

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua target penelitian yang dijadikan bahan pengambilan sampel. Populasi dalam penelitian ini yaitu seluruh cincau hitam yang dijual dipasar Palur.

Sampel sendiri merupakan perwakilan dari populasi yang digunakan sebagai bahan uji penelitian yang berperan menjawab segala bentuk rumusan permasalahan dalam penelitian ini. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan cincau hitam yang dijual di pasar Palur dalam keadaan terbuka dan bersinggungan langsung dengan udara.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama berisi identifikasi semua variabel yang di teliti langsung. Variabel dalam penelitian ini adalah cincau hitam yang dijual di pasar Palur, Karanganyar.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Klasifikasi variabel utama pada penelitian ini terbagi menjadi beberapa macam variabel yang berupa variabel bebas dan variabel terikat.

Variabel bebas penelitian ini adalah cincau hitam yang dijual dipasar Palur. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah syarat cemaran mikroba yang disesuaikan dengan peraturan BPOM No.13 Tahun 2019. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah faktor-faktor yang dapat mempengaruhi variabel terikat seperti proses preparasi sampel, waktu inkubasi, dan suhu inkubasi.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, cincau hitam adalah gel seperti agar-agar yang terbuat dari ekstrak seluruh bagian simplisia *Mesona palustris*.

Kedua, uji cemaran mikrobiologi adalah pengujian yang bertujuan untuk mengetahui cemaran mikrobiologi guna mengetahui keamanan serta kualitas suatu produk pangan atau bahan baku pangan.

Ketiga, *Escherichia coli* merupakan salah satu bakteri yang mencemari cincau hitam yang dapat menyebabkan diare atau infeksi saluran pencernaan. Bakteri ini umum ditemukan pada saluran pencernaan dan menjadi salah satu bakteri patogen penyebab Foodborne disease atau penyakit yang ditularkan melalui makanan atau minuman yang tercemar.

Keempat, *Salmonella sp.* merupakan bakteri Gram negatif yang mencemari cincau hitam dan umum ditemukan pada saluran gastrointestinal.

Kelima, Uji MPN merupakan metode penelitian kuantitatif yang digunakan untuk menghitung jumlah koloni bakteri *Escherichia coli* yang ditanam dalam media cair dengan beberapa seri pengenceran sehingga didapat perkiraan jumlah mikroorganisme terdekat.

Keenam, aturan BPOM No. 13 Tahun 2019 adalah peraturan yang dikeluarkan oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan yang mengatur tentang batas maksimal cemaran mikroba dalam pangan olahan.

C. Bahan dan Alat

1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi tabung reaksi, tabung durham, pipet ukur steril (10mL, 1 mL, dan 0,1 mL), cawan petri, jarum ose dan jarum ent, rak kayu, tabung reaksi, Erlenmeyer, gelas beaker, lampu spiritus, laminar air flow (LAF), neraca analitik, autoclave, inkubator, *object glass*, dan pisau spatel steril

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel cincau A dan B, aquadest, alkohol 70%, alkohol 96%, minyak spiritus, tisu, kapas, reagen LB, kristal violet, iodine, safranin, media BGLB, Buffer pepton, Selenit, media SSA, EA, KIA, SIM, LIA, Sitrat, Erlich A dan Erlich B.

D. Jalannya Penelitian

1. Sterilisaasi alat

Alat yang digunakan pada proses praktikum yaitu cawan petri, Erlenmeyer, pipet ukur, dan tabung reaksi dilakukan proses sterilisasi dengan mencuci bersih dan dikeringkan kemudian dibungkus dengan kertas koran hingga seluruh bagian tertutup rapat. Selanjutnya alat-alat yang akan di sterilisasi dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 160-180°C selama 2 jam.

2. Pengumpulan sampel

Dikumpulkan sebanyak 2 sampel cincau hitam yang dijual di pasar Palur dari pedagang yang berbeda dan masing-masing pedagang diambil sebanyak 5 sampel. Sampel cincau hitam dibeli dari masing-masing pedagang dalam keadaan terbungkus plastik yang kemudian dibawa ke laboratorium mikrobiologi dan dipindahkan ke dalam wadah steril berupa cawan petri steril. Pengumpulan sampel dilakukan pada pagi hari sekitar pukul 07.00-08.00.

3. Preparasi sampel

Preparasi sampel cincau hitam untuk pengujian cemaran bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella sp* adalah sebagai berikut :

3.1 Uji cemaran *Escherichia coli*. Pengujian *Escherichia coli* menggunakan metode MPN dilakukan dengan menimbang sampel cincau hitam sebanyak 10 gram dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang telah diisi oleh aquadest sebanyak 90mL.

3.2 Uji cemaran *Salmonella sp*. Pengujian *Salmonella sp* dilakukan dengan menimbang sebanyak 25 gram sampel cincau hitam kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang telah diisi buffer pepton sebanyak 225mL.

