

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian komparatif yang bertujuan untuk membandingkan angka kapang khamir pada dua kelompok sampel pati pisang kepok, yaitu pati pisang kepok yang telah disterilisasi dengan pati pisang kepok non-steril yang diproduksi oleh UMKM SIDOD, yang berlokasi di Kecamatan Gedangan, Kabupaten Malang. Dalam penelitian ini, kelompok pati pisang kepok yang telah disterilisasi akan disinari sinar UV selama 2 jam, dan hasilnya akan dibandingkan dengan kelompok pati pisang kepok non-steril tanpa perlakuan UV untuk melihat pengaruh sinar UV terhadap angka kapang khamir pada masing-masing sampel.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang. Waktu penelitian dilakukan pada bulan 6 September – 19 November 2024.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah pati pisang kepok yang diproduksi oleh UMKM Sidod yang berlokasi di Kecamatan Gedangan, Kabupaten Malang.

3.3.2 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah dua kelompok sampel pati pisang kepok, yaitu pati pisang kepok yang telah disterilisasi dengan sinar UV dengan jarak ketebalan 0,5 cm selama 2 jam serta pati pisang kepok yang tidak disterilisasi dengan sinar UV.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu labu ukur (iwaki) 100 ml, corong, pipet ukur (iwaki) steril 10 ml, pH meter (Eutech Instruments), batang

pengaduk steril, erlenmeyer (Pyrex) 250 ml, erlenmeyer (Pyrex) 500 ml , gelas ukur (Pyrex) steril 250 ml, sendok steril, spatula, Bluetip, pemantik, bunsen, mikropipet (Dumo) 1000 mikroliter, kaca arloji, gelas beaker (Duran) 100 ml, pipet tetes, magnetic stirrer, hotplate (Thermo Scientific), timbangan mikro (HWH DJ1002C), neraca analitik (Radwag), vortex (DLAB MX-S), LAF (Laminar Air Flow) , inkubator (Memmert IN55), loyang, bulb, waterbath (Memmert), rak tabung, tabung reaksi, gelas beaker (Duran)250 ml, autoklaf (GEA), oven (Thermo Scientific), UV-C Box Sterilisasi.

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu aluminium foil (Klin pak), NaOH (SmartLab), aquadest, kertas tahan panas, tali katun, BPW (Buffered Peptone Water) (Merck), kapas (Medisoft), tisu, alkohol 70% (OneMed), HCL 37% (Merck), media siap pakai 3M Petrifilm Yeast & Mold (Neogen), pati pisang kepok.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas (Independen Variabel)

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab perubahannya atau timbulnya variabel terikat (Sugiyono, 2016). Maka dalam penelitian ini yang menjadi variabel bebas (Independen Variabel) adalah sampel pati pisang kepok steril dan non steril.

3.5.2 Variabel Terikat (Dependen Variabel)

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat adanya variabel bebas (Sugiyono, 2016). Maka dalam penelitian ini yang menjadi variabel terikat (Dependen Variabel) adalah nilai Angka Kapang Khamir (AKK) pada sampel pati pisang kepok.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional Penelitian

Variabel	Definisi Operasional	Metode	Alat Ukur	Skala	Hasil
Pati Steril dan Non Steril	Pati pisang kepok yang diproduksi oleh UMKM Sidodadi dengan perlakuan sterilisasi sinar UV dan tanpa sinar UV	Sampel pati pisang kepok disterilisasi dengan dipaparkan sinar UV-C selama 2 jam pada jarak ketebalan pati 0,5 cm dari sumber sinar UV.	-	Nominal	Sampel pati pisang kepok dengan dan tanpa perlakuan Sinar UV
Nilai Angka Kapang Khamir (AKK)	Jumlah koloni kapang khamir dari pati pisang kepok yang tumbuh pada media petrifilm setelah inkubasi pada suhu 20 - 25°C selama 3 – 5 hari	AKK	Colony counter	Rasio	Jumlah koloni kapang khamir yang tumbuh (dengan satuan CFU/g dengan Batas cemaran AKK $\leq 10^4$ koloni/gram

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Sterilisasi Alat

Alat yang akan digunakan untuk penelitian ini dilakukan sterilisasi terlebih dahulu. Prosedur sterilisasi yaitu alat-alat tersebut dibungkus menggunakan kertas tahan panas sedangkan untuk sterilisasi alat dengan atasnya berlubang dapat diberi kapas kemudian dibungkus menggunakan kertas tahan panas dan ditali. Sterilisasi dilakukan ke dalam oven pada suhu 170°C selama 1 jam 30 menit.

