

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian deskriptif dengan desain penelitian secara observasional, yaitu menggali data tentang keamanan pangan (total cemaran mikroba, kandungan *Escherichia coli* dan kandungan siklamat) minuman es campur di wilayah Pujasera Dempo Kota Malang.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni 2019 yang bertempat di:

1. 3 penjual yang terdapat di Pujasera Dempo untuk pengambilan sampel minuman jajanan berupa es campur.
2. Laboratorium Kualitas Air Perum Jasa Tirta untuk analisis kuantitatif total cemaran mikroba dengan metode TPC (*Total Plate Count*) dan analisis kuantitatif kandungan *Escherichia coli* dengan metode MPN (*Most Probable Number*).
3. Laboratorium Kimia Akafarma Putra Indonesia Malang untuk analisis kualitatif (metode pengendapan) dan kuantitatif (metode spektrofotometri) kandungan siklamat.

C. Alat dan Bahan

1. Uji Kuantitatif Total Cemaran Mikroba

a. Alat

- | | |
|--------------------------|----------------------------------|
| 1) Pinset | 9) Pipet volume 1 ml |
| 2) Erlenmeyer | 10) Autoklaf |
| 3) Mortar | 11) Inkubator |
| 4) Tabung reaksi | 12) Timbangan <i>triple beam</i> |
| 5) Rak tabung reaksi | 13) Panci |
| 6) Pembakar bunsen | 14) Rak tabung reaksi |
| 7) Cawan petri | 15) <i>Beaker glass</i> |
| 8) <i>Colony counter</i> | |

b. Bahan

- 1) Sampel (es campur)
- 2) Media *Plate Count Agar* (PCA)
- 3) Aquades
- 4) Alkohol

2. Uji Kualitatif Kandungan *Escherichia coli*

a. Alat

- | | |
|---|--------------------------------|
| 1) 5 tabung reaksi berisi tabung durham dan 10 ml <i>Lactose Broth Double</i> (LBD) | 4) Pipet 10 ml steril |
| 2) 10 tabung reaksi berisi tabung durham dan 5 ml <i>Lactosa Broth Single</i> (LBS) | 5) Pipet 1 ml steril |
| 3) Tabung reaksi berisi <i>Brilliant Green Lactose Bile Broth</i> (BGLB) | 6) Pembakar bunsen |
| | 7) Inkubator 35 °C dan 44,5 °C |
| | 8) Cawan petri |
| | 9) Tabung medium Na miring |
| | 10) Gelas objek |
| | 11) Jarum ose |
| | 12) Rak tabung reaksi |

b. Bahan

- 1) Sampel (es campur)
- 2) Media *Lactose Broth Double* (LBD)
- 3) Media *Lactose Broth Single* (LBS)
- 4) Media *Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLB)
- 5) Media *Eosin Methylene Blue* (EMB)
- 6) Reagen pengecatan gram
- 7) Reagen pengecatan spora

3. Uji Kualitatif dan Kuantitatif Kandungan Siklamat

a. Alat

- | | |
|----------------------|------------------------|
| 1) Pipet ukur | 6) <i>Beaker glass</i> |
| 2) Labu ukur | 7) Mikropipet |
| 3) Tabung reaksi | 8) Neraca analitik |
| 4) Rak tabung reaksi | 9) Spektrofotometri |
| 5) Pengaduk kaca | 10) Kuvet |

- b. Bahan
 - 1) Sampel (es campur)
 - 2) Larutan BaCl 10%
 - 3) Larutan NaNO₃ 10%
 - 4) HCL 10%
 - 5) Aquades

D. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah pedagang minuman jajanan es campur yang berada di Pujasera Dempo Kota Malang dengan karakteristik pedagang berjualan di pinggir jalan.

2. Sampel

Menurut Notoadmodjo (2010) sampel adalah sebagian yang diambil dari keseluruhan objek yang diteliti dan dianggap mewakili seluruh populasi. Dari seluruh pedagang es campur yang terdapat di Pujasera Dempo sampel yang diambil sebagai objek penelitian adalah 3 penjual es campur di wilayah Pujasera Dempo.

