

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian bersifat deskriptif dan desain penelitian ini adalah *cross sectional* yaitu untuk melihat bakteri *Escherichia coli* pada es tebu yang dijual dipinggir jalan Kota Bandar Lampung.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan di Kota Bandar Lampung dan penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang pada bulan Juni 2024.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah seluruh es tebu yang berjumlah 27 yang dijual di pinggir jalan Kota Bandar Lampung.

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah seluruh populasi yang berjumlah 27 es tebu yang dijual di pinggir jalan Kota Bandar Lampung dengan kriteria sebagai berikut:

- a. Es tebu yang dijual menggunakan gerobak di pinggir jalan Kota Bandar Lampung
- b. Es tebu yang dijual pada siang sampai sore hari.

D. Variabel dan Devinisi Operasional

Table 3.1 Devinisi Operasional

Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Es tebu	Sari tebu yang ditambahkan es batu yang dijual di pinggir jalan Kota Bandar Lampung	Organoleptis	Indra penglihatan dan perasa	Minuman yang berisi air tebu yang ditambah es batu	Ordinal
Bakteri <i>Escherichia coli</i>	Bakteri yang ditemukan dari pemeriksaan es tebu yang dijual di Kota Bandar Lampung	Metode MPN (<i>Most Probable Number</i>)	Tabel Thomas Ragam 511	1. Memenuhi syarat jika total bakteri coliform <3 APM/ml 2. Tidak memenuhi syarat jika total bakteri coliform ≥ 3 APM/ml (BPOM No. 13 Tahun 2019) Ada atau tidaknya bakteri <i>Escherichia coli</i> .	Ordinal

E. Pengumpulan Data

1. Prosedur Pengambilan Data

Data yang dikumpulkan merupakan data primer yang diperoleh dengan cara melakukan pemeriksaan sampel es tebu. Dengan mengajukan permohonan izin penelitian dari Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang untuk melakukan penelitian di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, setelah didapatkan surat izin, melakukan pengambilan sampel es tebu di pinggir jalan Kota Bandar Lampung secara bertahap.

a. Prosedur pengambilan sampel

Pengambilan sampel pada penelitian ini dilakukan selama 7 hari

1) Pengambilan sampel hari pertama (4 sampel)

- a) Es tebu murni di Jl. Prof. Dr. Ir. Sumantri Brojonegoro, Gedong Meneng, Kec. Rajabasa, Kota Bandar Lampung, Lampung 35141
- b) Es tebu murni di Jl. Pramuka No.36B, Rajabasa, Kec. Rajabasa, Kota Bandar Lampung, Lampung 35142
- c) No name 5 di Jl. Untung Suropati, Labuhan Ratu, Kec. Labuhan Ratu, Kota Bandar Lampung, Lampung 35142
- d) Es tebu karyo di Jl. ZA. Pagar Alam, Labuhan Ratu, Kec. Kedaton, Kota Bandar Lampung, Lampung 35132

2) Pengambilan sampel hari kedua (5 sampel)

- a) No name 1 di Jl. Endro Suratmin, Sukarame, Kec. Sukarame, Kota Bandar Lampung, Lampung 35131
- b) Es tebu bintang rejang di Jl. Endro Suratmin No.120, Sukarame, Kec. Sukarame, Kota Bandar Lampung, Lampung 35131
- c) Es tebu murni rizki di Jl. Purnawirawan Raya No.118A, Gn. Terang, Kec. Langkapura, Kota Bandar Lampung, Lampung 35152
- d) Es sari tebu di Jl. Bukit Kemiling Permai Raya, Kemiling Permai, Kec. Kemiling, Kota Bandar Lampung, Lampung 35152
- e) Mayang sari es tebu murni di Jl. Komarudin No.25, Rajabasa Raya, Kec. Rajabasa, Kota Bandar Lampung, Lampung 35142

3) Pengambilan sampel hari ketiga (1 sampel)