4. Uji cemaran bakteri *Escherichia coli*

Uji cemaran bakteri *Escherichia coli* pada cincau hitam dilakukan dengan menggunakan metode MPN. Metode ini terdiri dari beberapa rangkaian pengujian yaitu uji penduga, penegas dan uji pelengkap yang akan dilanjutkan dengan uji pewarnaan Gram dan uji biokimia. Tahapan dari masing-masing pengujian adalah sebagai berikut:

4.1 Uji penduga. Menyiapkan sebanyak 9 tabung reaksi yang digunakan untuk membuat seri pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , dan 10^{-3} dengan masing-masing pengenceran berjumlah 3 tabung dan masing-masing tabung disetiap seri pengenceran terdapat tabung durham dalam kondisi terbalik. Pada tabung seri pengenceran 10^{-1} diisi dengan media *Lactosa Broth* (LB) sebanyak 10 mL, sementara pada seri pengenceran 10^{-2} diisi sebanyak 5 mL media *Lactosa Broth* (LB) dan seri pengenceran 10^{-3} diisi media *Lactosa Broth* (LB) sebanyak 3 mL. Sampel dipipet berturut-turut sebanyak 10 mL, 1 mL dan 0,1 mL untuk seri pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , dan 10^{-3} . Tabung yang sudah terisi oleh sampel kemudian di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan amati kekeruhan serta gas pada tabung durham. Semua proses dilakukan secara aseptis.

4.2 Uji penegas. Memindahkan 1 ose tabung yang positif secara aseptik ke dalam media BGLB cair yang dilengkapi tabung durham didalamnya kemudian diinkubasi pada suhu 44°C selama 24 jam untuk pengujian bakteri *Escherichia coli*. Pengamatan tabung positif dilakukan dengan melihat kekeruhan dan timbulnya gas yang ditandai dengan terbentuknya ruang kosong pada tabung durham. Penentuan jumlah bakteri *Escherichia coli* dalam cincau hitam merujuk pada tabel MPN.

4.3 Uji pelengkap. Diambil 1 ose dari tabung positif hasil uji penegas kemudian diinokulasikan pada media Endo Agar (EA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Pada media Endo Agar (EA) koloni *Escherichia coli* memiliki ciri khusus yaitu koloni berwarna kilat logam. Pengujian dilanjutkan dengan pewarnaan Gram dan uji biokimia yang dilakukan dengan cara sebagai berikut :

4.3.1 Pewarnaan Gram. Bersihkan object glass dengan menggunakan kapas yang sudah dibasahi dengan alkohol kemudian sterilkan dengan pemanasan api bunsen. Mengambil aquades sebanyak 2-3 ose secara aseptis kemudian letakkan pada object glass dan ambil koloni yang sebelumnya sudah ditanam pada media Endo Agar (EA) kemudian ratakan diatas object glass dan keringkan ulasan tersebut diatas api bunsen. Teteskan kristal violet (Gram A) sebagai pewarna utama tunggu selama 1 menit kemudian cuci dengan aquades mengalir. Teteskan

cairan Gram B (mordant, iodine) sebagai pengintensif warna lalu tunggu selama 1 menit dan cuci dengan aquades mengalir. Selanjutnya beri larutan pemucat berupa alkohol 96% atau aseton (Gram C) tunggu sekitar 15 detik kemudian cuci dengan aquades yang mengalir. Teteskan safranin (Gram D) sebagai counterstain dan tunggu selama 1 menit kemudian cuci menggunakan aquades yang mengalir. Keringkan preparat dan amati dibawah mikroskop. Pada uji pewarnaan Gram, bakteri Gram negatif memiliki warna merah safranin.

4.3.2 Uji biokimia. Uji biokimia dilakukan dengan mengambil koloni yang sama dalam pewarnaan Gram menggunakan jarum ent yang telah disterilkan kemudian dilakukan penanaman koloni pada media uji biokimia. Media uji biokimia yang digunakan yaitu SIM, KIA, LIA dan Sitrat. Pada media Sitrat, KIA dan LIA cara inokulasi dilakukan dengan menusuk dan menggores koloni bakteri pada permukaan media. Pada media SIM inokulasi dilakukan dengan memasukkan koloni bakteri ke dalam media dan jarum yang sudah digunakan untuk mengambil koloni bakteri disterilkan kembali untuk membunuh sisa bakteri yang masih menempel pada jarum ent. Tabung uji biokimia kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

5. Uji cemaran bakteri *Salmonella sp*

Uji cemaran bakteri *Salmonella sp* pada cincau hitam dilakukan dengan beberapa yang dimulai dengan proses pra-pengayaan dilanjutkan dengan proses pengayaan, isolasi biakan bakteri pada media SSA dan diakhiri dengan identifikasi menggunakan pewarnaan Gram dan uji biokimia.

5.1 Pra-pengayaan. Menimbang sebanyak 25 gram sampel cincau hitam dan dimasukkan kedalam erlenmeyer yang telah diisi dengan 225mL Buffer pepton kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan adanya kekeruhan pada larutan Buffer pepton.

