

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Populasi Penelitian**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah susu kedelai yang dijual di Kecamatan Mojosongo, Surakarta, Jawa Tengah. Sampel susu kedelai dalam penelitian ini diambil dari empat pedagang yang berbeda yaitu: depan pasar Mojosongo, Depan Universitas Setia Budi, pedagang di Mojosongo atas, dan pedagang depan kampus UTP.

### **B. Variabel Penelitian**

#### **1. Identifikasi variabel penelitian**

Identifikasi variabel utama memuat identifikasi semua variabel yang diteliti langsung. Variabel utama dalam penelitian ini susu kedelai yang dijual di Mojosongo atas sebagai pedagang 1, depan pasar Mojosongo sebagai pedagang 2, depan Universitas Setia Budi pedagang sebagai 3, dan depan kampus UTP pedagang 4. Pemilihan pedagang dilakukan secara acak dengan pemastian produsen yang berbeda, sehingga dapat diketahui perbedaan kualitas antar produsen atau pedagang.

#### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel bebas yaitu variabel yang direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah susu kedelai yang dijual dari pedagang berbeda di Kecamatan Mojosongo, Surakarta.

Variabel tergantung dipengaruhi variabel bebas. Variabel yang dimaksud dalam penelitian ini adalah jumlah cemaran mikroba pada susu kedelai dari 4 sampel yang didapat dari pedagang berbeda di Kecamatan Mojosongo, Surakarta.

Variabel terkontrol adalah variabel yang dikendalikan yang mempengaruhi variabel tergantung selain variabel bebas. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah pengambilan sampel, kondisi analisis proses

pembuatan dan pengolahan susu kedelai dengan kualitas bahan, alat dan wadah yang digunakan, dan proses pengemasan higienie dan sanitasi tempat pengolahan.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, mikroba patogen adalah mikroba yang berbahaya jika mengkontaminasi minuman.

Kedua, susu kedelai merupakan ekstrak susu kedelai dengan proses pengolahan penggilingan dan perendaman melalui proses penyaringan, pemanasan sehingga mudah terkontaminasi oleh cemaran mikroba.

Ketiga, uji cemaran mikroba pada penelitian ini adalah, bakteri *Enterobacteriaceae*, *Salmonella sp.*

Keempat, isolat mikroba merupakan mikroba yang tumbuh dan diperoleh dari media uji.

Kelima, identifikasi mikroba dilakukan secara makroskopis yang diperoleh dari hasil isolasi pada media uji.

## **C. Tempat dan waktu penelitian**

### **1. Tempat penelitian**

Pengujian uji cemaran mikroba pada susu kedelai dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

### **2. Waktu penelitian**

Penelitian uji cemaran mikroba pada susu kedelai yang beredar di Kecamatan Mojosongo, Surakarta dilakukan pada bulan Januari 2020.

## **D. Alat dan Bahan**

### **1. Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, cawan petri, pipet volume 1, 2, 5, dan 10mL, erlenmeyer, botol steril, gelas obyek, *cover glass*, mikroskop cahaya, lampu spiritus, rak tabung reaksi, jarum ose dan inokulum, kapas steril, inkubator, oven, enkas dan autoklaf .

## 2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah sampel susu kedelai yang diambil secara acak dari 4 pedagang di area Kecamatan Mojosongo, Surakarta. Medium yang digunakan adalah *Nutrient Agar* (NA) untuk uji ALT, media *MacConkey* (MCA), Lactose BROTH, digunakan uji *Enterobacteriaceae*, media agar SIM, dan media *Salmonella Shigella Agar* (SSA) untuk uji *Salmonella sp*, *crystal violet*, *iodin*, *etanol*, *safranin*, minyak emersi, akuades (Brigita, S.N 2018).

## E. Metode Penelitian

### 1. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel yang digunakan untuk penelitian adalah susu kedelai yang dibeli dipedagang jajan yang berbeda distributor susu kedelai dari wilayah Mojosongo, Surakarta.

