

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Desain penelitian pada penelitian ini adalah Eksperimental Laboratorik.

#### **B. Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2013. Sterilisasi alat-alat dan penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

#### **C. Populasi dan Sampel**

Populasi pada penelitian ini adalah semua minuman yang dijual di Sekolah Dasar yang ada di Kecamatan Sukabumi Kota Bandar Lampung. Sampel pada penelitian ini adalah 16 minuman jajanan yang diperoleh dari Sekolah Dasar yang ada di Kecamatan Sukabumi Kota Bandar Lampung, secara *quota sampling* sesuai dengan Rumus Slovin.

Berikut dibawah ini adalah Rumus Slovin :

$$n = \frac{N}{1+N\alpha^2} = 16 \text{ sampel}$$

Keterangan :

n = besar sampel

N = populasi (19 minuman jajanan yang dijual di seluruh Sekolah Dasar Kecamatan Sukabumi Bandar Lampung)

$\alpha$  = nilai kritis (batas ketelitian) yang diinginkan (10%)

#### **D. Variabel Penelitian**

Variabel penelitian terdiri dari dua jenis, yaitu variabel bebas dan variabel terikat.

Variabel bebas pada penelitian ini adalah minuman jajanan, sedangkan variabel terikat pada penelitian ini adalah koloni yang terbentuk pada media agar pembiakan, seperti *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter aerogenes.*, *Proteus sp.*, yang berasal dari isolat minuman jajanan yang diperoleh dari Sekolah Dasar di Kecamatan Sukabumi Kota Bandar Lampung.

#### **E. Definisi Operasional**

Dalam penelitian ini terdapat beberapa istilah yang harus dijelaskan secara eksplisit sehingga tidak menimbulkan salah persepsi dalam pemahamannya, antara lain :

## 1. Minuman jajanan

Minuman jajanan adalah minuman yang diolah oleh pengrajin minuman di tempat penjualan atau disajikan sebagai minuman siap santap yang terdiri dari air, es, dan serbuk seduh untuk dijual bagi umum selain yang disajikan jasa boga, rumah makan/restoran dan hotel. Berdasarkan PERMENKES No. 492 Tahun 2010 air dan es yang digunakan sebagai minuman atau bahan baku minuman harus bersih atau harus bebas dari kontaminasi mikroorganisme, memenuhi syarat kimiawi, fisik serta radioaktifitas (terlampir).

## 2. Kandungan bakteri koliform

Keberadaan bakteri *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter aerogenes.*, *Proteus sp.*, dalam minuman jajanan, kemungkinan adanya penurunan mutu yang dapat terjadi karena beberapa faktor, seperti faktor pemilihan bahan, penyimpanan, pengolahan, pengangkutan, penyajian dan lain sebagainya. Untuk lebih lengkapnya dapat dilihat pada Tabel 1.



|   |   |   |     |  |         |
|---|---|---|-----|--|---------|
| 5 | Kandungan bakteri <i>Enterobacter aerogenes</i> | Keberadaan <i>Enterobacter aerogenes</i> dalam minuman jajanan yang diperoleh dari Sekolah Dasar Kecamatan Sukabumi Kota Bandar Lampung | (+) | Terbentuk koloni pada media EMB, SIM, SC, dan Uji Biokimia positif       | Ordinal |
|   |   |   | (-) | Tidak terbentuk koloni pada media EMB, SIM, SC, dan Uji Biokimia negatif |         |
| 6 | Kandungan bakteri <i>Shigella sp.</i>           | Keberadaan <i>Shigella sp.</i> dalam minuman jajanan yang diperoleh dari Sekolah Dasar Kecamatan Sukabumi Kota Bandar Lampung           | (+) | Terbentuk koloni pada media EMB, SIM, SC, dan Uji Biokimia positif       | Ordinal |
|   |   |   | (-) | Tidak terbentuk koloni pada media EMB, SIM, SC, dan Uji Biokimia negatif |         |
| 7 | Kandungan bakteri <i>Proteus sp.</i>            | Keberadaan <i>Proteus sp.</i> dalam minuman jajanan yang diperoleh dari Sekolah Dasar Kecamatan Sukabumi Kota Bandar Lampung            | (+) | Terbentuk koloni pada media EMB, SIM, SC, dan Uji Biokimia positif       | Ordinal |
|   |   |   | (-) | Tidak terbentuk koloni pada media EMB, SIM, SC, dan Uji Biokimia negatif |         |

## F. Bahan Penelitian

Bahan penelitian pada eksperimen ini adalah minuman jajanan yang diperoleh dari Sekolah Dasar yang ada di Kecamatan Sukabumi Kota Bandar Lampung.