- a) Es sari tebu di Jl. Pulau Damar No.40 A, Way Kandis, Kec. Tj. Senang, Kota Bandar Lampung, Lampung 35141

- 4) Pengambilan sampel hari keempat (2 sampel)
 - a) Es tebu di Jl. Teuku Cik Ditiro No.12, Beringin Raya, Kec. Kemiling, Kota Bandar Lampung, Lampung 35155
 - b) Es tebu di Jl. Bukit Kemiling Permai Raya, Kemiling Permai, Kec. Kemiling, Kota Bandar Lampung, Lampung 35152
- 5) Pengambilan sampel hari kelima (2 sampel)
 - a) Es tebu di Jl. Pulau Damar No.1, Way Dadi, Kec. Sukarame, Kota Bandar Lampung, Lampung 35131
 - b) Van Moel sabu (sari tebu) di Jalan Raden Intan No.128 Pelita Tanjung Karang Pusat, Pelita, Engal, Kota Bandar Lampung, Lampung 35213
- 6) Pengambilan sampel hari keenam (6 sampel)
 - a) No name 2 di Jl. Pulau Sebesi, Sukarame, Kec. Sukarame, Kota Bandar Lampung, Lampung 35131
 - b) No name 3 di Jl. Endro Suratmin, Sabah Balau, Kec. Sukarame, Kota Bandar Lampung, Lampung 35131
 - c) Es sari tebu murni di Jl. Pulau Tegal 15-13, Way Dadi, Kec. Sukarame, Kota Bandar Lampung, Lampung 35133
 - d) Sari tebu bude misthun di Jl. Pulau Tegal 15-13, Way Dadi, Kec. Sukarame, Kota Bandar Lampung, Lampung 35133
 - e) Es sari tebu murni di Jl. Sentot Alibasya No.82, Way Dadi, Kec. Sukarame, Kota Bandar Lampung, Lampung 35133
 - f) Es tebu bang ramlan di Jl. Hi Pangeransuhaimi, Harapan Jaya, Kec. Sukarame, Kota Bandar Lampung, Lampung 35131
- 7) Pengambilan sampel hari ketujuh (7 sampel)
 - a) Es sari tebu murni Elsan di Jl. Ikan Hiu 86-44, Pesawahan, Kec. Telukbetung Selatan, Kota Bandar Lampung, Lampung

- b) No name 4 di Jl. Kartini No.62, Palapa, Kecamatan Tanjung Karang Pusat, Kota Bandar Lampung, Lampung 35116
- c) Tebu qita di Jl. Ryacudu, Harapan Jaya, Kec. Sukarame, Kota Bandar Lampung, Lampung 35131
- d) Es sari tebu di Jl. Endro Suratmin No.88, Way Dadi, Kec. Sukarame, Kota Bandar Lampung, Lampung 35131
- e) Es tebu di Jl. Sriwijaya No 3, Enggal, Enggal, Kota Bandar Lampung, Lampung 35213
- f) No name 6 di Jl. Diponegoro No.4, Sumur Batu, Kec. Tlk. Betung Utara, Kota Bandar Lampung, Lampung 35212
- g) Es sari tebu murni bang fai di Jl. Ikan Tenggiri No.69, Pesawahan, Kec. Telukbetung Selatan, Kota Bandar Lampung, Lampung

Masing-masing sampel diberi identitas menggunakan label dengan mencantumkan nama atau kode sampel, tanggal pengambilan, waktu pengambilan, dan lokasi pengambilan lalu masukan ke dalam ice box, kemudian dibawa ke Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.

2. Metode Pemeriksaan

Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan metode *Most Probable Number* (MPN) dengan ragam 5:1:1.

3. Persiapan Alat

Alat yang digunakan adalah *ice box*, lampu bunsen, kertas label, kertas kopi, kapas, alumunium foil, oven, neraca analitik, Erlenmeyer, batang pengaduk, tabung reaksi, rak tabung reaksi, tabung durham, autoclave, pipet volume, vacum pump, rotator, dan ose bulat.

