

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah keseluruhan kelompok target yang menjadi sumber untuk pengambilan sampel. Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh produk minuman sari kedelai tanpa merk yang dijual di Pasar Karesidenan Surakarta.

Sampel adalah bagian dari populasi yang diambil sebagai sumber informasi dari seluruh data, dan memiliki peran penting dalam menjawab permasalahan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah minuman sari kedelai tanpa merk yang diambil dari 3 Pasar yang ada di Karesidenan Surakarta pada bulan Maret.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama mencakup identifikasi semua variabel yang diteliti secara langsung. Variabel dalam penelitian ini adalah nilai Angka Lempeng Total (ALT) dan nilai cemaran *Salmonella sp.* minuman sari kedelai tanpa merk yang dijual di Pasar Karesidenan Surakarta.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel bebas adalah variabel yang dirancang untuk menguji pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah minuman sari kedelai tanpa merk yang dijual di Pasar Karesidenan Surakarta.

Variabel tergantung dipengaruhi oleh variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah nilai Angka Lempemng Total (ALT) dan nilai cemaran *Salmonella sp.* pada minuman sari kedelai tanpa merk dari 3 Pasar yang ada di Karesidenan Surakarta.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi hubungan antara variabel bebas dengan variabel tergantung. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah pengambilan sampel, kondisi analisis proses pembuatan dan pengolahan minuman sari kedelai tanpa merk dengan kualitas bahan, alat, wadah yang digunakan, dan proses pengemasan higienie dan sanitasi tempat pengolahan.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, Kedelai adalah tanaman yang sangat penting untuk memenuhi kebutuhan pangan dan meningkatkan gizi masyarakat.

Kedua, minuman sari kedelai adalah salah satu produk olahan yang dihasilkan melalui ekstraksi dari kedelai. Minuman ini dikenal kaya akan gizi, terutama karena kandungan proteinnya yang melimpah.

Ketiga, Keamanan pangan adalah bidang ilmu yang mempelajari teknik dalam menyiapkan, menangani, dan menyimpan makanan atau minuman.

Keempat, *Salmonella sp.* adalah patogen zoonosis yang termasuk dalam keluarga Enterobacteriaceae, yang terdiri dari bakteri gram negatif.

Kelima, Metode penetapan Angka Lempeng Total (ALT) merupakan teknik yang digunakan untuk menghitung jumlah bakteri mesofil dalam setiap mililiter atau gram dari sampel makanan yang diuji.

Keenam, PerBPOM No.13 Tahun 2019 adalah peraturan yang mengatur tentang batas cemaran mikroba dalam pangan olahan.

C. Bahan dan Alat

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, cawan petri, pipet volume, botol steril, objek glass, cover glass, mikroskop, rak tabung reaksi, jarum ose, jarum inokulum, kapas steril, incubator, enkas, autoklaf, Laminar Air flow, gelas kimia, oven, *colony counter*, pembakar spirtus, penjepit tabung, filler, neraca analitik, batang pengaduk, vortex mixer,

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah minuman sari kedelai tanpa merk, Media *Nutrient Agar* (NA), NaCl 0,9%, aquades, Media *Salmonella Shigela Agar* (SSA), *Buffer pepton water 1%*, *Selenite Cysterin Borth*, *Crystal violet*, iodine, etanol, *Safranin*, minyak emersi, KIA, LIA, SIM, Citrat, Erlich A dan Erlich B.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel minuman sari kedelai tanpa merek dilakukan pada pagi hari, antara pukul 07.00 hingga 10.00 WIB. Sampel diambil dari tiga lokasi berbeda, yaitu Pasar Mojosoongo, Pasar Semanggi, dan Pasar Gede. Pada masing-masing pasar, sampel diperoleh dari satu penjual. Dari setiap penjual diambil lima sampel minuman sari kedelai. Seluruh sampel kemudian dipindahkan ke dalam botol steril, lalu dibawa ke laboratorium untuk dilakukan pengujian mikrobiologi.

2. Sterilisasi Alat

Sterilisasi peralatan dilakukan dengan metode panas kering pada suhu 170°C hingga 180°C selama 1 - 2 jam. Sebelum disterilisasi, alat-alat yang akan digunakan untuk pengujian sampel dicuci bersih dan dikeringkan terlebih dahulu. Setelah itu, peralatan dibungkus menggunakan kertas, kemudian dimasukkan ke dalam oven sterilisasi kering.

