BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah Penelitian Deskriptif, yaitu penelitian dengan menggambarkan serta menginterprestasi suatu objek sesuai dengan kenyataan atau tidak melakukan manipulasi variabel dan juga selalu mengutamakan fakta (Ridwan 2012).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

1. Tempat pengambilan sampel tahu yaitu di Pasar Lawang Kabupaten Malang dan penelitian dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi Jurusan Gizi Poltekkes Malang.

2. Waktu penelitian dilaksanakan pada tanggal 5 April – 9 April 2021

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat dan Bahan Uji Cemaran *E. Coli* Secara Kualitatif

1. Alat

Blender, cawan petri, jarum ose, ose bulat, tabung reaksi, erlenmayer, inkubator, lampu spirtus, cool box, autoklaf , kapas, batang pengaduk, pipet ukur, rak tabung reaksi, timbangan analitik, laf, mikroskop, bola penghisap, oven, hot plate, kaca arloji, penjepit kayu, refrigator, keranjang pewarnaan gram

2. Bahan

EMB agar, media uji imvic, indol dan reagen kovach, merah metil (methyl red), vp (voges proskauer), simon citrate, alfa naftol dan koh, phenol red, NA, lugol, kristal violet, safranin, alcohol 95%, minyak imersi, aquades

3.3.2 Alat dan Bahan Uji Formalin Secara Kualitatif

1. Alat

Tabung reaksi, gelas ukur, pipet tetes, batang pengaduk, corong, dan rak tabung.

2. Bahan

Larutan KMnO4 0,1 N, aquades, dan kertas saring.

3.3.3 Alat dan Bahan Uji Boraks Secara Kualitatif

1. Alat

Mortar dan alu, beaker glass, pipet tetes,batang pengaduk, wadah tempat sampel, tusuk gigi.

2. Bahan

Sampel tahu kuning, larutan kunyit, akuades.

3.4 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas (independen) adalah sampel tahu kuning yang di jual di Pasar Lawang Kabupaten Malang.
2. Variabel terikat (dependen) adalah cemaran *E Coli*, kandungan formalin dan boraks.

3.5 Definisi Operasional Variabel

1. Tahu kuning yang dimaksud adalah tahu kuning yang di jual pedagang kaki lima di Pasar Lawang, Kabupaten Malang.
2. *Esherecia Coli* yang dimaksud dalam penelitian ini adalah bakteri yang di periksa pada sampel tahu kuning melalui proses pemeriksaan Mendeteksi adanya bakteri Escherichia coli pada sampdengan menunjukan adanya koloni bakteri Escherichia coli pada media EMB Agar yang dinyatakan positif berwarna hijau metalik dan dilanjutkan dengan uji IMVIC (Indole, Methyl red, Voges-proskauer, Citrat test).
4. Analisis formalin adalah suatu cara pemeriksaan kualitatif menggunakan metode pereaksi $KMnO_4$ untuk menentukan ada tidaknya formalin pada tahu kuning yang dijual di pasar Lawang.
5. Analisis boraks adalah pemeriksaan secara kualitatif menggunakan metode kertas turmerik yang berbahan kunyit untuk menentukan ada tidaknya boraks pada tahu kuning yang dijual dipasar Lawang.

3.6 Metode Penelitian (Prosedur Penelitian)

3.6.1 Prosedur analisis identifikasi e coli

1. Pra Analitik

a. Pengambilan sampel

Sampel berasal dari pasar Lawang Kabupaten Malang yang dijual pedagang kaki lima yang berbeda dimasukkan kedalam cool box yang sudah diberi kode.

b. Sterilisasi alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini dibersihkan terlebih dahulu dengan air sabun dan air mengalir. Kemudian dibilas sampai bersih dan dikeringkan. Setelah kering, pipet ukur dan cawan petri dibungkus dengan menggunakan kertas pembungkus. Sedangkan tabung reaksi, dan botol sampel disumbat dengan menggunakan kapas. Semua alat gelas tersebut dimasukkan kedalam oven dan disterilisasi pada suhu 100 – 120ºC selama 2 jam.

c. Sterilisasi Media

Media yang akan digunakan dalam penelitian disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121ºC tekanan 1-2 atm selama 15 menit.

d. Pembuatan Media

- Pembuatan Media EMB Agar

- Menimbang 37,5 gram bubuk EMB agar, dilarutkan dalam 1000 ml aquadest, dipanaskan menggunakan hot plate
- Mengaduk perlahan hingga homogen dan jernih menggunakan magnetic stirrer atau batang pengaduk. Kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121^{o}C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit;
- Mendistribusikan ke dalam cawan petri steril masing-masing 15 – 20 ml secara aseptis.