### 2. Sterilisasi Alat

Alat penelitian disterilisasi, bertujuan untuk terhindar dari kontaminasi mikroorganisme maupun senyawa lain dapat mempengaruhi hasil penelitian (Chatim dan Suharto 2014). Alat yang digunakan terlebih dahulu dicuci bersih dan dikeringkan. Tabung reaksi, erlenmeyer, cawan petri, gelas ukur, dan pipet volume yang ditutup dengan kapas, kemudian dibungkus dengan kertas perkamen. Alat tersebut disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15-20 menit kemudian, keringkan alat dalam oven (Emma 2018).

### 3. Sterilisasi Bahan

Bahan yang telah dipreparasi seperti: akuades steril, media NA untuk perhitungan jumlah koloni bakteri, media *Mac Conkey Agar* untuk uji *Enterobacteriaceae*, media *Buffer pepton*, *Salmonella Shigella Agar* (SSA) untuk pengujian *Salmonella sp.*, media LB untuk pengenceran sampel pada uji *Enterobacteriaceae*, KIA, SIM, LIA, dan Citrat digunakan untuk uji biokimia pada bakteri *Salmonella sp.*, kemudian disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15-20 menit (Emma 2018).

#### 4. Pembuatan Media

**4.1 Pembuatan *Nutrient Agar* (NA).** Serbuk NA ditimbang dengan timbangan analisis, sesuai dengan komposisi pada kemasan NA. Bahan tersebut dilarutkan dengan 1000 ml akuades dan dibagi menjadi 2 bagian. Bagian pertama untuk melarutkan *Beef extract* dan pepton, dan sebagian lagi untuk melarutkan agar. Larutan agar pada bagian diaduk secara konstan dengan hot plate stirrer, sedangkan akuades untuk melarutkan *Beef extract* dilakukan pengadukan. Proses selanjutnya dengan mencampurkan larutan tersebut dengan larutan agar dan diaduk sampai homogen. Pengaturan pH dengan kertas pH indikator (jika pH tidak netral dapat ditambahkan HCl/NaOH). Media NA disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C selama 15-20 menit, dan dituang pada cawan petri secara aseptis setelah suhu  $\pm 40^{\circ}\text{C}$ .

**4.2 Pembuatan *Mac Conkey Agar* (MCA).** Komposisi bahan Media *Mac Conkey* sebagai berikut: *peptone* 20 gram, *protoase peptone* 3 gram, *lactose* 20 gram, *bile salt* 5 gram, *crystal violet* 0,001 gram, *sodium chloride* 5 gram, *neutral red* 0,075 gram, Agar 12 gram. Bahan tersebut ditimbang, dan dilarutkan dengan akuades sebanyak 1 liter, kemudian dipanaskan dan aduk hingga mendidih. Sterilisasi dilakukan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit, tunggu hingga suhu 45°C-50°C, tuang dalam cawan petri.

**4.3 Pembuatan media *Salmonella Shigella Agar* (SSA)** Ditimbang serbuk SSA sebanyak 6,3 gram dan dimasukkan dalam erlenmeyer. Larutkan bubuk SSA dalam Erlenmeyer dengan akuades, diaduk hingga homogen. Larutan dipanaskan, diaduk hingga homogen. pH larutan diukur menggunakan pH stick, pH SSA adalah 7. Media dituang dalam cawan petri yang telah disterilkan, kemudian dinginkan.

#### 5. Preparasi Sampel

Sampel susu kedelai diambil dari 4 pedagang yang sumber produsennya berbeda di Kecamatan Mojosongo, Surakarta. Sampel dipindahkan pada botol steril kemudian diidentifikasi di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta untuk diteliti pada hari yang

sama. Susu kedelai sebanyak 25 ml dipindahkan dalam 4 masing- masing botol steril. Sampel susu kedelai dibuat seri pengenceran ( $10^{-1}$ ) dan ( $10^{-2}$ ) dengan pipet steril. Preparasi ini dilakukan secara aseptis dengan menggunakan alat yang steril (Adams dan Moss 2008). Berdasarkan BPOM nomor 13, tahun 2019 tentang batas maksimal cemaran mikroba dalam pangan olahan minuman sari susu kedelai (pasteurisasi) bahwa batasan cemaran mikroba yang diperbolehkan: ALT tidak lebih dari ( $10^4$ ) koloni/mL (1 *Enterobacteriaceae* tidak lebih dari 1 APM/mL dan *Salmonella* negatif /25 gram (BPOM 2019).