3. Sterilisasi bahan

Bahan yang akan digunakan untuk pengujian disterilkan dalam autoklaf pada tekanan 1 APM dengan suhu 121°C selama 15 menit.

4. Preparasi Sampel Minuman Sari Kedelai

Sebanyak 1 ml sampel dimasukkan dalam tabung reaksi yang telah berisikan 9 ml NaCl fisiologis 0,9% kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* dan diperoleh pengenceran 10^{-1} .

5. Pengujian Sampel Minuman Sari Kedelai

5.1 Uji Angka Lempeng Total (ALT).

Membuat seri pengenceran sampel sampai 10^{-5} dengan menyiapkan Labu Tentukur 10 mL sebanyak 4 buah dengan masing - masing diisi 9 mL pengencer NaCl fisiologis 0,9%, mengambil 1 ml dari pengenceran 10^{-1} kemudian dimasukkan dalam tabung pertama hingga diperoleh pengenceran 10^{-2} , dipipet 1 ml dari tabung pengenceran 10^{-2} dan dimasukkan kedalam tabung kedua lalu dihomogenkan dan diperoleh pengenceran 10^{-3} , perlakuan yang sama dilakukan pada tabung seterusnya sampai tabung ke empat (pengenceran 10^{-5}). Mengambil enam cawan petri steril. Memipet 1 mL dari masing – masing pengenceran dengan pipet steril dan dimasukkan kedalam masing – masing cawan petri. Menuangkan media *Nutrient Agar* (NA) sekitar 12mL hingga 15mL kedalam masing-masing cawan petri, mencampurkan media dengan sampel secara hati-hati dengan memutar cawan petri seperti membentuk angka delapan, lalu biarkan campuran tersebut memadat. Setelah pemadatan cawan petri dibungkus dengan kertas koran dan ditempatkan dengan posisi terbalik dalam inkubator pada suhu 27°C untuk inkubasi selama 1x24 jam. Setelah itu koloni dihitung dengan *colony counter* dan dinyatakan nilai Angka Lempeng Total (ALT) sesuai dengan ketentuan perhitungan Angka Lempeng Total (ALT).

5.2 Uji Cemar Bakteri *Salmonella sp.*

5.2.1 Pra-pengayaan

Pertama dilakukan tahap penyehatan bakteri *Salmonella sp.* yaitu dengan diambil sampel Minuman sari kedelai tanpa merek secara aseptis sebanyak 25 mL dari pengenceran 10^{-1} untuk ditanam pada 225 mL Buffer Pepton Water 1% dan di eramkan pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan adanya keruhan pada Buffer Pepton Water 1%.

5.2.1 Pengayaan

Tahap kedua dilakukan penanaman bakteri dari *Buffer Pepton Water 1%* pada media selektif, 1 mL bahan larutan sampel yang telah mengalami tahap penyehatan ditanam pada media air *Selenite Cystine Broth* (SCB), diinkubasi 37°C selama 24 jam hasil positif ditunjukkan dengan kekeruhan dan perubahan warna pada media dari warna kuning menjadi warna orange.

5.2.1 Isolasi

Tahap ketiga dilakukan isolasi, diambil 1 ose pada media *Selenite Cystine Broth* (SCB), dan digoreskan pada media *Salmonella Shigella Agar* (SSA), diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam. mengamati pertumbuhan koloni yang memiliki warna hitam dengan zona transparan. Hasil koloni tersebut kemudian dilakukan pewarnaan gram Hasil koloni tersebut kemudian dilakukan pewarnaan gram.

