

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah diskriptif karena penelitian ini diambil berdasarkan hasil observasi dengan tujuan untuk mengetahui cemaran mikroorganisme pada jamu kunyit asam kemasan botol tanpa ijin PIRT di Kecamatan Batu.

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan, yaitu meliputi :

1. Pengambilan Sampel

Sampel diambil dengan salah satu metode Multi Stage Sampling yang artinya pengambilan sampel wilayah secara bertingkat. Sampel yang akan diambil yaitu sampel jamu kunyit asam yang diambil dari 2 kelurahan/desa di Kecamatan Batu

2. Tahapan Pelaksanaan

Tahap pelaksanaan pada penelitian ini yaitu untuk mengetahui nilai ALT dan AKK pada sampel jamu kunyit asam. Tahapan pengujian meliputi uji Angka Lempeng Total (ALT) dan uji Angka Kapang Khamir (AKK).

3. Tahapan Akhir

Pada tahapan ini dilakukan pengolahan data hasil analisis yang diperoleh berdasarkan hasil penelitian.

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah jamu kunyit asam kemasan botol tanpa ijin PIRT di Kecamatan Batu

3.2.2 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah sebagian jamu kunyit asam kemasan botol tanpa ijin PIRT yang diambil melalui multi stage cluster pada 2 desa di Kecamatan Batu.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Akademi Analis Farmasi dan Makanan Putra Indonesia Malang, dan waktu penelitian yang dibutuhkan mulai tahap pengambilan sampel, pelaksanaan dan tahapan akhir.

3.4 Definisi Operasional

Variabel dalam penelitian ini adalah jamu kunyit asam kemasan botol tanpa ijin PIRT yang ada di wilaya Kecamatan Batu

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Sub Variabel	Definisi Operasional Variabel	Hasil ukur/ indicator	Alat ukur	Skala ukur
Jamu kunyit asam non PIRT	-	Jamu kunyit asam terbuat dari kunyit dan asam yang dibuat dengan cara sederhana.	mL	Gelas ukur	Nominal
Cemaran mikroorganisme	Angka Lempeng Total (ALT)	Menghitung jumlah koloni yang tumbuh pada cawan per 1 mL sampel pada media PCA	Koloni/gram	Visual dan koloni counter	Nominal
	Angka Kapang Khamir (AKK)	Menghitung jumlah koloni yang tumbuh pada sampel 1 mL setelah inkubasi pada media PDA	Koloni/gram	Visual dan koloni counter	Nominal

3.5 Pengumpulan Data

3.5.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu batang pengaduk, erlenmeyer, taung reaksi, cawan petri, beakerglass, bunsen, mikropipet, shaker, autoclave, kawat nikron, kaki tiga, kawat kasa, timbangan analitik, rak tabung reaksi

Bahan yang digunakan yaitu aquades, kasa, kertas coklat, spirtus, pepton water, media PCA, media PDA,

3.5.2 Pengambilan Sampel

Sampel jamu kunyit asam kemasan botol tanpa ijin PIRT yang diperoleh dari Desa di Kecamatan Batu.

3.5.3 Uji Angka Lempeng Total (ALT) dan Angka Kapang Khamir (AKK)

a. Pembuatan media PCA

Pembuatan medium Palte Count Agar

Untuk membuat 1 liter medium ini, lakukanlah prosedur berikut:

- Timbang sebanyak 23,5 gram medium instant PCA.
- Suspensikan dalam akuades dan buat volume akhir menjadi 1000 ml.
- Panaskan sampai semua komponen larut (langkah ini bisa tdak dilakukan apabila tidak mempersiapkan agar tega/agar mirin dalam tabung reaksi).
- Sterilkan dengan autoclave pada suhu 121 °C pada tekanan 15 lbs, selama 15 menit.
- Media bisa dituang ke dalam cawan petri yang sudah di autoclave.
- Untuk satu cawan petri diameter 9,9mm, ketebalan 1,5 cm, maka volume agar yang

diperlukan sebanyak 17,5-20 ml untuk ketebalan media agar yang baik.