- Pembuatan media NA

- Medium NA dibuat dengan cara timbang sebanyak 2,8 gr dan larutkan dalam 100ml akuades kemudian panaskan diatas hot plate hingga homogen.
- Disterilkan pada autoklaf suhu 121^{o}C selama 1 jam.

- Setelah di sterilkan media dapat dituang secara aseptis pada tabung reaksi dan dimiringkan,
- Ditunggu hingga memadat pada suhu ruang dan siap digunakan.

➢ Pembuatan SIM (Sulfide Indol Motilty) agar

- Menimbang 6 gram bubuk SIM, dilarutkan dalam 200 ml aquadest, dipanaskan menggunakan hot plate
- Mengaduk perlahan hingga homogen dan jernih menggunakan magnetic stirrer atau batang pengaduk. Kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121^0 C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit;
- Mendistribusikan ke dalam tabung reaksi steril masing-masing sebanyak 3 - 5 ml secara aseptis.

➢ Pembuatan Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP) media

- Menimbang 4,25 gram bubuk MR-VP, dilarutkan dalam 250 ml aquadest dipanaskan menggunakan hot plate
- Mengaduk perlahan hingga homogen dan jernih menggunakan magnetic stirrer atau batang pengaduk. Kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121^OC dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.
- Mendistribusikan ke dalam tabung reaksi steril masing-masing sebanyak 3 - 5 ml secara aseptis.

➢ Pembuatan Simon Citrate (SC) agar

- Menimbang 4,5 gram bubuk SC, dilarutkan dalam 200 ml aquadest, dipanaskan menggunakan hot plate;
- Mengaduk perlahan hingga homogen dan jernih menggunakan magnetic stirrer atau batang pengaduk. Kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121^O C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit;
- Mendistribusikan ke dalam tabung reaksi steril masing-masing sebanyak 3 - 5 ml secara aseptis dan dibiarkan hingga membeku dalam posisi miring.

e. Preparasi sampel

- Membuat larutan suspensi dengan cara sampel tahu kuning ditimbang 25 gram yang sudah di homogenkan dengan larutan *Buffered Peptone Water* (BPW) 225ml dengan perbandingan 1:10 dalam erlenmeyer 250ml.

2. Analitik

a. Penanaman menggunakan media EMB Agar

- Menyiapkan cawan petri yang berisi media EMB Agar
- Di inokulasikan suspennsi dengan ose bulat dengan metode 4 kuadran.
- Inkubasi di dalam incubator pada suhu 37ºC selama 24-48 jam;
- Hasil positif jika koloni berwarna hijau metalik
- Hasil dari media EMB Agar yang positif kemudian dilanjutkan dengan uji IMVIC;

b. Penanaman pada media NA

- Hasil positif yang ditunjukkan pada media EMBA dapat dilanjutkan dengan menginokulasikan biakan kedalam media NA miring.
- Menggoreskan ke permukaan media dan di tutup kembali
- Diinkubasi selama 24 jam.

c. Pewarnaan Gram

- Pewarnaan gram diawali dengan pembuatan preparat terlebih dahulu dari bakteri yang digunakan.
- Sterilkan preparat diatas Bunsen
- Genangi preparat oles yang sudah difixasi dengan crystal violet. Biarkan
  selama satu menit. Bilaslah olesan dengan air mengalir dari botol pijit. Tiriskan dengan menegakkan sisi-sisi yang sempit diatas kertas serap. Letakkan kembali preparat keatas rak pada bak pewarna.
- Genangi olesan dengan iodium Gram selama 1-1,5 menit. Setelah itu bilaslah
  dengan air mengalir seperti pada butir 3.
- Cucilah olesan dengan pemucat warna yaitu alkohol 95%, tetes demi tetes

selama 30 detik atau sampai zat warna crystal violet tidakterlihat lagi mengalir dari kaca preparat. Bilas dengan air mengalir, lalu tiriskan dan letakkan diatas kawat bak pewarna.

- Genangi preparat dengan pewarna tandingan, yaitu safranin selama 5 - 10
  detik, kemudian miringkan kaca objek dan bilas dengan aquades. Tiriskan
  kaca objek dan bersihkan area yang bukan cetakan menggunakan tisu. Hal ini untuk memudahkan dalam proses pengeringan.
- Amatilah masing-masing preparat di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x dengan minyak imersi.

