

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah jamu gendong kunyit asam yang berasal dari para pedagang di wilayah Kecamatan Nguter, Kabupaten Sukoharjo

Sampel produk jamu gendong kunyit asam diambil dari pedagang dengan perbandingan proses pengolahan dari 3 sampel diproduksi secara tradisional dan 3 sampel secara semi modern serta sampel diambil secara acak.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama adalah produk jamu kunyit asam dengan pengolahan sampel yang dilakukan secara tradisional dan semi modern berasal dari pedagang yang berada di wilayah kecamatan Nguter, kabupaten Sukoharjo.

Variabel utama kedua adalah Angka Lempeng Total dari sampel jamu gendong kunyit asam.

Variabel utama ketiga adalah cemaran *Salmonella sp* dari sampel jamu gendong kunyit asam.

Variabel utama keempat adalah standar Angka Lempeng Total dan cemaran *Salmonella sp* berdasarkan BPOM

2. Klasifikasi Variabel Utama

Klasifikasi diperlukan untuk menentukan pengambilan data dan metode analisis data yang berdasarkan hubungan antara sebab dan akibat menjadi variabel bebas, variabel terkendali dan juga variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah jamu gendong kunyit asam yang beredar di kecamatan Nguter, kabupaten Sukoharjo. Variabel terkendali pada penelitian ini meliputi proses penelitian, waktu inkubasi, suhu inkubasi, waktu pengambilan sampel, media uji, jumlah sampel. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah Angka Lempeng Total dan cemaran *Salmonella sp*.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, jamu gendong kunyit asam pengolahan tradisioal adalah jamu yang pengolahannya dilakukan secara tradisional dengan penumbukan menggunakan lumpang, perebusan dilakukan 1 kali.

Kedua, jamu gendong kunyit asam pengolahan secara semi modern adalah jamu yang pengolahannya dilakukan secara semi modern dengan menggunakan alat elektronik berupa blender dan proses perebusan dilakukan sebanyak 2-3 kali.

Ketiga, Angka Lempeng Total adalah jumlah koloni yang tumbuh pada media Nutrien Agar dengan suhu inkubasi 37°C selama 24-48 jam. Inokulasi dilakukan dengan metode tuang.

Keempat, *Salmonella sp* adalah koloni bakteri berwarna hitam yang tumbuh pada media SSA hasil metode sebar dari jamu kunyit asam

Kelima, Koloni adalah pertumbuhan koloni mikroorganisme yang terlihat pada media pertumbuhan.

Keenam, Standar Angka Lempeng Total adalah tidak lebih dari 5×10^7 CFU/mL berdasarkan Peraturan BPOM No. 29 Tahun 2023

Ketujuh, Standar Cemaran *Salmonella sp* adalah Negatif/g berdasarkan Peraturan BPOM No. 29 Tahun 2023

C. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan untuk analisis adalah sampel jamu gendong kunyit asam, media *nutrient* agar (NA), aquades steril, media *Buffer Pepton*, media *Sellenit Broth*, media *Salmonella Shigella Agar* (SSA), kristal violet (Gram A), Lugol/Iodine (Gram B), etanol 96% (Gram C), Safranin (Gram D). Peralatan yang digunakan adalah Laminar Air Flow (LAF), inkubator, *colony counter*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan petri, pipet ukur, pemanas spirtus, mikroskop, autoklaf.

D. Jalannya Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode ALT dan pengujian *Salmonella sp*.

1. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel jamu kunyit asam dalam penelitian ini diambil di daerah yang berbeda-beda secara acak sebanyak 1 botol dari masing-masing pedagang. Pengambilan sampel produk jamu kunyit asam dilakukan secara langsung dan dilakukan analisis di hari yang sama untuk mencegah kerusakan (basi) dan berkurangnya khasiat dalam jamu kunyit asam apabila terlalu lama disimpan.

2. Preparasi Sampel

Sampel jamu gendong kunyit asam masing-masing dipipet sebanyak 1 ml. Kemudian dimasukkan ke tabung reaksi berisi pengencer aquades steril sebanyak 9 ml, kocok sampai homogen dan beri label sebagai pengenceran 10^1 . Untuk pengenceran masing-masing sampel menggunakan 7 buah tabung reaksi dan berisi pengencer aquades steril 9 ml dan beri label 10^1 sampai 10^7 . Dari hasil homogenisasi 10^1 pipet 1 ml dimasukkan ke tabung reaksi 10^2 , kocok sampai homogen. Dilanjutkan dengan cara yang sama sampai pengenceran 10^7 .