4. Persiapan bahan

Media *Lactose Broth Single Strain* (LBSS), media *Lactose Broth Triple Strain* (LBTS), media *Brilliant Green Lactose Broth* (BGLB), media *Eosin Methylen Blue* (EMB), media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), media *Simons Citrate* (SC), media Sulfur Indol Motility

(SIM), media glukosa, media laktosa, media maltosa, media manitol, media sukrosa, alcohol 70%, aquadest, reagen kovack, cat Gram A, B, C, D, dan sampel es tebu yang dijual di pinggir jalan Kota Bandar Lampung.

5. Prosedur Kerja Pemeriksaan

a. Sterilisasi Alat

- 1) Siapkan oven dan alat-alat gelas yang akan disterilkan dalam keadaan bersih dan kering.
- 2) Bungkus alat-alat gelas menggunakan kertas kopi, untuk pipet volume dililit menggunakan kertas kopi lalu diikat ujungnya. Untuk tabung reaksi dan Erlenmeyer mulutnya ditutup terlebih dahulu menggunakan alumunium foil lalu dibungkus menggunakan kertas kopi.
- 3) Masukkan kedalam oven dengan tersusun rapih.
- 4) Aktifkan oven.
- 5) Atur suhu oven di 160°C.
- 6) Setelah suhu sampai di 180°C waktu mulai sterilisasi selama 40 menit.

b. Pembuatan Media *Lactose Broth Single Strength* (LBSS)

- 1) Media *Lactose Broth* berupa serbuk ditimbang sebanyak 7,02 gr.
- 2) Masukkan media kedalam Erlenmeyer yang sudah berisi aquadest sebanyak 540 ml lalu aduk hingga homogen.
- 3) Masukkan kedalam tabung reaksi yang sudah berisi tabung durham dengan posisi terbalik sebanyak 10 ml lalu tutup mulut tabung reaksi menggunakan kapas.
- 4) Media *Lactose Broth* yang sudah berada dalam tabung reaksi disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
- 5) Setelah selesai disterilkan, media dikeluarkan dari autoclave lalu didinginkan dan media siap digunakan. (Atlas, 2010)

- c. Pembuatan Media *Lactose Broth Triple Strength* (LBTS)
 - 1) Media *Lactose Broth* berupa serbuk ditimbang sebanyak 26,325 gr.
 - 2) Masukkan media kedalam Erlenmeyer yang sudah berisi aquadest sebanyak 675 ml lalu aduk hingga homogen.
 - 3) Masukkan kedalam tabung reaksi yang sudah berisi tabung durham dengan posisi terbalik sebanyak 5 ml lalu tutup mulut tabung reaksi dengan menggunakan kapas.
 - 4) Media *Lactose Broth* yang sudah berada dalam tabung reaksi disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
 - 5) Setelah selesai disterilkan, media dikeluarkan dari autoclave lalu didinginkan dan media siap digunakan.(Atlas, 2010)
- d. Pembuatan Media *Brilliant Green Lactose Broth* (BGLB)
 - 1) Media *Brilliant Green Lactose Broth* berupa serbuk ditimbang sebanyak 37,8 gr.
 - 2) Masukkan media ke dalam Erlenmeyer yang sudah berisi aquadest sebanyak 945 ml lalu aduk hingga homogen.
 - 3) Masukkan kedalam tabung reaksi yang sudah berisi tabung durham dengan posisi terbalik sebanyak 5 ml lalu tutup mulut tabung reaksi menggunakan kapas.
 - 4) Media *Brilliant Green Lactose Broth* yang sudah berada dalam tabung reaksi disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
 - 5) Setelah selesai disterilkan, media dikeluarkan dari autoclave lalu didinginkan dan media siap digunakan.(Atlas, 2010)
- e. Pembuatan Media *Eosin Methylen Blue* (EMB Agar)
 - 1) Media *Eosin Methylen Blue* serbuk ditimbang sebanyak 4,86 gr.
 - 2) Masukkan media ke dalam Erlenmeyer yang sudah berisi aquadest sebanyak 135 ml lalu aduk hingga homogen.