5.2 Pengayaan. Dilakukan proses pengayaan pada sampel pra-pengayaan yang terjadi kekeruhan dengan mengambil larutan pra-pengayaan secara aseptis sebanyak 1mL menggunakan pipet ukur kemudian dimasukkan ke dalam media Sellenit Broth yang sudah disiapkan sebelumnya dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

5.3 Isolasi dan identifikasi. Dilakukan proses isolasi dan identifikasi pada hasil pengayaan yang terjadi kekeruhan dengan mengambil 1 ose dari suspensi media Sellenit Broth secara aseptis dan diinokulasikan pada media Salmonella Shigela Agar (SSA) kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengujian dilanjutkan dengan melakukan pewarnaan Gram dan pengujian biokimia untuk melihat sifat fisiologis dari bakteri yang tumbuh. Pewarnaan Gram dan uji biokimia dilakukan dengan cara sebagai berikut :

5.3.1 Pewarnaan Gram. Bersihkan object glass dengan menggunakan kapas yang sudah dibasahi dengan alkohol kemudian sterilkan dengan pemanasan api bunsen. Mengambil 2-3 ose aquades secara aseptis kemudian letakkan pada object glass dan ambil koloni yang sebelumnya sudah ditanam pada media SSA kemudian ratakan diatas object glass dan keringkan ulasan tersebut diatas api bunsen. Teteskan kristal violet (Gram A) sebagai pewarna utama tunggu selama 1 menit kemudian cuci dengan aquades mengalir. Teteskan cairan Gram B (mordant, iodine) sebagai pengintensif warna lalu tunggu selama 1 menit dan cuci dengan aquades mengalir. Selanjutnya beri larutan pemucat berupa alkohol 96% atau aseton (Gram C) tunggu sekitar 15 detik kemudian cuci dengan aquades yang mengalir. Teteskan safranin (Gram D) sebagai counterstain dan tunggu selama 1 menit kemudian cuci menggunakan aquades yang mengalir. Keringkan preparat dan amati dibawah mikroskop. Pada uji pewarnaan Gram, bakteri Gram negatif memiliki warna merah safranin.

5.3.2 Uji biokimia. Uji biokimia dilakukan dengan mengambil koloni yang sama dalam pewarnaan Gram menggunakan jarum ent yang telah disterilkan kemudian dilakukan penanaman koloni pada media uji biokimia. Media uji biokimia yang digunakan yaitu SIM, KIA, LIA dan Sitrat. Pada media Sitrat, KIA dan LIA cara inokulasi dilakukan dengan menusuk dan menggores koloni bakteri pada permukaan media. Pada media SIM inokulasi dilakukan dengan menusukkan koloni bakteri ke dalam media dan jarum yang sudah digunakan untuk mengambil koloni bakteri disterilkan kembali untuk membunuh sisa bakteri yang masih menempel pada jarum ent. Tabung uji biokimia kemudian diinkubasi selama 24jam pada suhu 37°C.

E. Analisis Hasil

Data hasil analisis disajikan dalam bentuk tabel, penentuan hasil dilakukan dengan membandingkan hasil uji cemaran mikroba pada sampel cincau hitam dengan batas uji cemaran yang sudah ditetapkan oleh BPOM. Apabila terdapat cemaran bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella sp* pada salah satu pengenceran, maka dapat disimpulkan bahwa sampel tidak memenuhi persyaratan BPOM No. 13 tahun 2019. Hasil uji identifikasi dilakukan dengan pewarnaan Gram dan uji biokimia.

Tabel 2. Tabel *Most Probable Number* (MPN) menurut formulasi Thomas

Jumlah tabung positif tiap pengenceran			MPN per 100 mL	Jumlah tabung positif tiap pengenceran			MPN per 100 mL
10 mL	1 mL	0,1 mL		10 mL	1 mL	0,1 mL	
0	0	0	0	2	0	0	10
0	1	0	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	19
0	0	3	9	2	0	3	24
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6	2	1	1	20
0	1	2	9	2	1	2	25
0	1	3	12	2	1	3	30
0	2	0	6	2	2	0	21
0	2	1	9	2	2	1	26
0	2	2	12	2	2	2	31
0	2	3	16	2	2	3	37
0	3	0	9	2	3	0	27
0	3	1	13	2	3	1	33
0	3	2	16	2	3	2	38
0	3	3	19	2	3	3	44
1	0	0	4	3	0	0	29
1	0	1	7	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	49
1	0	3	14	3	0	3	60
1	1	0	7	3	1	0	46
1	1	1	11	3	1	1	58
1	1	2	15	3	1	2	72
1	1	3	18	3	1	3	86
1	2	0	11	3	2	0	76
1	2	1	15	3	2	1	95
1	2	2	19	3	2	2	116
1	2	3	23	3	2	3	139
1	3	0	15	3	3	0	190
1	3	1	19	3	3	1	271
1	3	2	23	3	3	2	438
1	3	3	27	3	3	3	≥1898