BAB III
METODOLOGI

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah deskriptif. Penelitian deskriptif adalah penelitian yang mengarah pada gejala-gejala, fakta-fakta atau kejadian-kejadian secara sistematis dan akurat, mengenai sifat-sifat populasi atau daerah tertentu (Hardani, 2020). Penelitian ini digunakan untuk menentukan nilai Angka Lempeng Total pada masker organik yang dijual secara *online*.

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah sediaan masker organik yang diperjual belikan *online.*

3.2.2 Sampel

Sampel penelitian ini adalah sediaan masker organik yang diperjual belikan *online* berdasarkan kriteria sampel:

- Masker organik yang terlaris di *online shop*
- Harga dibawah Rp 15.000
- Yang tidak memiliki izin edar BPOM

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

3.3.1 Waktu

Penelitian dilakukan pada bulan Februari sampai Maret 2025. Pengambilan sampel dilakukan pada bulan Februari 2025 dan pengujian sampel dilakukan pada bulan Maret 2025.

3.3.2 Tempat

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah Laminar Air Flow, autoklaf (GEA), vortex (Thermolyn), *colony counter* (In scient pro), inkubator (Memmert), lemari pendingin, neraca analitik (HWH), oven, hot plate (Thermo) dan stirrer, mikropipet (Qlinipette), blue tip (1000µl), gelas beaker 500 mL dan 250 mL, batang pengaduk, spatula, kaca arloji, gelas ukur (Iwaki 100 ml), erlenmeyer (iwaki dan pyrex 500 mL dan 250 mL), tabung reaksi (iwaki dan pyrex 10 ml), rak tabung, cawan petri, pipet ukur (Iwaki 10 ml), bulb, bunsen, pemantik, kapas steril, tisu, label, kertas tahan panas, tali/benang.

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel masker organik, media Nutrien Agar (NA), NaCl 0,9%, alkohol dan aquadest.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel bebas (Independent variable)

Variabel bebas (*independent*) pada penelitian ini adalah masker organik yang dijual secara *online*.

3.5.2 Variabel terikat (Dependent Variable)

Variabel terikat (*dependent*) pada penelitian ini adalah jumlah Angka Lempeng Total pada masker organik yang dijual secara *online*.

3.6 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Data
Masker organik (Independent)	Masker Organik dengan kriteria terlaris di *online shop* dan Tanpa Izin Edar BPOM	_	_	_
Angka Lempeng Total (Dependent)	Jumlah koloni dalam masker organik yang dijual secar*a online* dengan menggunakan teknik pour plate	Menghitung koloni	Menurut SNI 16-6070-1999 yaitu maksimum 10^5 koloni/g	Rasio

3.7 Metode Penelitian

3.7.1 Pengambilan Sampel

Dalam penelitian teknik pengambilan sampel yang dilakukan adalah *purposive sampling*. *Purposive sampling* adalah pengambilan sampel dengan menggunakan beberapa pertimbangan sesuai dengan kriteria untuk dapat menentukan jumlah sampel yang diteliti (Sugiyono, 2018). Sampel yang digunakan adalah masker organik dengan terlaris di *online shop* dan Tanpa Izin Edar BPOM yang dijual secara o*nline*. Diambil sebanyak 5 merek sampel masker organik dengan merek yang berbeda berdasarkan penjualan terlaris dengan harga dibawah Rp 15.000.

3.7.2 Sterilisasi Alat

Cawan petri, tabung reaksi, pipet ukur, erlenmeyer, gelas beaker ditutup dengan kapas bungkus menggunakan kertas dan ikat rapat, lalu masukkan ke dalam autoklaf dengan suhu 121ºC tunggu selama 15 menit. Tujuan pembungkusan ini untuk mencegah atau mengurangi air masuk ke dalam alat (Santoso & Astriani, 2022).

3.7.3 Pembuatan Media Nutrien Agar (NA)

Prosedur pembuatan media ini adalah dengan cara menimbang sebanyak 20,8 gram NA yang selanjutnya dimasukkan dalam erlenmeyer, ditambahkan 1040 mL aquadest yang kemudian dipanaskan dan sambil diaduk hingga larut. Media NA disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Andalia et al., 2023).