3. Teknik Sampling

Pengambilan sampel dalam penelitian ini menggunakan teknik *Simple Random Sampling*, yaitu objek memiliki peluang yang sama untuk terpilih sebagai sampel penelitian (Swarjana, 2015). Karakteristik pengambilan sampel:

- a. Pedagang kaki lima yang berjualan di pinggir jalan.
- b. Pedagang menggunakan es balok dalam berjualan es campur.
- c. Pedagang yang dicurigai memiliki higiene dan sanitasi yang rendah dalam proses pengolahan minuman jajanan es campur.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pedagang minuman jajanan es campur di wilayah Pujasera Dempo Kota Malang.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah total cemaran mikroba, kandungan *Escherichia coli* dan kandungan siklamat.

F. Definisi Operasional Variabel

Tabel 2. Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Total cemaran mikroba	Total koloni mikroba yang terdapat dalam minuman jajanan es campur	Uji Kuantitatif dengan metode TPC (<i>Total Plate Count</i>)	Aman, apabila total cemaran mikroba tidak melebihi batas maksimum yang ditentukan, yaitu 1×10^5 koloni/ml	Rasio
Kandungan <i>Escherichia coli</i>	Jumlah APM/MPN <i>Escherichia coli</i> yang terdapat dalam minuman jajanan es campur	Uji Kualitatif dengan metode MPN (<i>Most Probable Number</i>)	Aman, apabila kandungan <i>Escherichia coli</i> <3/ml	Ordinal
Kandungan siklamat	Bahan tambahan pangan (pemanis) yang terdapat dalam minuman jajanan es campur	Uji kualitatif dengan metode pengendapan dan uji kuantitatif dengan metode spektrofotometri	Terdeteksi apabila terdapat endapan putih pada sampel dan aman apabila tidak melebihi batas maksimum yang ditentukan, yaitu 250 mg/kg	Rasio

G. Instrumen Penelitian

1. Instrumen Uji Kuantitatif Total Cemaran Mikroba

Instrumen uji kuantitatif total cemaran mikroba menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*). Metode TPC atau hitung cawan, diperlukan pengenceran terhadap sampel sebelum ditumbuhkan dalam

cawan petri berisi media agar (PCA). Pengenceran dilakukan dengan perbandingan 1:10, 1:100, 1:1000 dan 1:10000. Selanjutnya dilakukan pemupukan dengan metode tuang (*pour plate*), yaitu sejumlah contoh 1 ml dari pengenceran yang dikehendaki dimasukkan ke dalam cawan petri, kemudian ditambahkan agar (PCA) cair steril yang telah didinginkan hingga suhu 50 °C sebanyak 15 ml dan diputar tiga kali membentuk angka delapan. Setelah itu diinkubasi selama 24 jam di dalam suhu ruang. Jumlah koloni dalam contoh dapat dihitung sebagai berikut:

$$\begin{array}{l} \text{Koloni per ml} \\ \text{atau per gr} \end{array} = \text{Jumlah koloni dalam cawan} \times \frac{1}{\text{Faktor pengenceran}}$$

Menurut Fardiaz (1992) untuk melaporkan hasil analisis mikrobiologi dengan cara hitung cawan digunakan suatu standar yang disebut *Standart Plate Count* (SPC) sebagai berikut:

- a. Cawan yang dipilih dan dihitung adalah yang mengandung jumlah koloni antara 30 – 300.
- b. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan satu kumpulan koloni yang besar dimana jumlah koloninya dapat dihitung sebagai satu koloni.
- c. Satu deretan rantai koloni yang terlihat seperti garis tebal dihitung sebagai satu koloni.

Dalam SPC ditentukan cara pelaporan dan perhitungan koloni sebagai berikut:

- a. Hasil yang dilaporkan hanya terdiri dari lima angka, yaitu angka pertama (satuan) dan angka kedua (desimal). Jika angka yang ketiga sama dengan atau lebih besar dari 5, harus dibulatkan satu angka lebih tinggi pada angka kedua. Sebagai contoh $1,7 \times 10^5$ unit koloni/ml atau $2,0 \times 10^5$ unit koloni/gr.
- b. Jika pada semesta pengenceran dihasilkan kurang dari 30 koloni pada cawan petri, berarti pengenceran yang dilakukan terlalu tinggi. Oleh karena itu, jumlah koloni pada pengenceran terendah yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai kurang dari 30 dikalikan dengan

besarnya pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya dicantumkan dalam tanda kurung.

