circ$ dan mulai streaking pada media menggunakan metode T digunakan dari sampel media cair ke inokulasi media padat .
- f. Media yang sudah ditanami sampel, kemudian meletakkan pada inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C .

3. Hari ketiga pemeriksaan :

- a. Mengambil media MC yang telah diinokulasi kuman selama 24 jam dengan suhu 37°C dalam inkubator.
- b. Mengamati morfologi koloni pada media MC, bentuk koloni : bulat, tepian : rata, elevasi : cembung, tekstur : tidak rata, warna koloni : pink, fermentasi laktosa.
- c. Kemudian melakukan pewarnaan pada koloni media berwarna pink dengan pewarnaan gram. Untuk mengetahui morfologi bakteri batang berwarna merah (Gram -), kemudian dilanjutkan inokulasi pada media EMB.
- d. Memijarkan ose bulat pada api spirtus sampai membara.
 - a. Mengambil 1 mata ose bulat yang sudah dingin dari stau koloni kuman, kemudian streaking dengan metode Y digunakan pada sampel dari media padat ke inokulasi media padat inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C .

4. Hari keempat pemeriksaan :

- a. Mengambil media EMB yang telah diinokulasi kuman selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator.

- b. Mengamati morfologi koloni pada media EMB koloni berwarna hijau metalik, besar, smooth, permukaan cembung dan mengkilat.
- c. Setelah diamati hasil penanaman koloni pada media MC dan EMB dicatat pada tabel yang telah dibuat.

3.8 Tabulasi Data

Data yang diperoleh dari hasil identifikasi bakteri *Escherichia coli* pada sampel legen kemudian ditabulasikan dalam bentuk tabel, sehingga diperoleh pada tabel 3.1

Tabel 3.1 Hasil identifikasi bakteri *Escherichia coli* pada sampel legen

No	Kode Sampel	Jenis Pemeriksaan Koloni Media MC	Hasil Pewarnaan Gram		Hasil Pemeriksaan Koloni Media EMB	Keterangan
			Positif	Negatif		

3.9 Teknik Analisa Data

Dalam penelitian ini adalah jenis penelitian deskriptif yang menggunakan persentase analisis uji mikrobiologi sampel minuman legen yang dijual di Daerah Tuban, kemudian di analisa dan ditabulasikan pertumbuhannya lalu di sajikan dalam bentuk diagram.

