

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan pada analisis cemaran bakteri *Escherichia coli* pada tahu sutra ini adalah deskriptif yang dilakukan secara eksperimental di laboratorium untuk mengetahui kandungan bakteri *Escherichia coli*.

B. Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan pada Januari – februari di Laboratorium Mikrobiologi Poltekkes Kemenkes Malang

C. Bahan dan Alat

- **ALAT**

Tabung reaksi, tabung durham, ose batang, pembakar spirtus, rak tabung reaksi, gelas beaker, batang pengaduk, cawan petri, autoclave, incubator, neraca analitik, botol sampel, pipet volume 1 dan 10 ml

- **BAHAN**

Sampel Tahu sutra yang didapatkan dari pedagang di area pasar besar gadang, aquadest, tisu, kapas, media *Lactosa Broth* (LB), *Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLBB), media *Eosin Methylene Blue* (EMB), peptone water.

D. Populasi dan Sampling

Sampel diambil dari pedagang di area pasar besar gadang. Sampel tahu sutra kemasan diambil masing masing satu dari 3 merek tahu sutra kemasan yang paling banyak dijual dari 7 pedagang.

E. Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini variasi bebasnya adalah tahu sutra kemasan yang dipilih berdasarkan 3 merek yang banyak dijual.

b. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini variasi terikatnya adalah bakteri *Escherichia coli* yang menjadi kontaminan yang mempengaruhi kualitas tahu sutra

F. Definisi Operasional Variable

VARIABEL	DEFINISI OPERASIONAL	PARAMETER	ALAT UKUR	KRITERIA
Kandungan bakteri <i>Escherichia coli</i> pada sampel tahu sutra kemasan	Menentukan kandungan <i>Escherichia coli</i> pada setiap sampel yang dianalisis menggunakan metode MPN	Jumlah kandungan bakteri <i>Escherichia coli</i> dalam setiap sampel yang dianalisis.	Tabel MPN	Memenuhi syarat apabila kandungan bakteri <i>Escherichia coli</i> <3 APM/g/25g (SNI 3142-2018 tentang Tahu dan PerKa BPOM No.13 tahun 2019 tentang Batas Maksimal Cemaran Mikroba Dalam Pangan Olahan pada kriteria tahu segar.)

G. Metode penelitian dan analisis

a. Pembuatan media LB (*Lactosa Broth*)

Ditimbang 13 gram serbuk *Lactose Broth* dan dilarutkan dalam 1 L aquades, kemudian dimasukkan sebanyak 10 ml kedalam tabung pembiakan yang berisi tabung durham dalam posisi terbalik, ditutup kapas, disterilisasi dalam autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit.

b. Pembuatan media BGLB (*Brilliant Green Lactose Broth*)

Ditimbang 40 gram serbuk *Brilliant Green Lactose Broth* (BGLB) dan dilarutkan dalam 1 L aquades kemudian dimasukkan sebanyak 10 ml kedalam tabung pembiakan yang berisi tabung durham dalam posisi terbalik, ditutup kapas, disterilisasi dalam autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit.

c. Pembuatan media EMB Agar

Media *Eosin Methylene Blue* (EMB) Agar sebanyak 100 ml dibuat dari 2 gram EMBA. Sebanyak 3,75 gram EMBA ditimbang menggunakan neraca analitik; kemudian dilarutkan dengan menambahkan aquades sampai volumenya 100 ml dalam gelas beker dan diaduk sampai homogen; siapkan cawan petri; larutan EMBA kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri menggunakan pipet volume sebanyak 10 ml setiap cawan petri; cawan petri kemudian ditutup; lalu disterilkan menggunakan autoclave selama 15 menit.

d. Persiapan Sampel

Sebelum mempersiapkan sampel, wadah tempat sampel disterilisasi terlebih dahulu dalam autoclave dengan suhu 121 °C selama 15 menit.

Sampel uji dibuat 3 seri pengenceran, yaitu: 10^1 , 10^2 , 10^3 . Pengenceran awal, sampel dilakukan dengan mencampurkan 25 gram sampel tahu yang telah dihancurkan ke dalam 225 ml peptone water dan dihomogenkan (pengenceran 10^1). Kemudian dalam mendapatkan pengenceran 10^2 , suspensi awal diambil sebanyak 1 ml lalu dimasukan ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml pepton water dan dihomogenkan. Demikian dengan pengencer 10^3 , suspensi diambil sebanyak 1 ml dari pengenceran 10^2 , lalu dimasukan kedalam tabung reaksi berisi 9 ml peptone water dan dihomogenkan (Kartika dkk, 2014).

e. Uji Praduga

1. Disiapkan 3 tabung masing-masing berisi *lactose Broth Double Strength* sebanyak 10 ml (1a. s.d 3a).
2. Disiapkan 3 tabung masing-masing berisi *Lactose Broth Single Strength* sebanyak 10 ml (1b s.d 3b).
3. Disiapkan 3 tabung masing-masing berisi 10 ml *Lactose Broth single strength* (1c s.d 3c).
4. Ke dalam tabung 1a s.d 3a diinokulasi masing-masing 1 ml sampel tahu 10^{-1} .

5. Ke dalam tabung 1b s.d 3b diinokulasi masing-masing 1 ml sampel tahu 10^{-2} .
6. Ke Dalam tabung 1c. s.d 3c diinokulasi masing-masing 1 ml sampel tahu 10^{-3} .
7. Kocok tabung perlahan agar sampel air merata menyebar keseluruhan bagian media.
8. Inokulasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam.
9. Amati masing-masing tabung untuk melihat ada atau tidaknya gas dan kekeruhan, ada gas dan kekeruhan menunjukkan presumtif positif.

f. Uji penegasan

1. Dari tiap uji pendahuluan yang positif, dipindahkan 1-2 ose ke dalam tabung uji penegasan yang berisi 10 ml BGLB.
2. Seri tabung BGLB diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam (untuk memastikan adanya *E. coli*),
3. Pembacaan dilakukan selama 24-48 jam dengan melihat jumlah tabungan BGLB yang menunjukkan adanya gas dalam tabung durham.

g. Uji pelengkap

Satu ose biakan diambil dari tabung BGLB yang menunjukkan reaksi positif, goreskan (*streak*) pada permukaan media EMB agar dalam cawan petri, inkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam. Adanya bakteri *E. coli* ditunjukkan dengan warna hijau metalik.

H. Pengolahan, penyajian dan analisis data

Pada penelitian analisis kandungan cemaran bakteri *Escherichia coli* digunakan metode MPN untuk mengetahui seberapa banyak kandungan bakteri yang terkandung. Data yang diperoleh pada penelitian ini akan disajikan dalam bentuk tabel.