- c. Jika pada semua pengenceran dihasilkan lebih dari 300 koloni pada cawan petri, berarti pengenceran yang dilakukan terlalu rendah. Oleh karena itu, jumlah koloni pada pengenceran tertinggi dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai lebih dari 300 dikalikan dengan faktor pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung.
- d. Jika pada cawan petri dari dua tingkat pengenceran dihasilkan koloni dengan jumlah antara 30 – 300 koloni dan perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah dari kedua pengenceran tersebut lebih kecil atau sama dengan dua, maka dilaporkan rata-rata dari kedua nilai tersebut dengan memperhitungkan faktor pengencerannya. Jika perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah lebih besar dari dua, maka dilaporkan hasil yang terkecil.
- e. Jika digunakan dua cawan petri (duplo) per pengenceran, data yang diambil harus dari kedua cawan tersebut, tidak boleh diambil salah satu. Oleh karena itu, harus dipilih tingkat pengenceran yang menghasilkan kedua cawan dengan koloni antara 30 – 300.

2. Instrumen Uji Kualitatif Kandungan *Escherichia coli*

Instrumen uji kualitatif kandungan *Escherichia coli* menggunakan metode MPN (*Most Probable Number*) dengan indikasi terbentuknya gas pada uji penduga, terbentuknya koloni yang berwarna hijau metalik pada uji penguat dan uji pelengkap menghasilkan pengecatan bakteri gram negatif.

3. Instrumen Uji Kualitatif dan Kuantitatif Kandungan Siklamat

Instrumen uji kualitatif kandungan siklamat menggunakan metode pengendapan, jika terbentuk endapan berwarna putih maka dilanjutkan dengan uji spektrofotometri untuk mengetahui berat endapan yang dihasilkan.

H. Metode Pengumpulan Data

1. Pengambilan Sampel

Sampel minuman jajanan es campur diambil di wilayah Pujasera Dempo yang dikemas menggunakan plastik kemudian dimasukkan ke dalam *cooling box* yang berisi es batu

2. Uji Kuantitatif Total Cemar Mikroba

Data mengenai total cemaran mikroba pada minuman jajanan es campur diperoleh dengan cara menghitung total koloni yang tumbuh pada media PCA (*Plate Count Agar*) di Laboratorium Kualitas Air Perum Jasa Tirta. Berikut prosedur uji kuantitatif total cemaran mikroba:

- a. Masukkan 1 gram sampel (minuman jajanan es campur yang sudah ditumbuk) secara aseptik ke dalam aquades 9 ml untuk pengenceran 10^{-1} .
- b. Pindahkan 1 ml suspensi dari pengenceran 10^{-1} ke dalam larutan 9 ml untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} lalu aduk hingga homogen.
- c. Buat pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} dengan cara yang sama sesuai kebutuhan.
- d. Masukkan sebanyak 1 ml suspensi dari pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-4} ke dalam cawan petri secara duplo.
- e. Tambahkan 15 ml PCA yang sudah didinginkan hingga temperatur 50°C pada masing-masing cawan yang sudah berisi suspensi.
- f. Aduk hingga homogen (membentuk angka delapan) lalu diamkan sampai menjadi padat.
- g. Inkubasikan pada suhu 36°C selama 24 jam dengan meletakkan pada posisi terbalik.
- h. Menghitung koloni yang terbentuk pada cawan petri menggunakan alat *colony counter* sesuai dengan SPC (*Standart Plate Count*).

