

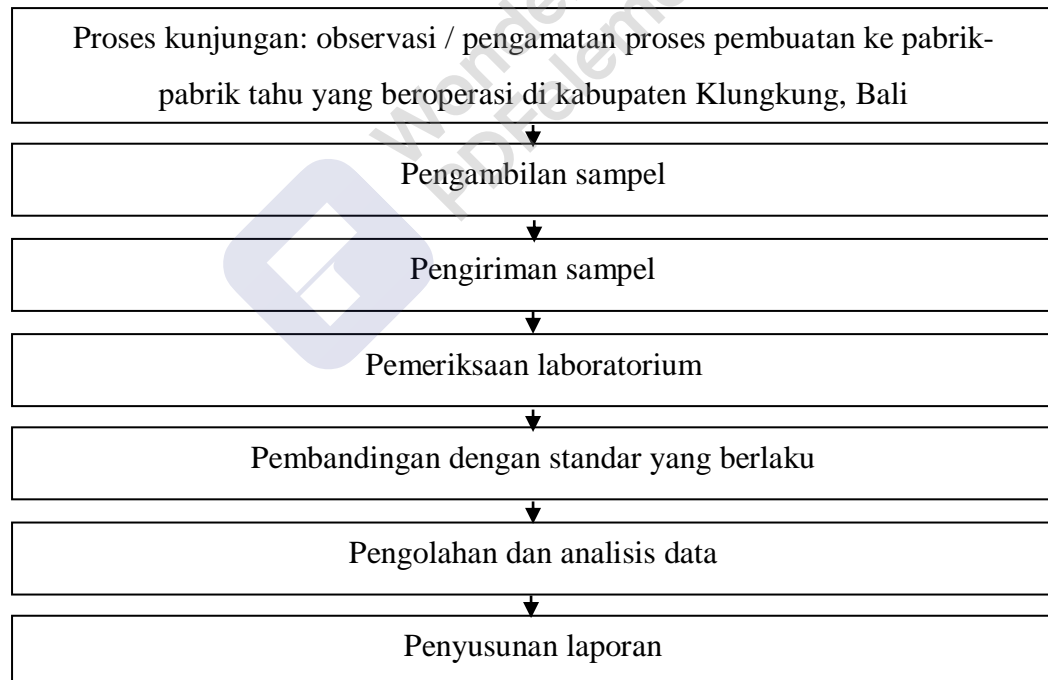
## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini adalah tergolong penelitian non eksperimental dengan desain penelitian deskriptif karena penelitian ini hanya bertujuan untuk mendeskripsikan keadaan yang ada; menggambarkan fakta-fakta mengenai populasi secara sistematis, dan akurat (Rinaldi & Mujianto, 2017). Dalam penelitian ini, yang dideskripsikan adalah keberadaan mikroba *Escherichia coli* pada tahu produksi lokal di wilayah Kabupaten Klungkung, Bali.

#### B. Alur Penelitian



Gambar 7 Alur penelitian

## **C. Tempat dan Waktu Penelitian**

### **1. Tempat penelitian**

Pengambilan data dilakukan di Kabupaten Klungkung, Bali; sedangkan untuk pemeriksaan *Escherichia coli* (meliputi uji MPN / *Most Probable Number*, penanaman pada media EMBA / *Eosine Methylene Blue Agar*, dan pengujian pada media SIM / *Sulphure Indole Motility*) dilaksanakan di Laboratorium Panureksa Utama yang berlokasi di Denpasar, Bali.

### **2. Waktu penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai April 2021.

## **D. Populasi dan Sampel**

### **1. Populasi penelitian**

Populasi sampel dalam penelitian ini yakni pabrik-pabrik lokal yang memproduksi tahu dan beroperasi di wilayah Kabupaten Klungkung, Bali. Jumlah pabrik yang menjadi populasi dalam penelitian ini adalah sebanyak tiga pabrik.

### **2. Sampel penelitian**

Sampel dalam penelitian ini tahu yang bersumber dari tiga produsen lokal di wilayah Kabupaten Klungkung, Bali. Karakteristik tahu yang diambil sebagai sampel merupakan tahu mentah yang baru saja selesai diproduksi dan masih dalam kondisi segar.

