

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis Penelitian**

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian non-eksperimental komparatif. Penelitian ini membandingkan beberapa aplikasi penghitung koloni tanpa memberikan perlakuan khusus pada sampel. Penelitian komparatif dilakukan untuk mengidentifikasi perbedaan antara dua atau lebih variabel, kelompok atau kondisi (Arsyam dan Tahir, 2021).

#### **3.2 Waktu Dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2026 di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

#### **3.3 Populasi dan Sampel Penelitian**

##### **3.3.1 Populasi**

Populasi pada penelitian ini adalah produk coklat batang *repackaging* yang diperjual belikan dan diperoleh dari *online shop* berdasarkan penjualan tertinggi.

##### **3.3.2 Sampel**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah coklat batang *repackaging* dari 3 merek dan toko yang berbeda. Sampel dipilih menggunakan metode purposive sampling berdasarkan produk dengan tingkat penjualan tertinggi.

#### **3.4 Alat Dan Bahan**

##### **3.4.1 Alat**

Tabung reaksi, rak tabung reaksi, erlenmeyer (PYREX), cawan petri (Anumbra), inkubator (*Memmert*), *Colony Counter (In Scient Pro)*, autoklaf (PBI), oven (*Thermo Scientific*), *Laminar Air Flow (LAF)*, neraca analitik (RADWAG), pipet ukur (HBG), bola hisap, mikropipet, blue tip, spatula, batang pengaduk, hotplate stirer (CIMAREC), magnetic stirer, alu dan mortal, gelas beaker (IWAKI), gelas ukur (PYREX), bunsen, pemantik api.

### 3.4.2 Bahan

Cokelat batang *repackaging*, *Buffered Peptone Water* (BPW) (OXOID), media *Plate Count Agar* (PCA) (MRECK), akuadest.

## 3.5 Variabel Penelitian

### 3.5.1 Variabel Bebas (*Independent Variable*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah penghitungan koloni manual menggunakan *Colony counter* dan empat aplikasi penghitung koloni berbasis android, yaitu CFUCalc, Promega *Colony Counter*, *Colony Counter* PRO dan @BactLAB.

### 3.5.2 Variabel Terikat (*Dependent Variable*)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah koloni dalam cokelat batang *repackaging*.

### 3.5.3 Variabel Kendali

Pada penelitian ini aplikasi CFUCalc dioperasikan menggunakan *smartphone* Vivo Y-19 dengan kamera 16 MP, f/1.78. Sementara itu, aplikasi Promega *Colony Counter*, *Colony Counter* PRO dan @BactLAB menggunakan iPhone 11 dengan kamera belakang 12 MP, f/1.8. Pengujian akurasi dan presisi dilakukan menggunakan sampel cokelat *repackaging* yang ditumbuhkan pada media *Plate Count Agar* (PCA).

## 3.6 Definisi Operasional Variabel

**Tabel 3. 1 Definisi operasional variabel**

Variabel	Definisi Operasional	Skala Pengukuran	Metode dan Alat Pengukuran
Penghitung koloni	Menghitung koloni dengan alat <i>Colony Counter</i> dan Aplikasi yang digunakan (CFUCalc, Promega <i>Colony Counter</i> , <i>Colony Counter</i> PRO dan @BactLAB)	-	-

Jumlah koloni	Jumlah koloni bakteri dalam cokelat batang <i>repackaging</i> yang dijual di beberapa toko dan merk berbeda berdasarkan tingkat penjualan tertinggi.	Rasio	Perhitungan manual ( <i>Colony Counter</i> ) dan aplikasi CFUCalc, Promega <i>Colony Counter</i> , <i>Colony Counter</i> PRO dan @BactLAB
---------------	--	-------	---

### 3.7 Prosedur Penelitian

#### 3.7.1 Sterilisasi Alat

Persiapan sterilisasi alat yang terbuat dari keramik atau kaca disetrlisasi menggunakan metode panas kering dengan oven. Alat dibungkus dengan kertas dan diikat rapat menggunakan tali lalu dimasukkan dan dipanaskan dalam oven suhu 170°C selama 1-2 jam. Sedangkan alat yang tidak tahan panas dan bahan seperti media, BPW dan akuadest disterilisasi menggunakan metode panas basah dengan autoklaf. Alat dibungkus dengan kertas lalu diikat rapat. Kemudian dimasukkan kedalam autoklaf yang diatur pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm ditunggu selama 15 menit. Jika sudah selesai, autoklaf dimatikan dan ditunggu hingga tekanan turun kemudian alat dikeluarkan dan disimpan bersama alat steril yang lain.