## **G. Alat-alat dalam Penelitian**

Alat-alat yang digunakan adalah alat-alat laboratorium mikrobiologi, seperti lemari pengeram (inkubator), autoklav, rak dan tabung reaksi, beker glass, pipet hisap, pipet ukur, pinset, cawan petri, lidi kapas steril, lampu spiritus, ose, serta peralatan lain yang digunakan di laboratorium mikrobiologi.

## **H. Media yang digunakan**

Media pertumbuhan bakteri yang digunakan dalam penelitian ini :

1. *Lactose Broth Single Strength* (LBSS)
2. *Lactose Broth Triple Strength* (LBTS)
3. *Brilliant Green Lactose Bile Broth* (BGLB)
4. *Eosin Metilen Blue* (EMB)
5. Media gula-gula : Glukosa, Laktosa, Manitol, Maltosa, Sukrosa
6. *Agar Sulfur Indole Motility* (SIM)
7. *Agar Simmons Citrate* (SC)

## **I. Prosedur Penelitian**

### **1. Persiapan alat dan spesimen**

Sebelum melakukan penelitian, semua alat-alat yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu dengan menggunakan autoklav. Minuman

jajanan yang diperoleh dari sekolah dasar yang ada di Kecamatan Sukabumi dimasukkan kedalam beker glass sebanyak 100 ml sebagai sampel.

## 2. Prosedur penelitian

Pada penelitian ini menggunakan metode *Most Probable Number* (MPN) untuk mengetahui jumlah perkiraan terdekat dari bakteri *coliform*. Metode MPN adalah metode yang digunakan untuk menguji ada atau tidaknya bakteri *coliform* terdiri dari tiga tahap, yaitu uji pendugaan (*presumptive test*), uji konfirmasi (*confirmed test*), dan uji kelengkapan (*completed test*).

### A. Tahap I *Presumptive Test*

Spesimen cair ditanam pada: Lima buah tabung berisi *Lactose Broth Triple Strength* (LBTS) (tiap tabung berisi 5 ml), kemudian masing-masing diisi air sampel 10 ml. Tabung berikutnya berisi *Lactose Broth Single Strength* (LBSS) (isi sebanyak 10 ml), diisi air sampel 1 ml. Tabung terakhir satu buah tabung berisi LBSS (isi sebanyak 10 ml), tabung dengan diisi 0.1 ml air sampel. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. *Presumptive Test*.