- 3) Sterilkan media menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
 - 4) Masukkan ke dalam plate sebanyak 20 lm lalu tutup plate dan biarkan mengeras.
- f. Pembuatan Media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)
- 1) Media *Triple Sugar Iron Agar* serbuk ditimbang sebanyak 8,77 gr.
 - 2) Masukkan media ke dalam Erlenmeyer yang sudah berisi aquadest sebanyak 135 ml lalu aduk hingga homogen.
 - 3) Masukkan media kedalam tabung reaksi sebanyak 5 ml.
 - 4) Sterilkan media menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
 - 5) Setelah di sterilkan miringkan tabung 45° hingga media mengeras.
- g. Pembuatan Media *Cimmons Citrate Agar* (SC)
- 1) Media *Cimmons Citrate Agar* serbuk ditimbang sebanyak 3,0375 gr.
 - 2) Masukkan media ke dalam Erlenmeyer yang sudah berisi aquadest sebanyak 135 ml lalu aduk hingga homogen.
 - 3) Masukkan media ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml.
 - 4) Sterilkan media menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
 - 5) Setelah disterilkan miringkan tabung 45° hingga media mengeras.
- h. Pembuatan Media SIM (Sulfur Indol Motility)
- 1) Media SIM serbuk ditimbang sebanyak 2,43 gr.
 - 2) Masukkan media ke dalam Erlenmeyer yang sudah berisi aquadest sebanyak 81 ml lalu aduk hingga homogen.
 - 3) Masukkan media kedalam tabung reaksi sebanyak 3 ml.
 - 4) Sterilkan media menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

i. Pembuatan Media Gula-Gula (Glukosa, Laktosa, Manitol, Maltosa, dan Sukrosa)

- 1) Media Pepton serbuk ditimbang sebanyak 2 gr.
- 2) Masukkan media ke dalam Erlenmeyer yang sudah berisi aquadest sebanyak 200 ml lalu aduk hingga homogen.
- 3) Timbang media gula gula (glukosa, laktosa, manitol, maltose, dan sukrosa) masing-masing 2 gr.
- 4) Masukkan ke dalam Erlenmeyer yang sudah berisi larutan pepton sebanyak 200 ml lalu aduk hingga homogen.
- 5) Masukkan media ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml
- 6) Sterilkan media menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

j. Pengambilan Sampel

- 1) Datang ke tempat penjual es tebu dan membeli es tebu yang akan dijadikan sebagai sampel
- 2) Beri label pada sampel berupa kode sampel, tanggal pengambilan, waktu pengambilan dan lokasi pengambilan. Lalu masukan sampel kedalam ice box.
- 3) Segera bawa ke laboratorium untuk dilakukan pemeriksaan. Mulai dari diambilnya sampel sampai akan dilakukan pemeriksaan tidak boleh lebih dari 2 jam.
- 4) Sebelum sampel diperiksa, sterilkan terlebih dahulu kemasan sampel menggunakan kapas alcohol.

k. Prosedur Pemeriksaan

Pemeriksaan sampel menggunakan metode *Most Probable Number* (MPN) ragam 5:1:1 terdapat 2 tahap pemeriksaan yaitu uji pendugaan, uji penegasan dan uji pelengkap.

- 1) Uji pendugaan
 - a) Siapkan media *Lactose broth* sebanyak 7 tabung. Yang terditi dari 5 tabung berisi media *Lactose broth Triple Streng* masing-masing 5ml dan 2 tabung yang berisi media *Lactose broth Single Streng* masing-masing 10ml.