## 6. Pengujian Sampel Susu Kedelai

**6.1 Uji ALT.** Sampel susu kedelai pada uji ALT menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*). Pengujian dengan metode TPC merupakan salah satu cara untuk menghitung jumlah bakteri pada suatu sampel. Perhitungan koloni dengan metode TPC dapat dilakukan secara manual maupun koloni counter (Wahyu 2012). Prosedur pengujian sebagai berikut: sebanyak 1 mL sampel susu kedelai dilakukan pengenceran pertama ( $10^{-1}$ ), dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml akuades steril. Larutan dihomogenkan dengan *vortex* selama 3 menit. Pengenceran dari ( $10^{-1}$ ) dipipet 1 ml masuk dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL akuades steril. Perlakuan pengenceran dilakukan hingga pengenceran ( $10^{-4}$ ). Pengenceran ( $10^{-3}$ ) dan ( $10^{-4}$ ) dilakukan penanaman mikroba dengan cara *pour plate* yaitu diambil suspensinya satu ml masing-masing konsentrasi, dimasukkan ke cawan petri dengan media NA suhu  $45^{\circ}\text{C}$ . Media dihomogenkan sampai padat dan inkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 2x 24 jam. Hasil diamati dan dihitung jumlah koloni mikroba.

**6.2 Cara menghitung dan menyatakan hasil.** Sampel susu kedelai dilakukan perhitungan ALT dengan cara sebagai berikut:

- a. Dipilih cawan petri (simplo dan duplo) dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25-250 setiap cawan. Semua koloni dihitung dalam cawan petri dengan menggunakan alat penghitung koloni (*colony counter*). Dihitunh rata-rata jumlah koloni dan dikalikan dengan faktor pengenceran. Hasil dinyatakan sebagai jumlah bakteri per ml atau gram.

- b. Jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 atau lebih besar dari 250, dihitung rata-rata jumlah koloni, dikalikan dengan faktor pengenceran dan dinyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per ml atau gram.
- c. Jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25-250 koloni, dihitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran, dan dihitung rata-rata jumlah koloni dari kedua pengenceran tersebut. Jika jumlah tertinggi lebih besar dari dua kali jumlah yang terkecil, jumlah yang lebih kecil dinyatakan sebagai jumlah bakteri per ml atau gram.
- d. Jika rata-rata jumlah koloni masing-masing cawan petri tidak terletak antara 25 dan 250 koloni, dihitung jumlah koloni dan dinyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan per ml atau gram.

**6.3 Uji Cemar *Enterobacteriaceae*.** Uji penduga pada sampel susu kedelai digunakan untuk mendeteksi bakteri koliform dengan metode MPN secara kualitatif. Uji kualitatif koliform tidak harus dilakukan secara lengkap tergantung dari berbagai faktor misalnya waktu, mutu bahan yang diuji, biaya, tujuan analisis, dan faktor-faktor lain. Sampel susu kedelai dari pengenceran ( $10^{-2}$ ) kemudian dipipet sebanyak satu mL, dimasukkan ke dalam tabung yang berisi media *lactose broth* (LB), diinkubasi dalam inkubator selama  $1 \times 24$  jam. Hasil positif dari media *lactose broth* (LB) masing-masing diambil menggunakan jarum ose steril lalu digores dipermukaan media *MacConkey Agar* (MCA) padat. Media yang telah digores selanjutnya diinkubasi pada inkubator dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama  $2 \times 24$  jam. Koloni pada *Enterobacteriaceae* pada media MCA memiliki warna merah muda (Darna *et al* 2018).

**6.4 Uji *Salmonella sp.*** Sampel dipipet secara aseptis sebanyak 1 mL pada pengenceran ( $10^{-1}$ ) untuk ditanam dalam media Buffer pepton dan diinkubasi  $2 \times 24$  jam, dipipet 1 ml dimasukkan pada *Selenite F* (SCF) 9 ml, kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan coklat. Hasil yang diperoleh diinokulasikan dengan metode tuang pada medium *Salmonella Shigella Agar*

(SSA) selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 2×24 jam. Koloni yang tumbuh dinyatakan positif apabila tumbuh warna hitam dengan zona kuning (As-Syifa 2015).