| No | Media                                | Jumlah Tabung | Jumlah     |                 |
|----|--------------------------------------|---------------|------------|-----------------|
|    |                                      |               | Media (ml) | Sampel Air (ml) |
| 1  | <i>Lactose Broth Triple Strength</i> | 5             | 5          | 10              |
| 2  | <i>Lactose Broth Single Strength</i> | 1             | 10         | 1               |
| 3  | <i>Lactose Broth Single Strength</i> | 1             | 10         | 0.1             |

~~~~~Sumber: Kurniawan, 2013

Tabung-tabung tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Tabung-tabung yang menghasilkan gas dilanjutkan dengan uji penegasan (*confirmed test*). Apabila tabung tidak menghasilkan gas, diinkubasi satu kali lagi selama 24 jam, bila tetap tidak menghasilkan gas maka dianggap negatif dan tidak perlu uji lanjutan.

#### **B. Tahap II *Confirmed test***

Dari tabung pada *presumptive test* yang menghasilkan gas, diambil sedikit dengan mencelupkan ose ke dalamnya kemudian tanam pada tabung BGLB, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Tabung-tabung yang menghasilkan gas dicatat dan dicocokkan dengan tabel MPN untuk menentukan jumlah terdekat bakteri *coliform* yang terkandung dalam sampel.

#### **C. Tahap III *Complete test***

Tabung BGLB yang menghasilkan gas, dicelupkan dengan ose, kemudian hasil tersebut ditanamkan pada agar EMB dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah sampel diinkubasi dan apabila pada media EMB berubah warna menjadi hijau metalik, menandakan positif suspect *Escherichia coli*.

Koloni dugaan adanya koliform yang didapat dari uji MPN Complete test, dilakukan uji biokimia. Ose digoreskan pada koloni *suspect coliform* kemudian ditanamkan pada tabung-tabung untuk uji biokimia (glukosa, sukrosa, maltosa, laktosa, manitol, SIM, SC), lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Dalam uji biokimia, suspect *Escherichia coli* menunjukkan uji glukosa positif, sukrosa positif, maltosa positif, manitol positif, serta uji laktosa positif dan dapat pula negatif. Pada uji SIM, produksi H<sub>2</sub>S negatif, uji indole positif motilitas dapat positif atau negatif. Untuk uji SC, hasilnya menunjukkan negatif. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Interpretasi Positif Kontaminasi pada Uji Biokimia.

| No. | Bakteri                 | Uji Biokimia |     |     |     |     |                  |     |   |     |
|-----|-------------------------|--------------|-----|-----|-----|-----|------------------|-----|---|-----|
|     |                         | Glu          | Suk | Mal | Man | Lak | H <sub>2</sub> S | Ind | M | C   |
| 1   | <i>Escherichia coli</i> | +            | +/- | +   | +   | +/- | -                | +   | + | -   |
| 2   | <i>Salmonella sp.</i>   | +            | -   | +   | +   | -   | +                | -   | + | +/- |
| 3   | <i>Shigella sp.</i>     | +            | +   | +   | -   | -   | -                | -   | - | -   |
| 4   | <i>Klebsiella sp.</i>   | +            | +   | +   | +/- | +   | -                | -   | - | +   |