3. Uji Angka Lempeng Total (ALT)

Sampel jamu yang telah dilakukan pengenceran menggunakan aquades steril dengan seri pengenceran 10^{-1} hingga 10^{-7} diberi label. Kemudian dari 4 pengenceran terakhir ditanam pada media NA (*Nutrient Agar*). Dalam tiap cawan petri dituangkan 10 ml media NA, kemudian segera cawan petri digoyang dan diputar membentuk angka 8 supaya media merata. Uji kontrol digunakan untuk mengetahui sterilitas media dan pengencer. Setelah media memadat, cawan petri diinkubasi pada suhu $35-37^{\circ}\text{C}$ selama 24-48 jam dan posisi terbalik. Menggunakan *colony counter* untuk mengamati dan menghitung jumlah koloni yang tumbuh.

4. Identifikasi Cemar *Salmonella sp*

4.1 Pra-Pengkayaan sampel pada media *Buffer Pepton*

Sampel jamu diambil secara aseptis dipipet sebanyak 1 mL dari seri pengenceran 10^{-1} kemudian ditanam pada media Buffer Pepton 1% dan diinkubasi selama 1 kali 24 jam pada suhu 37°C .

4.2 Pengkayaan sampel pada media *Selenit Broth*

Setelah dilakukan penyehatan kemudian diambil 1 ml biakan sampel ditanam pada media air *Selenite Cystine Broth (SCB)*, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 kali 24 jam.

4.3 Isolasi pada media spesifik diferensial

Sampel yang telah disuburkan diambil 1 ose kemudian ditanam pada media *Salmonella Shigella Agar (SSA)* dengan teknik goresan kuadran. diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Amati pertumbuhan koloni berwarna hitam dengan zona kuning.

5. Pewarnaan Gram

Media SSA yang dicurigai sebagai bakteri *Salmonella sp*, diambil 1 ose lalu diletakkan pada objek glass kemudian diratakan dan difiksasi dengan dilewatkan diatas pemanas spirtus. Teteskan satu tetes kristal violet (Gram A) diatas kaca preparat selama 1 menit lalu cuci menggunakan air mengalir. Selanjutnya teteskan larutan lugol (Gram B) selama 1 menit lalu cuci preparat menggunakan air mengalir. Teteskan etanol 96% (Gram C) kemudian diamkan selama 30 detik dan cuci menggunakan air mengalir hingga warnanya hilang. Kemudian teteskan 1 tetes safranin (Gram D) lalu didiamkan selama 1 menit, setelah itu di cuci menggunakan air mengalir dan dikering anginkan. Amati hasil dibawah mikroskop.

6. Uji Biokimia

Uji biokimia bakteri dilakukan untuk mengidentifikasi dan menfermentasi suatu biakan murni bakteri hasil isolasi melalui sifat-sifat fisiologinya. Uji biokimia dilakukan penanaman pada media TSIA, SIM, LIA, KIA, Citrate. Suhu inkubasi 37°C selama 24 jam.

6.1 Uji Pada Media SIM. Koloni yang diduga bakteri *Salmonella sp* diambil menggunakan jarum end lalu ditusuk dan digores pada media SIM. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji SIM digunakan untuk pengujian sulfida, indol dan pertumbuhan bakteri dengan kemampuan motiliti. (Prisnanda & Wulandari, 2022).

6.2 Uji Pada Media KIA. Koloni yang diduga bakteri *Salmonella sp* diambil menggunakan jarum end lalu ditusuk dan digores pada media KIA. Kemudian

diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pada uji KIA apabila terjadi perubahan warna pada dasar media menjadi kuning maka menunjukkan bahwa bakteri mampu memfermentasi glukosa dalam suasana asam ditulis dengan penulisan huruf A, Sedangkan penulisan K artinya dasar media berwarna merah yang menunjukkan bahwa dalam suasana basa bakteri tidak dapat memfermentasi laktosa

6.3 Uji Pada Media LIA. Koloni yang diduga bakteri *Salmonella* sp diambil menggunakan jarum end lalu ditusuk dan digores pada media LIA. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji pada media LIA bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mendeaminasi atau mendekarboksilasi lisin dan pembentukan sulfida.

6.4 Uji Pada Media CITRAT. Koloni yang diduga bakteri *Salmonella* sp diambil menggunakan jarum end lalu ditusuk dan digores pada media Citrat. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pada uji Citrat untuk menentukan apakah bakteri menggunakan natrium sitrat sebagai sumber karbon. Peningkatan pH menyebabkan perubahan warna hijau menjadi biru. (Nur et al, 2022).

Tabel 1. Uji Biokimia Bakteri *Salmonella* sp

SIM	KIA	LIA	CITRAT
S : (+)	K/A	K/K	
I : (-)	S : (+)	S : (+)	(+)
M : (+)	G : (+)		

Keterangan : Positif (+): Memferentasi laktosa; Negatif (-): Tidak memfermentasi laktosa; **SIM:** Sulfida Indol Motility; **KIA:** Kliger Iron Agar; **LIA:** Lysine Iron Agar; **K/A:** Merah dan Kuning (pada media KIA); **K/K:** Warna ungu (pada media LIA); **S:** Sulfida (Hitam); **I:** Indol (cincin merah); **M:** Motilitas; **G:** Terbentuk gas