Sampel tahu diambil 5 bungkus berbeda per pabrik mengingat menurut peraturan terbaru dari BPOM, untuk pengujian cemaran mikroba *Escherichia coli* memerlukan 5 jumlah sampel untuk diambil dan dianalisis dari satu Lot/Batch Pangan Olahan (BPOM, 2019). Untuk masing-masing bungkus, sampel diambil

sebanyak 1 potong dengan berat kira-kira mencapai 5-10 gram. Pada penelitian ini tidak dilaksanakan pengulangan dikarenakan faktor keterbatasan biaya.

### 3. Teknik pengambilan sampel

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini adalah dengan teknik *non-random sampling*, yaitu sampling jenuh (sensus), di mana semua anggota populasi dijadikan sampel mengingat jumlah populasi relatif kecil.

Adapun prosedur sampling sampel makanan sebagaimana dipaparkan oleh Suryono et al. (2019) yang telah dilaksanakan dalam penelitian ini, yakni sebagai berikut:

- a) Digunakan APD berupa masker, *handscoon* dan *haircup* untuk menghindari terjadinya kontaminasi pada saat pengambilan sampel.
- b) Sampel diambil dari porsi ke dalam wadah sampel secara steril, yaitu dengan menggunakan sendok dan pisau yang steril.
- c) Dalam pengambilan, dilakukan sterilisasi di lapangan yaitu pisau dipanaskan di atas api beberapa saat dan ditunggu sampai pisau kembali dingin, baru digunakan untuk mengambil sampel makanan.
- d) Sampel dimasukkan ke dalam kantong plastic steril yang baru, lalu ditutup rapat, dan dimasukkan kembali ke dalam plastic lainnya yang telah dilabeli.
- e) Sampel makanan disimpan dalam *cool box* yang sebelumnya diisi dengan *dry ice*
- f) Sampel dikirim ke di laboratorium pemeriksa dalam waktu 1 x 24 jam.

## **E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data**

### **1. Jenis data yang digunakan**

Jenis data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah data primer, yang mana menurut literature (Rinaldi & Mujianto, 2017) didefinisikan sebagai data yang diperoleh atau dikumpulkan secara langsung dari sumber datanya, disebut juga sebagai data asli atau data baru yang memiliki sifat *up to date*. Untuk mendapatkannya, peneliti telah mengumpulkannya secara langsung. Dalam penelitian ini, data diperoleh dengan melakukan observasi dan pemeriksaan di laboratorium yg dilakukan secara langsung. Melalui pemeriksaan laboratorium yang dilakukan, telah diperoleh data berupa cemaran mikroba *Escherichia coli* pada tahu produksi lokal yang ada di wilayah Kabupaten Klungkung, Bali.

### **2. Teknik pengumpulan data**

Data yang dikumpulkan pada penelitian ini adalah data primer yang didapat melalui :

#### **a. Observasi**

Data dikumpulkan dengan melakukan pengamatan dan mempelajari hal-hal yang berhubungan dengan penelitian secara langsung. Data yang diperoleh dari observasi meliputi data hygiene sanitasi pengolahan pada tahu produksi lokal yang ada di wilayah Kabupaten Klungkung, Bali, yang meliputi : bahan baku tahu, hygiene pekerja, dan sanitasi lingkungan dan pengolahan tahu. Data yang diperoleh kemudian digunakan untuk mendukung hasil yang diperoleh melalui pengujian laboratorium yang dilakukan.

## b. Pemeriksaan laboratorium

Data dikumpulkan dengan melakukan analisis terhadap cemaran mikroba *Escherichia coli* pada tahu produksi lokal yang ada di wilayah Kabupaten Klungkung, Bali. Dalam pemeriksaan laboratorium, diperlukan alat, bahan, dan prosedur pemeriksaan, yang mana penjabarannya yakni sebagai berikut :

### 1) Alat

Alat - alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain : *cool box* (1 buah), sendok (1 buah), lilin (1 buah), oven (*merk Esco*) (1 buah), otoklaf (*merk Esco*) (1 buah), neraca analitik (1 buah), incubator (mampu beroperasi di suhu  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  dan  $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (*merk Esco*) (1 buah), tabung reaksi dan tabung durham (berukuran 20 mm x 200 mm) (*merk Pyrex*) (145 buah), tutup tabung reaksi (145 buah), jarum-Ose (1 buah), mikropipet dan tip (*merk Drawell*) (ukuran 10-100 $\mu\text{L}$ ), cawan petri (*merk Pyrex*) (6 buah).