3.7.4 Pembuatan larutan NaCl 0,9%

Pembuatan larutan ini dengan cara menimbang sebanyak 0,9 gram kristal NaCl kemudian dimasukkan dalam *beaker glass* 250 mL, kemudian ditambahkan aquadest sebanyak 100 mL, diaduk hingga kristal NaCl larut sempurna. Larutan NaCl tersebut disetrilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Andalia et al., 2023).

3.7.5 Preparasi dan Pengenceran Sampel

Sebelum pengujian dilakukan, wadah sampel dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol 70%. Sampel ditimbang secara aseptis dekat dengan api bunsen sebanyak 10 gram dan dimasukkan dalam gelas beaker. Selanjutnya sampel tersebut ditambahkan 90 mL NaCl 0,9% sedikit demi sedikit ke dalam gelas beaker sambil diaduk hingga homogen (pengenceran 10^{-1}) (Octaviani et al., 2022).

Disiapkan tabung reaksi steril dan masing-masing tabung diberi kode pengenceran 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} , $10^{-6,}$, 10^{-7}. Ke dalam masing-masing tabung reaksi tersebut ditambahkan 9 mL NaCl 0,9%. Larutan sampel yang telah diencerkan 10^{-1} dihomogenkan dan diambil 1 mL dimasukkan ke tabung pengenceran 10^{-2} kemudian dari 10^{-2} dihomogenkan diambil 1 mL untuk dimasukkan ke dalam tabung pengenceran 10^{-3} dari 10^{-3} dihomogenkan diambil 1 mL untuk dimasukkan ke dalam tabung pengenceran 10^{-4} dari 10^{-4} dihomogenkan diambil 1 mL untuk dimasukkan ke dalam tabung pengenceran 10^{-5} dari 10^{-5} dihomogenkan diambil 1 mL untuk dimasukkan ke dalam tabung pengenceran 10^{-6} dari 10^{-6} dihomogenkan diambil 1 mL untuk dimasukkan ke dalam tabung pengenceran 10^{-7}.

3.7.6 Pengujian Angka Lempeng Total

Pertama disiapkan 52 cawan petri steril, kemudian diberi tanda kode pengenceran (10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, $10^{-7,}$) serta kode blanko NA dan NaCl 0,9%. Dipipet 1 mL sampel dari masing- masing pengenceran menggunakan mikropipet steril

kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri steril secara aseptik. Media Nutrien Agar yang telah dicairkan pada suhu kira-kira 45°C-50°C dituang ke dalam cawan petri secara aseptis. Dicampurkan sampel secara merata dengan media yang telah dijalankan sesuai prosedur dengan cara memutar cawan petri. Ditunggu sampai memadat kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Diamati ada tidaknya koloni yang tumbuh dan dihitung jumlahnya (Wenas et al., 2020).

3.7.7 Perhitungan Koloni Angka Lempeng Total

Cara menganalisis hasil pengujian sesuai dengan PPOMN tahun 2006 dalam Dwisari (2021) yaitu:

1. Dilakukan pemilihan cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25-250 setiap cawan. Dihitung semua koloni dalam cawan petri dengan menggunakan alat penghitung koloni (*Colony counter*). Dihitung rata-rata jumlah koloni dan dikalikan dengan faktor pengenceran dan dinyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per mL atau gram.
2. Jika salah satu dari dua cawan terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 atau lebih besar dari 250, dihitung rata-rata jumlah koloni, dikalikan dengan faktor pengencer dan dinyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
3. Jika hasil dari 2 pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25- 250 koloni, dihitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran seperti pada poin a dan b di atas dan dihitung jumlah koloni dari kedua pengenceran tersebut. Jika jumlah yang tertinggi lebih besar 2 kali jumlah yang terkecil, dinyatakan jumlah yang terkecil sebagai jumlah bakteri per gram.
4. Jika rata-rata jumlah koloni masing-masing petri tidak terletak antara 25- 250 koloni, dihitung jumlah koloni seperti pada poin a dan b di atas dan dinyatakan sebagai jumlah bakteri per gram.
5. Jumlah koloni dari semua pengenceran lebih dari 250 koloni, maka setiap dua cawan petri dengan pengenceran tertinggi dibagi dalam 2,4 atau 8 sektor. Dihitung jumlah koloni dalam satu bagian atau lebih. Untuk mendapatkan jumlah koloni dalam satu cawan petri, dihitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pembagi dan pengenceran. Dinyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan per gram.