#### 3.7.2 Pembuatan Media PCA

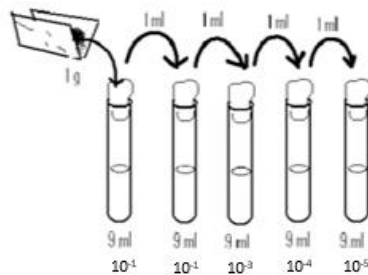
Sebanyak 11,25 gram bubuk PCA ditimbang dan dilarutkan dalam 500 ml aquades. Larutan dipanaskan hingga tercampur sempurna dan mendidih. Media kemudian dituangkan kedalam labu erlenmeyer, ditutup dengan kapas dan kertas, dan disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit.

#### 3.7.3 Pembuatan Larutan *Buffered Peptone Water* (BPW)

Padatan BPW ditimbang sebanyak 6 gram dilarutkan dalam 300 ml aquades. Panaskan hingga homogen sambil diaduk menggunakan magnetik stirer. Dipipet kedalam tabung reaksi masing-masing 9 ml dan tutup dengan kapas dan kertas lalu dimasukkan kedalam autoklaf pada proses sterilisasi selama 15-30 menit.

### 3.7.4 Preparasi Sampel

Sebanyak 1 gram sampel cokelat batang ditambahkan kedalam tabung reaksi yang berisi 9 mL larutan BPW untuk menyiapkan pengenceran  $10^{-1}$ . Untuk pengenceran  $10^{-2}$ , 1 mL larutan  $10^{-1}$  dipindahkan kedalam 9 mL larutan BPW dari tabung reaksi yang lain. Prosedur yang sama diulangi hingga diperoleh pengenceran  $10^{-5}$ , ilustrasi pengenceran dapat dilihat pada Gambar 3.1. *Plate Count Agar* (PCA) digunakan sebagai media pertumbuhan. Dari setiap pengenceran ( $10^{-1}$  hingga  $10^{-5}$ ), 1 mL sampel diambil menggunakan mikropipet dan diinokulasi ke cawan petri menggunakan metode tuang. Sekitar 12-15 mL media PCA kemudian ditambahkan kesetiap cawan. Cawan petri dikocok perlahan dan dibiarkan mengeras. Setelah itu, sampel diinkubasi pada suhu  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  selama 24-48 jam. Koloni bakteri kemudian diamati dan dihitung menggunakan metode *Total Plate Count* (Badan Standarisasi Nasional, 2014).



**Gambar 3. 1 Tingkat pengenceran pada preparasi sampel**

### 3.7.5 Pembacaan Dengan *Colony Counter* Dan Aplikasi

Penghitungan koloni secara manual dilakukan menggunakan alat *Colony Counter* yang dilengkapi dengan kaca pembesar agar koloni lebih mudah diamati. Koloni dihitung menggunakan pena listrik yang terhubung ke sistem penghitung. Setiap penekanan pada pena secara otomatis mencatat koloni yang dihitung dan menampilkan jumlah total pada layar LCD (Nilasari dkk., 2022). Aplikasi CFUcalc, Promega *Colony Counter*, *Colony Counter* PRO dan @BactLAB diunduh dari *PlayStore* atau *App Store* sebelum digunakan. Pembacaan koloni dilakukan 6 kali untuk setiap sampel menggunakan gambar yang diambil dari posisi yang sama. Pengamatan dilakukan setelah 48 jam inkubasi. Hasil yang diperoleh dari setiap

aplikasi kemudian dibandingkan dengan hasil perhitungan manual untuk mengevaluasi akurasi dan presisinya.