### 2) Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain : sampel tahu, akuades, kantong plastic, label, plester, spidol, steker, dry ice, akuades, *media LB* (*Lactose Broth*) (media pengayaan presumtif), *media BGLB* (*Briliant Green Bile Broth*) (media selektif), *media SIM* (*Sulphure Indole Motility*), pereaksi indol (pereaksi Kovacs), *aluminium foil*.

### 3) Prosedur pemeriksaan

Dalam penelitian ini, prosedur yang dipergunakan yaitu bersumber dari SNI ISO 7218:2012 Amd1 2017 dan SNI ISO 7251:2012 yang diadaptasi dan disesuaikan dengan Prosedur Operasional Standar (POS) yang diterapkan di laboratorium pemeriksa. Adapun prosedurnya yaitu:

- a) Penyiapan media pengayaan presumtif (*Lactose Broth*)
- (1) Media lengkap kering (*dehydrated*) dilarutkan dalam air, dengan pemanasan jika diperlukan.
  - (2) Masing-masing media dimasukkan 9 mL ke dalam tabung reaksi yang berisi tabung Durham untuk media konsentrasi tunggal (*LBSS / Lactose Broth Single Strength*), dan sejumlah 10 mL ke dalam tabung reaksi yang berisi tabung Durham untuk media konsentrasi ganda (*LBDS / Lactose Broth Double Strength*).
  - (3) Tabung diposisikan agar tabung Durham tidak berisi gelembung udara.
  - (4) Ujung tabung ditutup dengan penutup tabung.
  - (5) Dilakukan sterilisasi dalam otoklaf yang diatur pada suhu 121 °C selama 15 menit.
- b) Penyiapan media selektif (*BGLB / Brilliant Green Bile Broth*)
- (1) Media komersial siap pakai (*dehydrated*) dilarutkan dalam air, dengan pemanasan jika diperlukan.
  - (2) Media sejumlah 10 mL dimasukkan ke dalam tabung yang diberi tabung Durham.
  - (3) Tabung diposisikan agar tabung Durham tidak berisi gelembung udara.
  - (4) Ujung tabung ditutup dengan penutup tabung.
  - (5) Dilakukan sterilisasi dalam otoklaf yang diatur pada suhu 121 °C selama 15 menit. Tabung Durham harus tidak berisi gelembung udara setelah sterilisasi.

- c) Penyiapan media SIM (*Sulphure Indole Motility*)
- (1) Media komersial siap pakai (*dehydrated*) dilarutkan dalam air, dengan pemanasan jika diperlukan.
  - (2) Masing-masing media dimasukkan sejumlah 5 mL ke dalam tabung.
  - (3) Ujung tabung ditutup dengan penutup tabung.
  - (4) Dilakukan sterilisasi dalam otoklaf yang diatur pada suhu 121 °C selama 15 menit.
- a) Penyiapan media EMBA (*Eosine Methylene Blue Agar*)
- (1) Dengan diwadahi erlenmeyer, media komersial siap pakai (*dehydrated*) dilarutkan dalam air, dengan pemanasan jika diperlukan.
  - (2) Erlenmeyer ditutup ujungnya dengan penutup
  - (3) Dilakukan sterilisasi dalam otoklaf yang diatur pada suhu 121 °C selama 15 menit.
  - (4) Media dituangkan ke cawan petri steril sampai menutupi permukaan cawan petri,
  - (5) Ditunggu hingga media mengeras untuk lanjut ditutup.
- b) Inkubasi media pengayaan presuntif (LB / *Lactose Broth*)
- (1) Lima tabung media LBDS diambil dan dipipetkan 10 mL suspensi awal (konsentrasi  $10^{-1}$ ) ke dalam setiap tabung menggunakan pipet steril (setara 1 g contoh per tabung).
  - (2) Lima tabung media LBSS diambil dan dipipetkan 1 mL suspensi awal ke dalam setiap tabung menggunakan mikropipet dan tip (setara dengan 0,1 g contoh per tabung).