6. Jika dalam 1/8 bagian cawan petri terdapat lebih dari 200 koloni, maka jumlah koloni yang didapat =8x200 (1600), dikalikan dengan faktor pengenceran dan dinyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri perkiraan per mililiter atau gram lebih besar dari jumlah yang didapat (>1600x faktor pengenceran).
7. Jika tidak ada koloni yang tumbuh dalam cawan petri, nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari satu dikalikan dengan faktor pengenceran yang terendah (<10)
8. Menghitung koloni perambat (spreader).

   Ada 3 macam koloni perambatan pada koloni, yaitu:

   a. Merupakan rantai yang tidak terpisah-pisah
   b. Perambatan yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan
   c. Perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan perbenihan

   Jika terjadi hanya 1 perambatan maka koloni dianggap 1, tetapi jika 1 atau lebih rantai terbentuk dan yang berasal dari sumber yang terpisah -pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai 1 koloni.
9. Cara menghitung dan membulatkan angka

   Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, angka yang pertama dan kedua (dimulai dari kiri), sedangkan angka yang ketiga diganti dengan 0 apabila kurang dari 5 dan apabila 5 atau lebih dijadikan 1 yang ditambahkan pada angka yang kedua. Contoh:

   - 523.000 dilaporkan sebagai 520.000 ($5{,}2 \times 10^5$) Untuk rata-rata jumlah koloni dihitung dengan rumus :

   $$N = \frac{\sum C}{[(1 x n_1)+(0{,}1 x n_2)] x (d)}$$

   Dengan :

   N adalah jumlah koloni produk, dinyatakan dalam koloni per mL atau koloni per g.

   $\sum C$ adalah jumlah koloni pada semua cawan yang dihitung

   n_1 adalah jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung

   n_2 adalah jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung d adalah

pengenceran pertama yang dihitung.

3.8 Pengolahan, Penyajian, dan Analisis Data

3.8.1 Pengolahan Data

Data-data yang dikumpulkan dari hasil pengujian diolah dengan pengolahan secara tabel dalam bentuk narasi seperti teknik data secara tabulating data. Tabulating merupakan proses data yang dibentuk menjadi sebuah tabel, dengan mengelompokkan dan mengatur data sesuai dengan kriteria yang ditentukan. Tujuan dari tabulating adalah agar data yang didapat jelas dan terstruktur, sehingga memudahkan dalam analisis dan interpretasi data (Agustiaji, 2023).

3.8.2 Penyajian Data

Analisis data yang digunakan pada penelitian ini adalah analisis deskriptif, yaitu dengan menginterpretasikan hasil pemeriksaan di lapangan berdasarkan SNI 16-6070-1999 tentang sediaan masker metode Angka Lempeng Total.

3.8.3 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil perhitungan koloni pada sampel masker *organik* pada media NA. Dapat diindikasi jumlah nilai koloni bakteri memenuhi jika masih dibawah maksimum 10^5 koloni/gram dan melebihi batas jika nilai koloni melebihi maksimum 10^5. Karena syarat data yang diperoleh dideskripsikan dalam bentuk tabel serta hasil kesimpulan yang diperoleh dari pengujian ALT pada masker *organik*. Pengambilan data dapat didokumentasikan bahwa sampel masker *organik* melebihi atau tidak batas persyaratan uji ALT SNI 16-6070-1999 tentang sediaan masker.

Tabel 3. 2 Hasil Angka Lempeng Total

Sampel	Pengenceran	Replikasi		Rata- rata koloni	Nilai ALT	Persyaratan ALT koloni/gram
		1	2			
Blanko NA						
Blanko NaCl						
Masker A	10^{-3}					Persyaratan SNI 16-6070-1999 maksimum 10^5
	10^{-4}					
	10^{-5}					
	10^{-6}					
	10^{-7}					
Masker B	10^{-3}					Persyaratan SNI 16-6070-1999 maksimum 10^5
	10^{-4}					
	10^{-5}					
	10^{-6}					
	10^{-7}					
Masker C	10^{-3}					Persyaratan SNI 16-6070-1999 maksimum 10^5
	10^{-4}					
	10^{-5}					
	10^{-6}					
	10^{-7}					
Masker D	10^{-3}					Persyaratan SNI 16-6070-1999 maksimum 10^5
	10^{-4}					
	10^{-5}					
	10^{-6}					
	10^{-7}					
Masker E	10^{-3}					Persyaratan SNI 16-6070-1999 maksimum 10^5
	10^{-4}					
	10^{-5}					
	10^{-6}					
	10^{-7}					