d. Penanaman dengan IMVIC

- Uji produksi SIM (Sulfid Indole Motility)
  - Koloni yang berwarna hijau metalik diinokulasikan ke media SIM dengan cara tusuk
  - Diinkubasikan pada suhu 37^{o}C selama 24-48 jam;
  - Ditambahkan 2-3 tetes pereaksi Indol (Kovach);
  - Hasil reaksi positif ditandai dengan adanya bentuk cincin merah pada lapisan atas media
  - Umumnya Escherichia coli bersifat indol positif.
- Uji MR (Methyl Red)
  - Koloni yang berwarna hijau mengkilap diinokulasikan ke dalam media Methyl Red
  - Diinkubasikan pada suhu 37^{o}C selama 24-48 jam
  - Ditambahkan 2-5 tetes indikator Phenol Red pada tabung
  - Hasil reaksi positif ditandai dengan adanya warna kuning dan hasil reaksi negatif ditandai dengan warna merah
  - Umumnya Escherichia coli menunjukkan hasil positif untuk uji Methyl Red

- Uji VP (Voges Proskauer)

- Koloni yang berwarna hijau mengkilap diinokulasikan ke dalam media Voges Proskauer
- Diinkubasikan pada suhu 37^0C selama 24-48 jam;
- Ditambahkan 2-5 tetes reagen alpha naftol dan larutan KOH pada tabung;
- Hasil reaksi positif ditandai dengan adanya warna cincin merah
- Umumnya Escherichia coli menunjukkan hasil negatif untuk uji Voges Proskauer.

➢ Uji SC (simmon citrate)

- Koloni yang berwarna hijau mengkilap diinokulasikan ke media Simmon Citrate dengan cara digores pada media miring
- Diinkubasi pada suhu 37ºC selama 24-48 jam
- Hasil positif bila media SC berubah warna menjadi biru tetapi bila hasil negatif menunjukkan warna tetap hijau
- Umumnya Escherichia coli berwarna hijau pada media Simmon Citrat.

3.6.2 Prosedur Analisis Formalin (modifikasi metode Amin, 2011).

Pengujian sampel dengan KMnO4 :

1. Disiapkan 2 tabung reaksi yang masing-masing diberi kode A dan B.
2. Diisi tabung reaksi A dengan 2 ml akuades.
3. Lalu ditambahkan 1 tetes larutan $KMnO_4$ 0,1 N dan diaduk hingga homogen. 4. Diisi tabung reaksi B dengan 10 mL akuades, lalu ditambahkan 5 gr sampel tahu. Kemudian diaduk hingga homogen.
5. Disaring untuk diambil filtratnya.
6. Filtrat tahu yang berasal dari tabung reaksi B dimasukkan ke dalam tabung reaksi A.
7. Didiamkan sampai 30 menit. Diamati perubahan warna yang terjadi.
8. Dilakukan pada 2 sampel.

3.6.3 Prosedur Analisis Boraks

- Pembuatan Kertas Tumerik

1. Diambil beberapa potong kunyit, kemudian ditumbuk dan disaring sehingga di peroleh filtrate kunyit berwarna kuning.

2. Dicelupkan kertas saring kedalam filtrate kunyit tersebut dan dikeringkan.

- Analisis menggunakan kertas tumerik

1. Ambil sampel tahu kuning secukupnya, lalu digerus hingga halus
2. Dimasukkan sampel tahu kuning tersebut kedalam cawan porselen dan tambahkan air panas.
3. Kemudian hancurkan larutan sampel tersebut hingga menyerupai bubur.
4. Pindahkan larutan sampel tersebut kedalam tabung reaksi.
5. Setelah itu ambil kertas tumerik, ujung kertas tumerik dicelupkan kedalam sampel, kemudian keringkan.
6. Amati perubahan warnanya, jika berwarna merah (merah bata) maka positif mengandung boraks.

3.7 Metode Analisis

Metode yang digunakan yaitu metode isolasi identifikasi IMVIC, Uji Kualitatif formalin dan Boraks.

3.8 Pengolahan, penyajian dan analisis data

3.8.1 Pengolahan

1. Data primer

   Data primer adalah data yang diperoleh secara langsung dari lapangan melalui prosedur penelitian yang digunakan berkaitan dengan objek sampel tahu kuning.

2. Data sekunder

   Data sekunder data yang dikumpulkan dari hasil penelitian terdahulu berupa jurnal maupun dari buku-buku yang dipublikasikan kemudian dijadikan landasan teori.

3.8.2 Penyajian

Data yang diperoleh dari pengujian sampel tahu kuning disajikan berupa bentuk table kemudian didijelaskan dalam bentuk narasi.

3.8.3 Analisis Data

Data yang diperoleh dari pemeriksaan laboratorium diolah dan disajikan dalam bentuk tabulasi untuk menentukan sampel positif Escherichia coli kemudian data dideskripsikan. Untuk analisis data uji formalin di tampilkan data yang diperoleh dalam bentuk table secara deskriptif.