- Agar di tuang ke dalam cawan petri pada kondisi suhu media + 65-75°C. Pada suhu di bawah itu agar akan memadat.
- Biarkan agar dalam cawan petri membeku, tutup cawan di buka sampai agar memadat (20-30 menit dalam laminar flow).
- Simpan ditempat yang sejuk dan kering (dalam kulkas) dalam keadaan dibungkus kantong plastik dan agar diletakkan terbalik (bagian tutup cawan petri di bawah dan agar di atas).

b. Pembuatan Media PDA

- Formula medium PDA adalah 39 gram / liter aquades. Jadi untuk membuat 1 liter / 1000 ml larutan dibutuhkan sebanyak 39 gram medium PDA yang dilarutkan kedalam 1 liter aquades.
- Timbang medium menggunakan timbangan analitik agar lebih presisi.
- Larutkan 39 gram medium kedalam 1 liter aquades dengan cara dipanaskan pada suhu 80°C sambil diaduk menggunakan alat hot plate and magnetic stirrer. Pastikan medium larut dengan sempurna dan tidak meninggalkan gumpalan.
- Atur pH medium hingga mencapai 5.6 ± 0.2 .
- Masukkan medium kedalam masing-masing tabung erlenmeyer / tabung reaksi sesuai volume yang diinginkan dan tutup dengan rapat.
- Sterilisasi medium menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 Atm selama 15 menit.
- Setelah disterilisasi dan medium masih dalam kondisi cair (sekitar suhu 45-50 °C), medium dapat ditambah zat antibiotik (sesuai dosis) atau 1 ml asam laktat per 100 ml medium

hingga pH mencapai 3.5. Penambahan komponen ini bertujuan untuk menghindari pertumbuhan bakteri yang tidak diinginkan saat digunakan.

- Setelah komponen larut, medium dapat secara langsung dituang ke masing-masing cawan petri sesuai kebutuhan.

c. Pengenceran Sampel

Cara Kerja :

- Sampel yang mengandung bakteri dimasukkan ke dalam tabung pengenceran pertama ($1/10$ atau 10^{-1}) secara aseptis (dari preparasi suspensi).
- Perbandingan berat sampel dengan volume tabung pertama adalah 1 : 9 dan ingat akuades yang digunakan jika memakai teknik rinse dan swab sudah termasuk pengencer 10^{-1} .
- Dilarutkan dengan cara di vortex
- Diambil 1 ml dari tabung 10^{-1} dengan mikropipet kemudian dipindahkan ke tabung 10^{-2} secara aseptis kemudian dikocok dengan membenturkan tabung ke telapak tangan sampai homogen. Pemandahan dilanjutkan hingga tabung pengenceran terakhir (10^{-5}) dengan cara yang sama,

d. Pengujian ALT

Prosedur Pengujian Mikrobiologi sesuai dengan petunjuk Standar

Nasional Indonesia (SNI) 01-2332.3-2006 tentang Cara Uji Mikrobiologi Penentuan Angka Lempeng Total (ALT) pada produk adalah sebagai berikut :

- Diambil 1 mL sampel dari pengenceran 10^{-2} sampai 10^{-5} yang sudah dipersiapkan.
- Dimasukkan kedalam cawan petri yang berisi media PCA yang masih cair secara triplo.
- Dihomogenkan dengan cara cawan diputar putar pemutar cawan ke depan ke belakang dan ke kiri ke kanan.

- Setelah agar menjadi padat, untuk menentukan mikroorganisme aerobinkubasi cawan-cawan tersebut dalam posisi terbalik dalam inkubator selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu 35°C.
- Pembacaan dan perhitungan koloni pada cawan petri dengan menggunakan colony counter.

e. Pengujian AKK

- Diambil 1 mL sampel dari pengenceran 10^{-2} sampai 10^{-5} yang sudah dipersiapkan.
- Dimasukkan kedalam cawan petri yang berisi media PDA yang masih cair secara triplo.
- Dihomogenkan dengan cara cawan diputar putar pemutaran cawan ke depan ke belakang dan ke kiri ke kanan.
- Media PDA juga ditambahkan antibiotik kloramfenikol 1% yang bertujuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri padamedia sehingga yang tumbuh pada media hanya kapang dan khamir.
- Selanjutnya petri yang berisi agar tersebut diinkubasi selama 5 hari pada suhu 25°C.
- Suhu inkubasi kapang/khamir adalah 25°C. selama 3-5 hari dengan posisi terbalik karena Kapang/Khamir bersifat mesofilik yang dapat tumbuh pada suhu 25-30°C.
- Pembacaan dan perhitungan koloni pada cawan petri dengan menggunakan colony counter.

3.6 Analisa Data

Data yang diperoleh merupakan hasil dari penanaman sampel jamu pada media diferensial kemudian dilakukan uji ALT dan AKK 3 replikasi. Jika di dalam media tumbuh bakteri lebih dari syarat mutu yang di tentukan dapat di indikasikan jamu tersebut tidak layak untuk di konsumsi. Karena syarat dari sediaan jamu adalah ALT $\leq 10^4$ koloni/g dan AKK $\leq 10^3$. Data yang dipeoleh saat

pengujian cemaran bakteri di deskripsikan dalam bentuk tabel dan dibandingkan dengan syarat BPOM.