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

Berikut ini adalah jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada sampel masker organik dan blanko pada media Nutrient Agar dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 4. 1 Hasil Angka Lempeng Total

Sampel	Pengenceran	Replikasi		Rata- rata koloni	Nilai ALT koloni/gram
		1	2		
Blanko NA	0	0	0	0	0
Blanko NaCl	0	0	0	0	0
Masker A	10^{-3}	TBUD	TBUD	TBUD	$1{,}6 \times 10^{6}$
	10^{-4}	157	90	123,5	
	10^{-5}	30	74	52	
	10^{-6}	1	11	6	
	10^{-7}	1	3	2	
Masker B	10^{-3}	0	0	0	<1000
	10^{-4}	0	0	0	
	10^{-5}	0	0	0	
	10^{-6}	0	0	0	
	10^{-7}	0	0	0	
Masker C	10^{-3}	0	0	0	<1000
	10^{-4}	0	0	0	
	10^{-5}	0	0	0	
	10^{-6}	0	0	0	
	10^{-7}	0	0	0	
Masker D	10^{-3}	20	21	20,5	$5{,}1 \times 10^{5}$
	10^{-4}	3	51	27	
	10^{-5}	4	3	3,5	
	10^{-6}	0	3	3	
	10^{-7}	0	2	2	
Masker E	10^{-3}	12	11	11,5	$1{,}1 \times 10^{4}$
	10^{-4}	1	0	1	
	10^{-5}	1	0	1	
	10^{-6}	0	0	0	
	10^{-7}	0	0	0	

4.2 Pembahasan

Angka Angka lempeng total adalah pemeriksaan mikrobiologi untuk menghitung jumlah mikroba yang terkandung dalam sampel padat maupun cair melalui pengenceran sampel secara berseri (*serial dilution*) dan inokulasi sampel pada media melalui metode tuang (*pour plate*) atau metode sebar (*spread plate*) (E. Y. Wulandari, 2023). Prinsip dari ALT adalah menghitung pertumbuhan koloni bakteri aerob mesofil setelah sampel ditanam pada lempeng media yang sesuai dengan cara tuang (*pour plate*) maupun sebar (*spread plate*) kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 35-37°C (Kurniawati, 2022) .

Sebelum dilakukan pengujian media dan pengencer yang akan digunakan disterilisasi. Sterilisasi adalah suatu proses untuk membunuh semua bakteri yang ada, sehingga jika ditumbuhkan di dalam suatu media tidak ada lagi bakteri yang dapat berkembang biak. Sterilisasi terlebih dahulu dengan autoklaf dengan suhu 121℃ selama 15 menit pada tekanan 1 atm (15 lbs) waktu yang relatif singkat dapat membunuh bakteri dan spora jamur (Tawarniate & Wijayanti, 2023). Selain media dan pengencer, alat-alat yang digunakan dalam pengujian Angka Lempeng Total bakteri disterilisasi menggunakan metode yang sesuai. Alat-alat kaca seperti batang pengaduk, tabung reaksi, pipet volume, cawan petri, gelas ukur, erlenmeyer disterilisasi menggunakan oven pada suhu 170℃ selama 1 jam (Sari et al., 2024). Pada metode ini digunakan suhu yang sangat tinggi selama beberapa jam dengan tujuan untuk membunuh atau menghilangkan agen yang menjadi penyebab kontaminasi pada kultur jaringan (seperti spora jamur dan bakteri) (S. Wulandari et al., 2022).

Selain melakukan sterilisasi menggunakan autoklaf, proses pengambilan contoh dari wadah kemasan juga harus dilakukan secara aseptis agar menghindari kontaminasi dari luar contoh.. Sebelum wadah atau kemasan contoh dibuka, sebaiknya dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol 70% untuk menghindari adanya kontaminasi mikroorganisme dari luar contoh. Sehingga apabila ditemukan adanya bakteri, merupakan murni berasal dari contoh. Setelah dilakukan penuangan media, media didiamkan hingga padat yang menandakan bahwa kandungan agar dan air yang terdapat dalam media sudah stabil. Kemudian dilakukan inkubasi 24-48 jam

pada suhu 35-37°C. Saat dimasukkan ke dalam inkubator, cawan Petri harus diletakkan dalam posisi terbalik. Hal ini bertujuan untuk menghindari adanya tetesan air yang mungkin melekat pada dinding tutup cawan petri (Dwidjoseputro, 2010).

