

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian tentang gambaran cemaran bakteri *E. coli* pada jajanan gorengan di Kecamatan Oebobo Kota Kupang merupakan jenis penelitian deskriptif kualitatif yaitu bertujuan untuk mengidentifikasi serta menggambarkan keberadaan cemaran bakteri *E.coli* pada jajanan gorengan di Kecamatan Oebobo Kota Kupang.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bakteriologi, Prodi D-III Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Kupang.

2. Waktu Penelitian

Bulan Februari – Maret 2025

C. Variabel Penelitian

Variabel dari penelitian ini adalah variabel tunggal yaitu cemaran Bakteri *E. coli*.

D. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah semua jajanan gorengan di Kecamatan Oebobo Kota Kupang yang dijual oleh 47 pedagang.

E. Sampel dan teknik sampel

1. Sampel

Sampel jajanan gorengan dihitung dengan menggunakan rumus slovin. Rumus slovin untuk menentukan sampel adalah sebagai berikut :

$$\begin{aligned}n &= N / 1 + N (e)^2 \\ &= 47 / 1 + 47 (0,1)^2\end{aligned}$$

= 32 Sampel

Jadi setelah dihitung menggunakan rumus slovin didapatkan sebanyak 32 sampel jajanan gorengan.

Keterangan :

n = jumlah sampel

N = jumlah populasi

e = persentase kesalahan pengambilan sampel yang masih bisa ditolerir

2. Teknik sampel

Teknik pengambilan sampel dalam penelitian ini adalah *Simple Random Sampling* yaitu dengan cara mengambil jenis jajanan gorengan dari setiap pedagang gorengan yang sudah dipilih secara acak dan dihitung menggunakan rumus slovin dengan total 32 sampel yang akan di ambil 1 sampel jajanan gorengan dari setiap pedagang.

F. Defenisi Operasional

Tabel 3.1 Defenisi Operasional

No	Variabel	Defenisi	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Uji cemaran bakteri <i>E. coli</i>	Melihat cemaran bakteri <i>E. coli</i> pada jajanan gorengan melalui uji LB, EMBA, ENDO, pewarnaan gram dan uji biokimia.	<p>LB</p> <p>Positif : keruh dan gas pada tabung durham</p> <p>Negatif : tidak keruh dan tidak ada gas dalam tabung durham</p> <p>EMBA</p> <p>Positif : koloni berwarna hijau metalik</p> <p>Negatif : koloni tidak berwarna hijau metalik</p> <p>ENDO</p> <p>Positif : koloni berwarna merah gelap metalik</p> <p>Negatif : koloni tidak tidak berwarna merah gelap metalik</p> <p>Pewarnaan gram</p> <p>Positif <i>E.coli</i> : bakteri berwarna merah dan bentuk batang (gram negatif)</p> <p>Negatif <i>E.coli</i>: bakteri tidak berwarna merah atau tidak berbentuk batang (gram positif)</p> <p>Uji biokimia</p> <p>Indol : terbentuk lapisan (cincin berwarna merah</p> <p>MR : terbentuk warna merah</p> <p>VP : tidak terbentuk warna merah</p> <p>Simmon Citrat : tidak terjadi perubahan warna pada media</p> <p>TSIA : positif akan berwarna kuning pada agar miring dan kuning pada agar tegak. (A/A), (g+), dan H₂S (-).</p>	Nominal
2.	Menilai standar kelayakan makanan	Standar kelayakan pangan olahan siap saji menurut Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 2 Tahun 2023	<p>Layak : hasil tidak melebihi batas cemaran</p> <p>Tidak layak : hasil melebihi batas cemaran</p>	Nominal

G. Prosedur penelitian

1. Tahap perencanaan

- a. Melakukan survei ke lokasi pengambilan sampel penelitian.
- b. Meminta persetujuan dari pembimbing penelitian untuk proposal yang diajukan.
- c. Pengurusan dan pengajuan kode etik untuk penelitian.
- d. Mengurus permohonan izin untuk melakukan penelitian.