- (3) Lima tabung media LBSS diambil dan dipipetkan 0,1 mL suspensi awal ke dalam setiap tabung menggunakan mikropipet dan tip (setara dengan 0,01 g contoh per tabung).
  - (4) Tip yang baru digunakan untuk setiap pengenceran. Inokulum dan media dicampur dengan hati-hati.
  - (5) Semua tabung LBDS dan LBSS kemudian diinkubasikan dalam inkubator yang diatur pada suhu 37 °C selama 24 jam.
  - (6) Inkubasi dilanjutkan sampai dengan 48 jam jika tidak ada pembentukan gas dan kekeruhan.
- c) Pembuatan sub-biakan dan inkubasi media selektif (BGLB / *Briliant Green Bile Broth*)
- (1) Setiap tabung LBDS dan LBSS yang menunjukkan kekeruhan, berkabut atau penampakan gas, dibuat sub-biakan ke dalam tabung berisi BGLB menggunakan jarum-Ose.
  - (2) Diinkubasikan dalam inkubator yang diatur pada suhu 44 °C selama 24 jam.
  - (3) Inkubasi dilanjutkan sampai dengan 48 jam jika tidak ada pembentukan gas dan kekeruhan.
- d) Pengujian pelengkap dengan penanaman pada EMBA (*Eosine Methylene Blue Agar*)
- (1) Tabung sampel yang positif di BGLB, dipilih salah satunya yaitu yang mengandung volume suspensi 10 ml, kemudian dilakukan streak empat kuadran pada meda EMBA.
  - (2) Dilakukan inkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam



- (3) Diinterpretasikan sebagai positif koloni *Escherichia coli*, bila pada akhir inkubasi ada koloni yang tampak sebagai koloni terisolasi, diameter 2-3 mm, dengan kecenderungan kecil untuk tumbuh bersama, menunjukkan kilau metalik kehijauan oleh pusat cahaya yang dipantulkan dan ungu tua oleh cahaya yang ditransmisikan,
- e) Inokulasi dan inkubasi pada media SIM (*Sulphure Indole Motility*)
- (1) Hasil penanaman pada media EMBA yang menunjukkan hasil positif koloni *Escherichia coli*, diinokulasikan menggunakan jarum-Ose pada tabung media SIM dengan cara ditusukkan.
  - (2) Dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C.
  - (3) Diamati apakah ditunjukkan adanya produksi H<sub>2</sub>S dengan terbentuknya warna hitam dan motilitas bakteri yang ditandai dengan munculnya kekeruhan yang menjalar ke luar dari area tusukan.
- f) Pengujian indol dengan media SIM (*Sulphure Indole Motility*)
- (1) 0,2 mL pereaksi indol ditambahkan ke tabung yang telah diinkubasi.
  - (2) Tabung diperiksa setelah 10 menit.
  - (3) Warna merah dalam fase alkohol mengindikasikan adanya indol.
- g) Interpretasi
- Dihitung jumlah tabung yang menunjukkan hasil positif untuk setiap pengenceran pada media BGLB kemudian disesuaikan dengan lampiran table MPN (terlampir) sehingga diketahui angka MPN yang diperoleh.

### **3. Instrumen pengumpulan data**

Instrumen yang digunakan untuk mengumpulkan data pada penelitian ini adalah alat-alat untuk pemeriksaan laboratorium (sebagaimana telah dipaparkan pada bagian sebelumnya), lembar observasi (terlampir), alat tulis (kertas serta pensil / pulpen), dan kamera untuk dokumentasi.

## **F. Pengolahan dan Analisis Data**

### **1. Teknik pengolahan data**

Data-data yang didapatkan selanjutnya diolah ke dalam bentuk narasi dan tabel.

### **2. Analisis data**

Hasil yang diperoleh dibahas dengan cara deskriptif kemudian dibandingkan dengan standar yang ada yaitu Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 13 Tahun 2019 tentang Batas Maksimal Cemarkan Mikroba dalam Pangan Olahan (terlampir). Pada standar ini, batas mikroba *Escherichia coli* yang dapat diterima yang menunjukkan bahwa proses pengolahan pangan telah memenuhi cara produksi pangan olahan yang baik adalah 3 APM/g, dengan syarat pengujian dilakukan terhadap minimal 5 buah sampel untuk 1lot/batch, dan dari kelima sampel tersebut, tidak boleh ada yang melebihi batas yang disyaratkan.