BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan yaitu penelitian deskriptif kuantitatif, yang dilakukan dengan metode MPN untuk mendiskripsikan keberadaan bakteri *Coliform* dan mendapatkan nilai MPN pada susu kedelai rumahan di Desa Banjarejo, Kecamatan Pagelaran.

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi

Populasi dari penelitian ini adalah susu kedelai rumahan yang diproduksi di wilayah Desa Banjarejo, Kecamatan Pagelaran.

3.2.2 Sampel

Metode pengambilan sampel yang digunakan adalah *Total Sampling* yaitu teknik sampel dimana jumlah sampel sama dengan populasi. Terdapat 2 tempat produksi susu kedelai rumahan yang dipilih berdasarkan skala produksi rumah tangga dengan nama usaha (Yuli Sari Kedelai) di Kampung Trem Desa Banjarejo dan produksi rumah tangga tanpa merek di di Jalan Diponegoro Suko Arum Desa Banjarejo.

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

3.3.1 Waktu

Penelitian ini dilakukan pada tanggal 19-24 Maret 2025.

3.3.2 Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Poltekkes Kemenkes Malang.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Tabung reaksi, tabung durham, rak tabung reaksi, timbangan, ose jarum, gelas piala, bunsen, pipet volume, pipet ukur, pipet tetes, inkubator,

LAF (*Laminar Air Flow)*, autoklaf, *hot plate*, batang pengaduk, erlenmeyer, kertas perkamen, kapas steril.

3.4.2 Bahan

Sampel susu kedelai, akuades, *Buffered Pepton Water*, media *Lactosa Broth* (LB), media *Brilliant Green Lactosa Bile Broth* (BGLBB).

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah sampel susu kedelai yang diproduksi di Desa Banjarejo, Kecamatan Pagelaran yang akan diidentifikasi cemaran bakteri *Coliform*.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah bakteri *Coliform* yang merupakan parameter mikrobiologi untuk mengetahui layak tidaknya susu kedelai yang diproduksi di Desa Banjarejo, Kecamatan Pagelaran sebagai minuman untuk dikonsumsi.

3.6 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

No.	Variabel	Definisi Operasional	Metode dan Alat Ukur	Skala Ukur	Hasil Ukur
1.	Susu kedelai rumahan di Desa Banjarejo Kecamatan Pagelaran	Susu kedelai yang diproduksi secara rumahan di Desa Banjarejo Kecamatan Pagelaran	Observasi	-	2 sampel susu kedelai dari produksi rumahan yang berbeda di Desa Banjarejo Kecamatan Pagelaran
2.	Kandungan bakteri *Coliform* pada sampel susu kedelai rumahan	Bakteri *Coliform* yang ditemukan pada sampel susu kedelai rumahan di Desa Banjarejo	Metode MPN	Ada/tidaknya	Positif : jika terdapat gelembung gas dalam tabung durham dan larutan media menjadi keruh

		Kecamatan Pagelaran			dengan nilai MPN > 3/ml maka dinyatakan positif Negatif : jika tidak terdapat gelembung gas pada tabung durham maka dinyatakan negatif.

3.7 Kerangka Kerja Penelitian

Metode identifikasi cemaran bakteri *Coliform* menggunakan metode MPN berpedoman pada SNI 01-2897-1992 tentang cara uji cemaran mikroba.

3.7.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan digunakan dalam pengujian disiapkan untuk disterilisasi. Kemudian alat dibungkus menggunakan kertas perkamen. Sterilisasi alat menggunakan oven dengan suhu 180°C selama 1 jam.

3.7.2 Preparasi Sampel

Sebelum melakukan pengujian, sampel dipreparasi dengan memipet 10 ml cuplikan sampel ke dalam gelas piala yang telah berisi 90 ml larutan pengencer *Buffered Pepton Water* (1:10), kemudian dikocok hingga homogen lalu sampel diambil sebanyak 1 ml.

3.7.3 Pembuatan Media

3.7.3.1 Media LB (*Lactose Broth*)

Pada uji penegasan, media LB ditimbang sebanyak 7,8 gram dimasukkan dalam gelas piala. Media dilarutkan dengan akuades sebanyak 600 ml diatas *hotplate* hingga serbuk larut sempurna dan tidak ada yang menggumpal. Media LB dipipet sebanyak 10 ml dan dimasukkan pada masing-masing tabung reaksi yang dilengkapi dengan tabung durham

dengan posisi terbalik. Kemudian media disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.