2. Persiapan alat dan bahan

a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kantong plastik steril, pinset steril, tabung reaksi yang sudah disterilkan, tabung durham yang steril, beaker glass, batang pengaduk, rak tabung, rak pewarnaan, labu erlenmayer, gelas ukur, hotplate, bunsen, ose jarum, ose bulat, pipet tetes, cawan petri steril, inkubator, autoclave, oven, mortal, objek glass, korek api, lampu spiritus, timbangan analitik, benang, kertas coklat, kertas label dan mikroskop.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel jajanan gorengan, alkohol 70%, aquades steril, media LB, media EMBA, media ENDO agar, media SIM, reagen kovac, media MR – VP (*Methyl Red - voges Proskauer*), media TSIA, reagen kovac, larutan *Methyl red*, larutan α – naftol, larutan KOH 40%, cat gram (kristal violet, lugol, iodine, dan safranin), oil imersi, kapas steril, benang, kertas coklat, plastik wayang dan kertas label.

3. Prosedur Kerja

a. Persiapan alat dan Bahan

Sebelum melakukan penelitian, sangat penting untuk mensterilkan alat dan media terlebih dahulu. Alat pengambilan sampel, alat gelas dan media disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Ose disterilkan dengan cara dibakar di atas api bunsen sebelum dan setelah penggunaannya (Safitri dan Djasfar, 2023).

b. Cara pengambilan sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan membeli langsung jajanan gorengan dari 47 pedagang yang sudah diundi dengan jumlah sampelnya adalah 32 sampel jajanan gorengan yang akan diambil 1 jenis jajanan gorengan dari setiap pedagang di Kecamatan Oebobo Kota Kupang, yang sudah dipilih secara acak. Sampel diambil menggunakan pinset steril setelah itu sampel dimasukkan ke dalam plastik steril yang telah disediakan dan kemudian dibawa ke laboratorium untuk dilakukan pemeriksaan. Sampel kemudian dihaluskan menggunakan mortal yang sudah disterilkan dan dilarutkan dengan aquades steril.

c. Pembuatan media

1) Pembuatan media LB: Media LB diukur sesuai dengan jumlah yang diperlukan 2 gr dan kemudian ditambahkan 160 ml aquades sesuai dengan takaran yang ditentukan, lalu dipanaskan sampai tercampur. Siapkan tabung reaksi sesuai dengan jumlah sampel. Selanjutnya, isi masing-masing tabung dengan 5 ml larutan media LB, setelah itu lakukan sterilisasi (Safitri dan Djafar, 2023).

2) Pembuatan media EMBA : Media EMBA ditimbang sebanyak 26,5 gr, dilarutkan dengan 700 ml aquades dan diaduk hingga semuanya larut. Panaskan media hingga mendidih menggunakan hot plate yang diaduk

dengan batang pengaduk. Setelah media tercampur rata, disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit (Putri, dkk., 2023).

3) Pembuatan media ENDO agar

Bubuk ENDO agar ditimbang sebanyak 27 gr, dimasukkan kedalam erlemneyer dan dilarutkan dengan aquadest sebanyak 700 ml dan diaduk hingga semuanya larut. Panaskan media hingga mendidih menggunakan hot plate yang diaduk dengan batang pengaduk. Setelah media tercampur rata, disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit (Pransiska dan Emilia, 2023).

d. Prosedur pemeriksaan

1) Uji menggunakan media LB : Tiap tabung telah dipenuhi dengan 5 ml media

LB tambahkan 1 ml sampel pada setiap tabung, selanjutnya tabung durham dimasukkan dengan cara terbalik secara hati-hati. Pastikan tidak ada gelembung yang terbentuk di dalam tabung durham. Tabung reaksi ditutup menggunakan kapas yang dilapisi dengan kasa. Diinkubasi selama 24 jam, apabila belum ada perubahan, lanjutkan hingga 48 jam di dalam inkubator dengan suhu tetap 37°C (Safira, dkk., 2023).