3.7.2 Pembuatan Larutan BPW (*Buffered Peptone Water*)

Pembuatan larutan pengencer Buffered Peptone Water (BPW) dilakukan dengan menimbang bubuk BPW (*Buffered Peptone Water*) sebanyak 60,21 gram. Selanjutnya, larutkan bubuk pepton tersebut dalam aquadest hingga volume mencapai 3000 ml. Setelah larutan tercampur rata, lakukan pengukuran pH larutan menggunakan pH meter. Sesuaikan pH larutan menjadi $7,0 \pm 0,2$ dengan menambahkan larutan NaOH 1 N atau HCl 2 N secara bertahap. Setelah pH larutan diatur dengan benar, larutan Buffered Peptone Water disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, dengan atasnya berlubang dapat diberi kapas kemudian dibungkus menggunakan kertas tahan panas (BSN, 2012).

3.7.3 Pembuatan HCl 2N

Pembuatan larutan HCl 2N dilakukan dengan metode pengenceran dari HCl pekat 12N. Setelah perhitungan, sejumlah HCl pekat 12N dipipet sebanyak 16,6 ml menggunakan pipet ukur 10 ml di lemari asam. Larutan HCl pekat tersebut kemudian dimasukkan secara perlahan ke dalam labu ukur 100 ml yang telah diisi sebagian dengan aquadest. Setelah itu, larutan diencerkan hingga tanda batas pada labu ukur dengan menambahkan aquadest, kemudian dikocok perlahan hingga homogen.

3.7.4 Pembuatan NaOH 1N

Pembuatan larutan NaOH 1 N dilakukan dengan menimbang sebanyak 4 gram NaOH menggunakan neraca analitik. NaOH yang telah ditimbang kemudian dilarutkan dalam sebagian aquadest dengan volume kurang lebih 50 mL di dalam gelas beaker 100 ml, sambil diaduk menggunakan batang pengaduk hingga seluruh butiran NaOH larut sempurna. Setelah larutan homogen, campuran dipindahkan ke dalam labu ukur 100 ml menggunakan corong. Larutan dalam labu ukur kemudian ditambahkan aquadest secara perlahan hingga mencapai tanda batas labu ukur. Selanjutnya, larutan dikocok perlahan hingga homogen.

3.7.5 Pembuatan Suspensi Sampel

Sebanyak 25 gram sampel pati pisang kepok ditimbang secara aseptis menggunakan timbangan dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml yang telah disterilkan. Kemudian ditambahkan 225 mL larutan pengencer buffered peptone

water. Diaduk secara perlahan dengan menggunakan batang pengaduk steril. Kemudian ditunggu selama 10 menit atau hingga sampel mengendap. Lakukan sebanyak 3 replikasi. Suspensi yang dihasilkan memiliki konsentrasi pengenceran 10^{-1} (BSN A, 2012).

3.7.6 Pengenceran Sampel

Sebanyak 1 mL dari larutan 10^{-1} dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 9 mL larutan buffered peptone water steril untuk membuat pengenceran 10^{-2} , kemudian dikocok hingga homogen menggunakan vortex selama 10 detik. Dari pengenceran tersebut, sebanyak 1 mL diambil menggunakan pipet steril dan dimasukkan ke dalam tabung kedua yang berisi 9 mL larutan buffered peptone water steril untuk membuat pengenceran 10^{-3} , dan langkah ini diulangi secara berurutan hingga mencapai pengenceran 10^{-5} . Seluruh proses dilakukan secara aseptis di dalam *laminar air flow* untuk mencegah kontaminasi (BSN B, 2012).