| 5   | <i>Enterobacter sp.</i> | +            | +   | +   | +   | +   | -                | -   | + | +   |
| 6   | <i>Proteus sp.</i>      | +            | +   | -   | -   | -   | +                | -   | + | +/- |

Sumber : MacWilliam, Maria. P. Sturm, L. Tasha. 2013

Keterangan :

|               |                                      |
|---------------|--------------------------------------|
| Glu = Glukosa | H <sub>2</sub> S = Sulfur production |
| Suk = Sukrosa | Ind = Reaksi indole                  |
| Mal = Maltosa | M = Motilitas                        |
| Man = Manitol | C = Citrate                          |
| Lak = Laktosa |                                      |

Tabel 4. Interpretasi Positif Kontaminasi Media Agar *Eosin Metilen Blue*.

| No. | Bakteri                 | EMB            |
|-----|-------------------------|----------------|
| 1   | <i>Escherichia coli</i> | Hijau metalik  |
| 2   | <i>Salmonella sp.</i>   | Tidak berwarna |
| 3   | <i>Shigella sp.</i>     | Tidak berwarna |
| 4   | <i>Klebsiella sp.</i>   | Pink mukoid    |
| 5   | <i>Enterobacter sp.</i> | Tidak berwarna |
| 6   | <i>Proteus sp.</i>      | Tidak berwarna |

Sumber : Allen, Mary. E. Buxton, Rebecca. Cheeptham, N. 2013

Keterangan :

EMB = Eosin Methylene Blue Agar

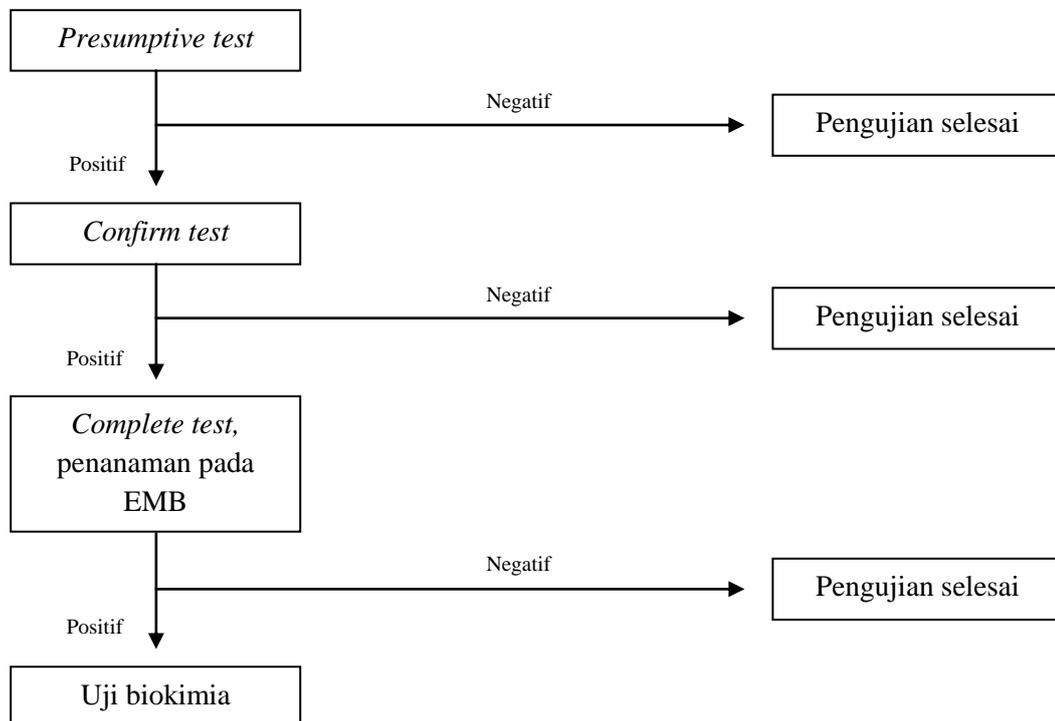
## J. Analisis Data

Dari data yang diperoleh, dilakukan perhitungan prevalensi sampel yang memiliki kadar MPN 0/100 ml dan > 0/100ml sampel (Meutia, 2008).

- a. Persentase minuman jajanan dengan MPN>0/100 ml sampel  $= \frac{\text{Jumlah sampel MPN} > 0/100 \text{ ml}}{\text{Jumlah sampel yang diperiksa}} \times 100\%$
- b. Persentase minuman jajanan dengan MPN 0/100 ml sampel  $= \frac{\text{Jumlah sampel MPN } 0/100 \text{ ml}}{\text{Jumlah sampel yang diperiksa}} \times 100\%$

## K. Alur Penelitian

Alur penelitian yang pertama harus dilakukan adalah sterilisasi alat. Selagi menunggu alat-alat selesai disterilisasi, siapkan minuman jajanan yang diperoleh dari Sekolah Dasar Kecamatan Sukabumi, ambil kira-kira 100ml sampel air dari minuman tersebut. Setelah sampel siap, lakukan uji pertama MPN, *presumptive test*. Apabila *presumptive test* positif, lakukan uji berikutnya yaitu *confirm test*. Apabila *presumptive test* negatif, pengujian sampel selesai. Bila *confirm test* positif lanjutkan pada uji *complete test*, apabila menunjukkan hasil yang positif, terakhir dilakukan uji biokimia atau uji gula-gula. Bila semua pengujian sudah menunjukkan hasil, dilakukan pengumpulan hasil dan melakukan interpretasi hitung angka MPN dengan rumus penghitungan MPN. Untuk lebih jelasnya alur penelitian dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Skema Alur Penelitian.

## L. Etika Penelitian

Ilmuwan Penelitian kesehatan yang melakukan pengambilan sampel non-klinik berupa 16 minuman jajanan dari Sekolah Dasar Negeri Kecamatan Sukabumi Kota Bandar Lampung, proses pengambilannya telah dilakukan *informed consent*, dan sesuai dengan etika penelitian. Untuk itu penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung (terlampir).