

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

1.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah deskriptif kualitatif dengan metode eksperimental laboratorium yaitu untuk mengetahui cemaran bakteri *Coliform E. coli* dengan metode *Most Probable Number* (MPN).

1.2 Waktu dan Tempat penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Maret 2022 di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

1.3 Alat dan Bahan

1.3.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain autoklaf, neraca analitik, tabung reaksi, rak tabung reaksi, jarum ose, spirtus, pipet, inkubator, tabung durham, sendok, erlenmeyer, alumunium foil, bunsen, botol akuades, korek api, spidol, cawan petri.

1.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain bubur bayi, LB (*Lactose Broth*), BGLB (*Briliant Green Lactose Bile Broth*), akuades, EMB agar, NaCl, alcohol 70%, kapas, tisu.

1.4 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Parameter	Alat Ukur	Kriteria
Kandungan bakteri <i>Coliform E. coli</i> pada sampel bubuk bayi industri rumahan	Menentukan kandungan bakteri <i>Coliform E. coli</i> pada setiap sampel yang dianalisis menggunakan metode MPN dengan satuan MPN/gram	Jumlah bakteri <i>Coliform E. coli</i> pada setiap sampel bubuk bayi	Metode MPN seri 3 tabung	Batas mikroba <i>Coliform E. coli</i> yang dapat diterima adalah 10 koloni/gram. (Peraturan BPOM Nomor 13 Tahun 2019)

1.5 Metode Penelitian

1.5.1 Sterilisasi Alat

Alat yang digunakan untuk sterilisasi adalah autoklaf. Disiapkan autoklaf. Dituang air ke dalam tubuh sterilisator hingga 2/3 dasar keranjang. Alat dan media yang akan di sterilisasi ditata didalam tabung. Sterilisator ditutup dengan cara mempertemukan lubang baut, sambil diputar untuk lebih rapat. Dibuka klep pengatur pengaman, hidupkan api atau listrik. Bila uap mulai keluar (bunyi mendesis), ditutup klep pengaman, tekanan didalam akan naik dan baca pada alat ukur tekanan sampai 1 Atm (121°C). Jika sudah tercapai, pertahankan selama 15 menit dengan cara klep pengukur tekanan dibuka untuk mengurangi panas. Pada akhir proses, matikan api dan tunggu tekanan hingga nol, suhu dibawah 100°C. Dikeluarkan keranjang serta alat dan bahan dari dalam sterilisator.

1.5.2 Pengambilan Sampel

Sampel diambil dengan menggunakan sendok steril dengan jumlah sampel yang digunakan sebanyak 3 sampel yang diperoleh dari 3 pedagang kaki lima dengan 3 merk yang berbeda di Kecamatan Singosari, yakni dari pedagang X dengan merk A, pedagang Y dengan merk B, dan pedagang Z dengan merk C.

Kemudian masing-masing sampel ditimbang sebanyak 5 gram, dan didispersikan dengan 45 ml water for injection (perbandingan 1:9), dikocok hingga homogeny hingga diperoleh suspense dengan pengenceran 10^{-1} . Disiapkan 2 tabung reaksi masing-masing berisi 10 ml water for injection. Sampel dengan pengenceran 10^{-1} dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan kedalam tabung yang sudah disiapkan hingga diperoleh susupensi dengan pengenceran 10^{-2} dikocok hingga homogen selanjutnya dibuat pengenceran hingga 10^{-3} (Dhafin, 2017).

1.5.3 Pembuatan Media LB

Ditimbang LB sebanyak 2 gram menggunakan neraca analitik. Kemudian dilarutkan dengan akuades sebanyak 150 ml dalam erlemeyer diaduk hingga homogen. Disiapkan tabung reaksi yang sudah berisi tabung durham dengan posisi mulut terbalik menghadap ke dasar tabung reaksi. Dimasukkan larutan LB sebanyak 10 ml kedalam tabung reaksi dengan menggunakan pipet. Mulut tabung reaksi ditutup dengan menggunakan kapas. Disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C , 1 atm selama 15 menit (Dhafin, 2017).

1.5.4 Pembuatan Media BGLB

Meja kerja dibersihkan dan disterilkan dengan alcohol 70%. Disiapkan tabung reaksi yang sudah diisi dengan tabung durham. Ditimbang media BGLB sebanyak 4 gram, kemudian dimasukkan kedalam Erlenmeyer dan dilarutkan dengan menggunakan akuades sebanyak 100

ml, diaduk hingga homogen. Dituang kedalam tabung reaksi sebanyak 10 ml, ditutup dengan kapas steril. Disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C, 1 atm selama 15 menit kemudian didinginkan (Dhafin, 2017).

1.5.5 Pembuatan Media EMB Agar

EMB agar diambil sebanyak 5,625 gram kemudian dilarutkan kedalam 150 ml air, dicampur hingga homogen. Kemudian dipanaskan hingga mendidih dan dimasukkan kedalam autoklaf pada suhu 121°C, 1 atm selama 15 menit. Setelah steril, dengan teknik aseptis, media dituang masing-masing 20 ml kedalam cawan petri yang sudah steril lalu dibiarkan sampai media memadat membentuk agar (Dhafin, 2017).

1.5.6 Pengujian MPN

1.5.6.1 Uji Praduga (*Presumptive Test*)

Disiapkan tabung LB yang didalamnya sudah diisi dengan tabung durham posisi terbalik. Sampel uji dikocok hingga homogen dan masing-masing tabung LB diinokulasi dengan 1 ml sampel. Semua tabung LB yang berisi sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam.

1.5.6.2 Uji Penegasan (*Confirmative Test*)

Dari setiap tabung yang menunjukkan gas positif pada uji praduga, dikocok dan masing-masing diambil 1-2 ose. Diinokulasi pada tabung BGLB dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Diamati terbentuknya gelembung gas pada tabung durham. Dicatat jumlah tabung yang positif dan hasil merujuk pada tabel MPN.

1.5.6.3 Uji Pelengkap (*Complete Test*)

Ditanam 1-2 ose biakan yang ada pada BGLB ke EMB agar dalam cawan petri. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Diamati dan dipilih koloni yang berwarna merah menyala.

1.5.7 Pengolahan, Penyajian dan Analisis Data

Analisis data digunakan untuk mengetahui cemaran bakteri pada bubur bayi industri rumahan yang dijual di Kecamatan Singosari dengan metode MPN, data yang diperoleh dianalisis dengan mengacu pada tabel MPN. Kemudian dibandingkan dengan persyaratan BPOM Nomor 13 Tahun 2019 tentang Batas Maksimal Cemaran Mikroba dalam Pangan Olahan.