5.2.1 Identifikasi pewarnaan Gram

Langkah pewarnaan Gram dilakukan dengan membersihkan objek glass dengan kapas yang sudah dibasahi dengan alkohol, mensterilkan dengan pemanasan api busen. Menuliskan kode atau nama bakteri pada sudut object glass dengan spidol permanen. Mengambil aquadest dengan ose sebanyak 2-3 ose, biakan pada media *Salmonella Shigella Agar* (SSA) dipindahkan dengan jarum inokulum, satu ulasan kemudian disebar supaya sel merata. mengeringkan ulasan sambil memfiksasinya dengan api busen. Meneteskan Gram A (kristas violet) sebagai pewarna utama tunggu selama 1 menit, cuci dengan aquadest mengalir. Meneteskan Gram B (mordan, lugol, iodine) sebagai pengintensif warna lalu tunggu 1 menit, cuci dengan aquades mengalir. Meneteskan Gram C sebagai larutan pemucat (etanol 96% dan aseton) setetes demi setetes hingga berwarna pucat/ Jernih, cuci dengan aquades mengalir. Meneteskan Gram D atau counterstain (safranin) tunggu 1 menit, cuci dengan aquades mengalir. Mengeringkan preparat dengan kertas tissue yang ditempelkan pada sisi ulasan (jangan sampai merusak ulasan) lalu biarkan mengering diudara. Mengamati dengan mikroskop (perbesaran 100 x 10). Hasil positif gram negatif ditunjukkan dengan warna merah pada sel bakteri.

5.2.1 Uji biokimia

Dilakukan Uji Biokimia dengan cara menginokulasi masing - masing satu koloni bakteri pada media KIA, *Sulfur Indole Motility* (SIM), *Lysin Iron Agar* (LIA), dan Citrat dengan jarum ose secara aseptis. Hasil dicocokkan dengan tabel uji biokimia.

5.2.1.1 KIA. Koloni yang dicurigai tumbuh pada media *Salmonella Shigella Agar* (SSA) diinokulasikan dengan jarum inokulasi pada media KIA secara lurus dan disterilkan kembali. Setelah itu, satu koloni bakteri diambil dengan jarum ose lainnya secara aseptis dan digoreskan pada permukaan media. Inkubasi dilakukan dalam oven pada suhu 37°C selama 1×24 jam, lalu dilakukan pengamatan terhadap perubahan warna yang terjadi. Hasil positif ditunjukkan oleh perubahan warna media: dari kuning tua menjadi merah (tanpa fermentasi karbohidrat), kuning (fermentasi karbohidrat asam), dan hitam (reduksi sulfur).

5.2.1.2 Sulfur Indole Motility (SIM). Mengambil satu koloni bakteri secara aseptis menggunakan jarum inokulasi, kemudian diinokulasikan secara tegak lurus pada media. Setelah itu, jarum inokulasi disterilkan kembali. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 1×24 jam, kemudian ditambahkan reagen Erlich ke dalam media untuk mengamati reaksi positif yang ditandai dengan warna merah. Perubahan warna hitam menunjukkan adanya reduksi sulfur serta mobilitas atau pergerakan bakteri.

5.2.1.1 Lysin Iron Agar (LIA). Uji ini dilakukan dengan mengambil satu koloni bakteri secara aseptis menggunakan jarum inokulasi yang telah steril, kemudian diinokulasikan secara tegak lurus pada media. Setelah itu, satu koloni bakteri diambil lagi dengan jarum ose steril yang sama, dan digoreskan pada permukaan media dalam bentuk miring. Kemudian, jarum ose disterilkan kembali dan media diinkubasi dalam oven pada suhu 37°C selama 1×24 jam, sebelum diamati perubahan warna yang terjadi.

5.2.1.3 Citrat. Satu koloni bakteri diambil menggunakan jarum ose yang telah disterilkan dan digoreskan pada permukaan media citrat yang berbentuk miring. Setelah itu, jarum ose dipanaskan kembali untuk membunuh sisa bakteri yang ada. Selanjutnya, media tersebut diinkubasi dalam oven pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah periode inkubasi, diperiksa adanya perubahan warna pada media. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna agar dari hijau menjadi biru.

E. Analisis Hasil

Analisis hasil dalam penelitian ini dilakukan untuk mengetahui tingkat cemaran mikroba pada produk minuman sari kedelai tanpa merk yang dijual di Pasar Karesidenan Surakarta. Parameter yang dianalisis adalah Angka Lempeng Total (ALT) dan keberadaan bakteri *Salmonella* sp., dengan membandingkan hasil uji laboratorium terhadap batas maksimal yang ditetapkan dalam Per BPOM No. 13 Tahun 2019 yaitu Angka Lempeng Total (ALT) maksimum: 10^5 koloni/gram dan *Salmonella* sp. negatif dalam 25 gram sampel