Tahapan pada pengujian ALT ini meliputi dari pembuatan media dan pengencer, homogenisasi, pengenceran, inokulasi, inkubasi dan perhitungan jumlah koloni. Sebelum pengujian dilakukan, wadah sampel sebaiknya dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol 70% untuk membantu menghindari kontaminasi dari luar sampel, sehingga pada saat pengujian mikroba yang tumbuh hanya berasal dari sampel (Dewi et al., 2022). Sampel ditimbang secara aseptis dekat dengan api Bunsen sebanyak 10 gram. Kemudian sampel dihomogenkan dengan 90 mL larutan pengencer NaCl 0,9% dan diperoleh suspensi dengan pengenceran 1:10 atau $10^{-1.}$ sebelumnya, pengenceran dilakukan hingga diperoleh pengenceran 10^{-7}. Pada pengenceran 10^{-3} sampai 10^{-7} dibuat duplo untuk meningkatkan akurasi perhitungan. Adapun tujuan dari pengenceran untuk mengurangi jumlah populasi mikroba sehingga setelah diinkubasi mikroba yang tumbuh dapat dihitung (Prasadnya, 2023).

Pengujian ALT dilakukan dalam Laminar Air Flow untuk mengurangi risiko kontaminasi dari udara sekitar, alat ini memfilter partikel udara termasuk sel mikroba melalui filter yang pori-porinya sangat kecil sehingga udara yang dihembuskan ke area kerja bebas mikroba (Hafsan, 2014).

Metode yang digunakan untuk pengujian ALT adalah cawan tuang, metode tersebut digunakan karena bakteri dapat tumbuh di dalam dan di dasar media, jadi tidak hanya tumbuh di permukaan media (Bi N, 2022). Diinokulasikan 1,0 mL dari setiap pengenceran dimasukkan ke dalam cawan Petri lalu ditambahkan media NA steril dan digoyangkan sehingga suspensi tercampur rata. Setelah memadat, seluruh cawan Petri dengan posisi dibalik diinkubasi pada pada suhu 35-37°C dengan posisi terbalik dimaksudkan untuk mencegah menetesnya uap air hasil pengembunan yang disebabkan suhu inkubator. Karena jika terdapat air yang menetes maka dapat merusak pengamatan dan perhitungan jumlah koloni dari sampel yang diuji (Dwidjoseputro, 2010).

Hasil pengujian ALT pada sampel B, C, E masih memenuhi batas persyaratan

sesuai dengan SNI 16-6070-1999 sediaan masker yaitu maksimum 10^5, sedangkan untuk hasil sampel A dan D tidak memenuhi persyaratan sesuai dengan SNI 16-6070-1999 sediaan masker yaitu batas maksimum 10^5 (BSN, 1999).

Penelitian ini menunjukkan pada sampel A dan D tidak memenuhi standar yang artinya kontaminasi mikroba ini dapat merusak sediaan dan menyebabkan infeksi kulit, reaksi alergi, serta penyakit kulit lain (Aprilika, 2024). Cemaran dapat disebabkan oleh kontaminasi pada bahan baku, proses pembuatan yang kurang higienis, kondisi penyimpanan yang kurang baik (Octaviani et al., 2022). Sehingga perlu dilakukan pengujian dengan parameter mikrobiologi lainnya sesuai standar SNI 16-6070-1999 sediaan masker.

BAB V
KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengujian angka lempeng total diperoleh pada sampel A adalah 1,6 x 10^6 cfu/gram. Pada sampel B dan C adalah < 1000 cfu/gram. Pada sampel D adalah 5,1 x 10^5 cfu/gram. Pada sampel E adalah 1,1 x 10^4 cfu/gram. Hasil pengujian ALT pada sampel B, C, E masih memenuhi batas persyaratan sesuai dengan SNI 16-6070-1999 sediaan masker yaitu batas maksimum 10^5 , sedangkan untuk hasil sampel A dan D tidak memenuhi persyaratan sesuai dengan SNI 16-6070-1999 sediaan masker yaitu batas maksimum 10^5 (BSN, 1999).

5.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya dapat dilakukan tambahan uji mikrobiologi yakni uji cemaran bakteri cemaran bakteri *staphylococcus aureus, pseudomonas aeruginosa* dan *Candida albicans* pada masker organic yang dijual secara *online.*