3.7.7 Media Petrifilm YM 3M

Penggunaan petrifilm YM 3M dilakukan dengan cara meletakkan plat petrifilm YM 3M pada permukaan yang datar dan rata serta steril, kemudian diangkat lapisan atas petrifilm dan dituangkan 1 ml suspensi sampel ke bagian tengah lapisan bawah petrifilm, kemudian tutup kembali lapisan atas petrifilm dan ditekan secara perlahan bagian tengah petrifilm menggunakan alat spreader untuk mendistribusikan sampel secara merata. Selanjutnya letakkan petrifilm ke dalam inkubator dengan posisi tumpukan tidak lebih dari 20 dengan posisi horizontal pada suhu $20 - 25^{\circ}\text{C}$ dengan waktu 3 – 5 hari.

3.7.8 Uji Kapang Khamir (AKK) Menggunakan Petrifilm YM 3M

Sebanyak 1 mL dari tingkat pengenceran 10^{-3} hingga 10^{-5} diinokulasikan secara aseptis ke bagian tengah lapisan bawah Petrifilm YM 3M, kemudian tutup kembali lapisan atas petrifilm dan ditekan secara perlahan bagian tengah petrifilm menggunakan alat spreader untuk mendistribusikan sampel secara merata. Selanjutnya letakkan petrifilm ke dalam inkubator dengan posisi tumpukan tidak lebih dari 20 dengan posisi horizontal pada suhu $20 - 25^{\circ}\text{C}$ dalam waktu 3 – 5 hari.

3.7.9 Perhitungan Koloni Angka Kapang Khamir (AKK)

Prosedur perhitungan Koloni Angka Kapang Khamir (AKK) dilakukan dengan memperhatikan jumlah maksimum koloni yang dapat dihitung, yaitu 150 koloni per petrifilm. Jumlah koloni AKK yang terdapat pada tiap pelat 3M Petrifilm dihitung dan dicatat.

Mengikuti aturan dari SNI ISO 7218 tentang perhitungan dan persyaratan umum bagian 1 : (BSN, 2017).

$$N = \frac{\Sigma C}{v \times 1,1 \times d}$$

- N : Jumlah mikroorganisme dalam sampel uji, dihitung sebagai rata-rata tertimbang dari dua tingkat pengenceran yang berurutan.
- V : Volume inokulum yang digunakan pada setiap cawan Petri, dinyatakan dalam satuan mililiter (mL).
- ΣC : Total jumlah koloni yang dihitung pada semua cawan dari dua tingkat pengenceran berturut-turut.
- d : Faktor pengenceran yang sesuai dengan tingkat pengenceran pertama yang digunakan sebagai acuan

3.8 Pengolahan dan Penyajian Data

3.8.1 Penyajian data

Data yang digunakan pada penelitian ini ialah data jumlah koloni yang teramati pada uji pendahuluan dari pengenceran $10^{-2} - 10^{-3}$ dan uji penelitian pada pengenceran $10^{-3} - 10^{-5}$. Data hasil penelitian yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel data sebagai berikut :

Tabel 3.2 Penyajian Data AKK

Sampel	Pengenceran	Jumlah Koloni		
		Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
Pati pisang kepok steril	10 ⁻³			
	10 ⁻⁴			
	10 ⁻⁵			
	Blanko			
Pati Pisang kepok Non steril	10 ⁻³			
	10 ⁻⁴			
	10 ⁻⁵			
	Blanko			

Tabel 3.3 Hasil Nilai AKK

Sampel	Nilai AKK (CFU/g)			Rata-rata Nilai AKK (CFU/g)
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	
Pati pisang kepok steril				
Pati pisang kepok non steril				

3.8.2 Pengolahan Data

Prosedur pengolahan data pada penelitian ini dilakukan dengan menghitung jumlah koloni kapang khamir yang terdeteksi pada setiap pengenceran, kemudian dikalikan dengan faktor pengenceran. Yang kemudian akan disesuaikan dengan standar batas BPOM No. 13 Tahun 2019. Nilai AKK dihitung dengan menggunakan rumus (BSN, 2017):

$$N = \frac{\sum C}{v \times 1,1 \times d}$$

N : Jumlah mikroorganisme dalam sampel uji, dihitung sebagai rata-rata tertimbang dari dua tingkat pengenceran yang berurutan.

- V : Volume inokulum yang digunakan pada setiap cawan Petri, dinyatakan dalam satuan mililiter (mL).
- ΣC : Total jumlah koloni yang dihitung pada semua cawan dari dua tingkat pengenceran berturut-turut.
- d : Faktor pengenceran yang sesuai dengan tingkat pengenceran pertama yang digunakan sebagai acuan