2) Uji menggunakan media EMBA dan media ENDO : Tabung positif dalam

media LB dilanjutkan dengan mengambil kultur menggunakan jarum ose dan diinokulasikan pada permukaan media EMBA dan media ENDO dengan cara streak plate. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam sampai terbentuk koloni bakteri (Hidayati dan Faizah, 2022).

3) Pewarnaan Gram

- a) Ambil kaca objek yang bersih dan tidak mengandung lemak, lalu buat preparat dari kultur bakteri dan fiksasikan preparat dengan memanaskannya di atas api bunsen hingga kering.

- b) Teteskan pewarna Gram A hingga seluruh permukaan preparat terlapisi, biarkan selama 1 menit, kemudian bilas dengan air yang mengalir.
 - c) Teteskan pewarna Gram B hingga seluruh permukaan preparat tertutup, biarkan selama 1-2 menit dan cuci dengan air yang mengalir.
 - d) Teteskan pewarna Gram C, biarkan selama 30 detik, lalu bilas dengan air yang mengalir.
 - e) Teteskan pewarna Gram D, biarkan selama 60 detik, dan bilas dengan air yang mengalir.
 - f) Keringkan preparat menggunakan tissue
 - g) Teteskan 1 tetes minyak imersi pada preparat, kemudian amati di bawah mikroskop (Tivani, dkk., 2019).
- 4) Pengujian Biokimia IMVIC dan TSIA

Dalam menentukan jenis bakteri *E.coli*, dilakukan pengujian biokimia IMVIC (Indol, Methil Red, Voges Proskauer, dan Simon Citrat) dan TSIA.

- a) Uji Indol : Dari kultur media EMBA dan media ENDO ambil beberapa koloni yang tumbuh dan di inokulasikan ke dalam media SIM, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Ditambahkan 2-3 tetes reagen Kovac ke dalam tabung. Warna merah tua pada permukaan media menunjukkan reaksi indol yang positif (Tivani, dkk., 2019).
- b) Uji MR : dari biakan media EMBA dan media ENDO beberapa koloni yang tumbuh dan diinokulasikan ke media MR. Media tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, ditambahkan 5 tetes Methyl Red, diaduk, dan dibiarkan selama beberapa menit. Warna kuning mengindikasikan reaksi negatif, sedangkan warna merah menunjukkan reaksi positif. Warna merah muda hingga merah tua

menandakan reaksi positif, sementara warna yang tidak berubah menunjukkan reaksi negatif (Tivani, dkk., 2019).

- c) Uji VP : pertama siapkan media VP dalam tabung reaksi kemudian bakteri diinokulasi dengan ose pada media. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Tambah 5 tetes KOH 40% dan α -naftol. Jika diduga pada sampel terdapat *E. coli* maka hasilnya akan negatif, karena pada uji VP tidak terbentuk warna merah (Gunawan dan Agustin, 2022).
- d) Uji *Simmon Citrate* : dari kultur media EMBA dan media ENDO, beberapa koloni dimasukkan ke dalam media Simon Citrat, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Warna biru menunjukkan hasil positif, sedangkan warna hijau menunjukkan hasil negatif (Tivani, dkk., 2019).
- e) Uji TSIA : sampel yang positif bakteri *E. coli* pada media EMBA dan media ENDO diambil dengan ose, kemudian masukan ke dalam media TSIA yang telah menjadi agar dengan posisi lurus, tarik ose dan di goreskan pada permukaannya secara zigzag, inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Amati warna, gas dan bintik hitam pada media (Lina, dkk., 2019).

H. Analisis hasil

Hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel dan dinarasikan dengan membandingkan standar kelayakan jajanan gorengan berdasarkan Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 2 Tahun 2023 tentang standar pangan olahan siap saji.