3.7.3.2 Media BGLBB (*Brilliant Green Lactose Bile Broth*)

Pada uji penegasan, media BGLBB ditimbang sebanyak 24,06 gram lalu dimasukkan dalam gelas beaker dan dilarutkan dengan 300 ml akuades diatas *hotplate* hingga serbuk larut sempurna. Media BGLBB dipipet sebanyak 10 ml dan dimasukkan pada masing-masing tabung reaksi yang dilengkapi dengan tabung durham dengan posisi terbalik. Kemudian media disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.

3.7.4 Uji MPN (*Most Probable Number*)

3.7.4.1 Uji Penduga

Sampel dipipet sebanyak 1 ml untuk pengenceran 10^{-1} ke dalam masing-masing 3 tabung yang telah berisi 10 ml LB yang didalamnya dan terdapat tabung durham terbalik. Dilakukan cara yang sama terhadap pengenceran 10^{-2} (1:100) pada tabung kedua dan tabung ketiga dengan pengenceran 10^{-3} (1:1000) (tiap pengenceran menggunakan pipet yang baru dan steril). Semua tabung dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 dan 48 jam. Setelah 24 jam kemudian dicatat jumlah tabung yang membentuk gas pada masing-masing pengenceran dan disimpan lagi tabung yang tidak membentuk gas dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian catat jumlah tabung yang membentuk gas. Pada pengujian ini dilakukan 3 kali (triplo).

3.7.4.2 Uji Penegasan

Sampel yang positif pada media LB ditanamkan pada media BGLBB. Tabung yang positif diambil sebanyak 1 mata ose dan dipindahkan ke dalam tabung yang berisi 10 ml BGLBB. Semua tabung dimasukkan ke dalam lemari inkubator pada suhu 37°C selama 24- 48 jam. Adanya gas pada tabung BGLB memperkuat adanya bakteri *Coliform* dalam sampel. Pengamatan dilakukan pada tabung yang positif gas dan dicocokkan dengan tabel MPN untuk mengetahui jumlah total *Coliform.*

3.8 Pengolahan dan Penyajian Data

3.8.1 Pengolahan Data

Data diolah dengan memberikan kode pada setiap sampelnya, pada penelitian ini peneliti memberikan kode sebagai berikut :

- Sampel

Nama Sampel	Kode
Sampel 1 replikasi 1	A1
Sampel 1 replikasi 2	A2
Sampel 1 replikasi 3	A3
Sampel 2 replikasi 1	B1
Sampel 2 replikasi 2	B2
Sampel 2 replikasi 3	B3

- Hasil

Hasil Sampel	Kode
Positif	+
Negatif	-

3.8.2 Penyajian Data

Data yang diperoleh dari penelitian adalah data yang menunjukkan ada atau tidaknya cemaran bakteri *Coliform* pada sampel susu kedelai yang dianalisis menggunakan metode MPN. Data yang dihasilkan akan disajikan dalam bentuk tabel seperti pada tabel dibawah :

Tabel 3. 2 Uji Penduga

Kode Sampel	Tingkat Pengenceran									Jumlah Tabung Positif
	10^{-1}			10^{-2}			10^{-3}			
	Tabung 1	Tabung 2	Tabung 3	Tabung 1	Tabung 2	Tabung 3	Tabung 1	Tabung 2	Tabung 3	

Tabel 3. 3 Uji Penegas

Kode Sampel	**Tingkat Pengenceran**									**Jumlah Tabung Positif**
	10^{-1}			**10^{-2}**			**10^{-3}**			
	Tabung 1	Tabung 2	Tabung 3	Tabung 1	Tabung 2	Tabung 3	Tabung 1	Tabung 2	Tabung 3	

Nilai indeks MPN dapat dilihat dari jumlah tabung yang positif, mengacu pada tabel 3.4 yang berasal dari SNI 01-2897-1992:

Tabel 3. 4 Nilai indeks MPN

Kombinasi/Jumlah tabung yang positif			**MPN per gram/ atau ml**
1:10	**1:100**	**1:1000**	
0	0	0	<3
0	0	1	3
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1 100
3	3	3	>2 400