**6.4.1 Pewarnaan Gram.** Bakteri *Salmonella sp.* dilakukan pewarnaan Gram untuk melihat bentuk sel bakteri, morfologi dan susunan sel dengan bantuan alat mikroskop. Cara yang dilakukan yaitu: sterilisasi gelas obyek dengan alkohol, kemudian dilakukan preparat smear secara aseptis dan kering, fiksasi diatas nyala api spiritus, preparat *smear* diletakan pada rak pengecatan. Preparat kemudian ditetesi dengan cat utama Gram A (*crystal violet*) dan diamkan satu menit, cuci dengan aquadest mengalir dan tiriskan, kemudian ditetesi dengan larutan Gram B (lugol, iodin) dan diamkan satu menit, dan dicuci dengan akuades mengalir tiriskan, ditetesi dengan larutan Gram C atau larutan pemucat (etanol 96%), dibilas dengan akuades mengalir, dan terakhir ditetesi dengan cat penutup (safranin) Gram D dan diamkan 1 menit, kemudian bilas dengan akuades mengalir dan preparat dikeringkan. Preparat diamati dengan mikroskop perbesaran yang paling terkecil hingga perbesaran kuat sampai didapatkan gambar yang jelas.

**6.4.2 Uji Biokimia.** Uji biokimia dilakukan pada media KIA dari hasil identifikasi *Salmonella sp.* bertujuan untuk mengetahui adanya pada suatu bakteri yang diuji untuk memfermentasikan glukosa, laktosa. Hasil positif jika terdapat perubahan warna dari kuning tua menjadi merah (tidak ada fermentasi karbohidrat), kuning (ada fermentasi karbohidrat asam) dan hitam (reduksi sulfur) (Talaro Chess, 2012). Uji KIA dilakukan dengan cara: pengambilan koloni bakteri dengan jarum inokulasi secara aseptis pada media *Mac Conkey*, ditusukan pada media KIA secara lurus dan jarum inokulasi disterilkan kembali, diambil satu koloni bakteri yang sama dengan jarum ose secara aseptis pada media *Mac Conkey*, goreskan pada permukaan media. Inkubasi dalam oven pada suhu 37°C selama 1×24 jam, diamati perubahan warna.

**6.4.3 Uji Sulfur Indole Motility (SIM).** Uji SIM bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri yang diuji untuk menghasilkan *hydrogen sulfide*, timbulnya indol karena aktivitas enzim *triptopanas* dan ada tidaknya

pergerakan bakteri (Leboffe dan Pierce, 2008). Uji SIM dilakukan dengan cara: diambil satu koloni bakteri dengan jarum inokulasi yang telah aseptis. ditusukan pada media secara tegak lurus dan diaseptiskan kembali jarum inokulum, inkubasi dalam oven suhu 37°C selama 1×24 jam, kemudian ditetesi dengan reagen *Erlich* pada media untuk uji positif berwarna merah, diamati perubahan warna . Perubahan warna hitam ditandai adanya reduksi sulfur serta motilitas atau pergerakan bakteri.

**6.4.4 Uji *Lysin Iron Agar* (LIA).** Uji LIA bertujuan untuk mengetahui bakteri yang dapat mendekarboksilasi lisin. Uji LIA dilakukan dengan cara: diambil satu koloni bakteri dengan jarum inokulasi yang telah steril, ditusukkan pada media secara tegak lurus dan disterilkan kembali jarum inokulum. Satu koloni bakteri diambil dengan jarum *ose* yang telah disterilkan, digoreskan pada permukaan media bentuk miring media LIA sterilkan kembali jarum *ose*, inkubasi dalam oven pada suhu 37°C selama 1×24 jam, diaamati perubahan warna pada media.

**6.4.5 Uji Citrat.** Uji Citrat bertujuan untuk mengetahui bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Uji Citrat dilakukan dengan cara (Loboffe dan Pierce, 2008): diambil satu koloni bakteri dengan jarum ose yang telah disterilkan, digoreskan pada permukaan media bentuk miring Citrat, jarum ose dipanaskan kembali, inkubasi dalam oven pada suhu 37°C selama 1×24 jam, diamati perubahan warna pada media. Jika positif terdapat perubahan warna agar dari hijau menjadi biru pada media.