### 3.8 Pengolahan, Penyajian Dan Analisis Data

#### 3.8.1 Penyajian Data

Hasil penghitungan koloni yang diperoleh menggunakan alat *Colony Counter* dan aplikasi CFUCalc, Promega *Colony Counter*, *Colony Counter PRO* dan @BactLAB akan disajikan dalam Tabel 3.2 berikut ini:

**Tabel 3. 2 Penyajian data jumlah koloni yang terhitung dari metode manual dan 4 aplikasi**

Pengenceran	Replikasi	Pembacaan	Perhitungan manual	CFUCalc	Promega Colony Counter	Colony Counter PRO	@BactLAB
$10^{-1}$	1	1					
		Sd					
		6					
	2	1					
		Sd					
		6					
$10^{-2}$	1	1					
		Sd					
		5					
	2	1					
		Sd					
		6					
$10^{-3}$	1	1					
		Sd					
		6					
	2	1					
		Sd					
		6					
$10^{-4}$	1	1					
		Sd					
		6					
	2	1					
		Sd					

Pengenceran	Replikasi	Pembacaan	Perhitungan manual	CFUCalc	Promega Colony Counter	Colony Counter PRO	@BactLAB
		6					
10 <sup>-5</sup>	1	1					
		Sd					
		6					
	2	1					
		Sd					
		6					

**Keterangan:**

Sd : sampai dengan

Hasil perhitungan dari setiap aplikasi kemudian akan dibandingkan dengan hasil penghitungan manual. Data perbandingan akan ditampilkan dalam bentuk grafik regresi, tabel nilai regresi dan tabel nilai %RSD sebagai berikut:

**Tabel 3. 3 Analisis data nilai regresi 4 aplikasi**

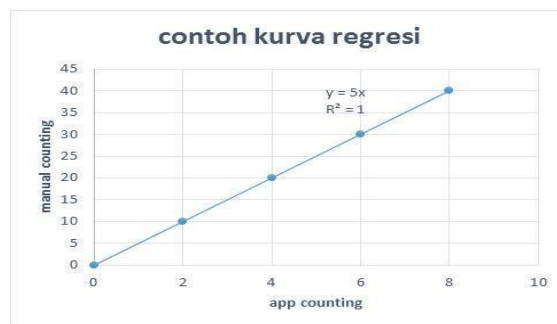
Aplikasi	Nilai Regresi
CFUCalc	
Promega Colony Counter	
Colony Counter PRO	
@BactLAB	

**Tabel 3. 4 Analisis data nilai regresi 4 aplikasi**

Aplikasi	Nilai RSD (%)
CFUCalc	
Promega Colony Counter	
Colony Counter PRO	
@BactLAB	

### 3.8.2 Pengolahan Data

Data yang dianalisis dalam penelitian ini meliputi jumlah koloni dalam setiap pengenceran sampel yang dihitung secara manual menggunakan alat *Colony counter* dan jumlah koloni yang dihitung menggunakan setiap aplikasi. Akurasi ditentukan dengan cara memplot hasil perhitungan koloni menggunakan aplikasi pada sumbu x dan hasil perhitungan manual pada sumbu y kemudian dilihat nilai regresi yang paling mendekati angka 1. Sedangkan nilai %RSD dihitung dengan memasukkan angka SD dan rata-rata dikalikan 100%.



**Gambar 3. 2 Contoh kurva regresi yang baik**

$$SD = \frac{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}}{n-1}$$

$$RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100 \%$$

**Gambar 3. 3 Persamaan %RSD**

Keterangan:

SD = Standar deviasi

RSD = Relative standar deviasion

n = Jumlah total data pengujian

$X_i$  = Hasil pengujian ke-i

$\bar{X}$  = Rata-rata dari seluruh hasil pengujian

### **3.8.3 Analisis Data**

Analisis data akan dilakukan dengan membandingkan hasil aplikasi dengan hasil penghitungan manual. Nilai regresi yang mendekati 1 menunjukkan akurasi yang lebih baik, sedangkan nilai  $\%RSD \leq 2\%$  menunjukkan presisi yang sangat baik.