3. Uji Kualitatif Kandungan *Escherichia coli*

Data mengenai kandungan *Escherichia coli* pada minuman jajanan es campur diperoleh menggunakan metode MPN (*Most Probable Number*) yang dilakukan dalam 3 tahap pengujian di Laboratorium

Kualitas Air Perum Jasa Tirta. Berikut prosedur uji kualitatif kandungan *Escherichia coli*:

a. Uji penduga (*Presumptive Test*)

- 1) Inokulasikan 10 ml sampel ke dalam 5 tabung media LBG (seri 1).
- 2) Inokulasikan 1 ml sampel ke dalam 5 tabung media LBT (seri 2).
- 3) Inokulasikan 0,1 ml sampel ke dalam 5 tabung media LBT (seri 3).
- 4) Inkubasikan semua tabung pada suhu 35 °C
- 5) Amati terbentuknya asam dan gas pada tabung. Tabung-tabung yang tidak menunjukkan adanya gas diinkubasikan kembali.
- 6) Catat hasil pengamatan.

b. Uji penguat (*Confirmation Test*)

- 1) Inokulasikan satu ose biakan dari setiap tabung uji penduga yang positif, masing-masing ke dalam dua tabung media BGLB.
- 2) Inkubasikan satu seri BGLB pada suhu 35 °C dan satu seri lain suhu 44,5 °C.
- 3) Amati terbentuknya asam dan gas setelah 24 – 48 jam. Bila perlu waktu inkubasi diperpanjang lagi.
- 4) Catat hasil pengamatan.

4. Uji Kualitatif dan Kuantitatif Kandungan Siklamat

Data mengenai kandungan siklamat pada minuman jajanan es campur diperoleh menggunakan uji kualitatif dengan metode pengendapan, jika hasil uji menunjukkan adanya kandungan siklamat maka dilanjutkan dengan uji kuantitatif dengan metode spektrofotometri. Pada uji kandungan siklamat yang diambil sebagai sampel pengujian adalah air minuman jajanan es campur. Berikut prosedur uji kualitatif dan kuantitatif kandungan siklamat menurut Falah (2015):

a. Uji kualitatif siklamat dengan metode pengendapan

- 1) Ambil masing-masing sampel (es campur) sebanyak 10 ml menggunakan pipet.
- 2) Masukkan ke dalam tabung reaksi.
- 3) Tambahkan 1 ml larutan HCl 10%.
- 4) Tambahkan 1 ml larutan BaCl₂ 10%.

- 5) Tambahkan 1 ml larutan NaNO_2 10%.
 - 6) Aduk larutan yang telah dicampurkan menggunakan pengaduk kaca hingga homogen.
 - 7) Diamkan larutan selama 24 jam.
 - 8) Jika terdapat endapan berwarna putih, berarti sampel positif mengandung siklamat.
- b. Uji kuantitatif siklamat dengan metode spektrofotometri
- 1) Ambil masing-masing sampel (es campur) sebanyak 10 ml menggunakan pipet.
 - 2) Masukkan ke dalam tabung reaksi.
 - 3) Tambahkan 1 ml larutan HCl 10%.
 - 4) Tambahkan 1 ml larutan BaCl_2 10%.
 - 5) Tambahkan 1 ml larutan NaNO_2 10%.
 - 6) Aduk larutan yang telah dicampurkan menggunakan pengaduk kaca hingga homogen. Diamkan larutan selama 24 jam.
 - 7) Sampel yang positif mengandung siklamat masing-masing diambil 1800 μL menggunakan pipet.
 - 8) Masukkan ke dalam kuvet yang terdapat pada spektrofotometer.
 - 9) Catat hasil absorbansi.

I. Pengolahan, Penyajian dan Analisis Data

1. Total Cemaran Mikroba

Data total cemaran mikroba pada minuman jajanan es campur disajikan dalam bentuk tabel dan dianalisis secara deskriptif, yaitu membandingkan antara hasil pengujian dengan standar BPOM.

2. Kandungan *Escherichia coli*

Data kandungan *Escherichia coli* pada minuman jajanan es campur disajikan dalam bentuk tabel dan dianalisis secara deskriptif, yaitu membandingkan antara hasil pengujian dengan standar BPOM.

3. Kandungan Siklamat

Data kandungan siklamat pada minuman jajanan es campur disajikan dalam bentuk tabel dan dianalisis secara deskriptif, yaitu membandingkan antara hasil pengujian dengan standar BPOM.