- b) Susun tabung reaksi pada rak tabung reaksi, lalu masing-masing tabung diberi label berupa nomor urut, volume, dan tanggal pemeriksaan.
 - c) Dipipet sampel menggunakan pipet volume yang telah disterilkan
 - d) Pipet sebanyak 10ml ke masing-masing tabung *Lactose broth Triple streng.*
 - e) Pipet sebanyak 1ml ke 1 tabung *Lactose broth Single streng.*
 - f) Pipet sebanyak 0,1ml ke 1 tabung *Lactose broth Single streng.*
 - g) Masing-masing tabung dihomogenkan menggunakan rotator.
 - h) Inkubasi didalam oven dengan suhu 35-37°C selama 2x24 jam.
 - i) Interpretasi hasil:
 - Positif (+) :Keruh dan terbentuk gas dalam tabung durham
 - Negatif (-) :Jernih tidak terbentuk gas/keruh tidak terbentuk gas
 - j) Jika didapat hasil terdapat tabung yang positif, maka dilanjutkan dengan uji penegasan.
- 2) Uji Penegasan
- a) Setiap tabung yang positif pada uji pendugaan diambil 1-2 mata ose ke tabung yang berisi media *Brilliant Green Lactose Broth* volume 10ml.
 - b) Inkubasi pada suhu 44°C selama 2x24 jam.
 - c) Interpretasi hasil:
 - Positif (+) :keruh dan terbentuk gas dalam tabung durham
 - Negatif (-) :Jernih tidak terbentuk gas/keruh tidak terbentuk gas

- d) Hitung hasil jumlah tabung yang positif, lalu konfirmasi pada table Thomas, untuk menentukan indeks MPN.
- 3) Uji Pelengkap
- a) Setiap tabung yang positif pada uji penegasan diambil 1 mata ose lalu goreskan pada permukaan media EMB secara zig-zag.
- b) Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- c) Pembacaan koloni pada media EMB yaitu mengamati bentuk koloni, ukuran, warna, tepian, dan elevasi. Ciri-ciri koloni *Escherichia coli* pada media EMB yaitu bentuk koloni bulat, ukuran sedang, warna hijau methalic, tepian rata, dan elevasi cembung.
- d) Koloni yang tumbuh pada media EMB lalu dicat Gram dan dibaca di bawah mikroskop
- e) Pembacaan cat Gram yaitu Gram (-), warna merah, dan bentuk batang lurus.
- f) Koloni yang menandakan bakteri *Escherichia coli* ditanam pada media TSIA, SC, SIM, dan seri media gula-gula menggunakan ose.
- g) Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- h) Interpretasi hasil (*Escherichia coli*)

Table 3.2 Interpretasi Hasil TSIA, SC, SIM, dan gula-gula

Media	Hasil Pertumbuhan
TSIA	Lereng kuning Dasar kuning Gas (+) Sulfur (-)
SC	Negatif (-)
SIM	Sulfur (-) Indol (+ cepat) Motility (+)
Glukosa	Positif/gas positif
Laktosa	Positif /gas positif
Manitol	Positif /gas positif

Maltosa	Positif/gas positif
Sukrosa	Positif/gas positif

F. Pengolahan dan Analisa Data

1. Pengolahan Data

Data diolah dengan mencatat hasil pemeriksaan MPN di laboratorium yang dikonfirmasi dengan tabel thomas yang disesuaikan dengan seri tabung yang digunakan untuk mengetahui perkiraan jumlah bakteri *Escherichia coli* dan melakukan identifikasi koloni bakteri pada es tebu yang dijual di pinggir jalan Kota Bandar Lampung.

2. Analisis Data

Analisis data menggunakan analisis univariat yaitu distribusi frekuensi dan persentase untuk mendapatkan persentase es tebu di Kota Bandar Lampung yang memenuhi syarat BPOM No. 13 tahun 2019 adalah <3APM/ml.