

BAB III

METODOLOGI

3.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif untuk menggambarkan karakteristik tepung dan pati Pisang Kepok (*Musa paradisiaca L.*) dalam hal kualitas mikrobiologisnya. Fokus utama dari penelitian ini adalah untuk memberikan pemahaman yang lebih jelas mengenai nilai ALT pada kedua produk tersebut. Metode deskriptif digunakan karena tujuannya adalah untuk menggambarkan atau memberikan gambaran mengenai kondisi mikrobiologis masing-masing produk tanpa melakukan perbandingan yang mendalam antara keduanya (Arikunto, 2018). Dalam penelitian ini, langkah-langkah yang diambil mencakup pengumpulan data, analisis data, dan observasi langsung terhadap produk yang diteliti.

3.2. Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Juni hingga Juli 2024.

3.3. Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Labu Ukur (iwaki) 100 ml, Corong (iwaki), Pipet ukur (iwaki) steril 10 ml, pH meter (Eutech Instruments), batang pengaduk steril (iwaki), erlenmayer (Pyrex) 250 ml, erlenmayer (Pyrex) 500 ml, gelas ukur (Pyrex) steril 250 ml, sendok steril (ecentio), spatula, 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 (Mettler IN55), loyang, bulb, waterbath (Mettler), rak tabung, tabung reaksi, gelas beaker (Duran) 250 ml, autoklaf, oven (Thermo Scientific), UV-C

Box Sterilisasi, termometer (GEA).

3.3.2 Bahan

Pada penelitian ini digunakan bahan-bahan sebagai berikut: Sampel Tepung & Pati (UMKM Sidod), foil (Klin pak), NaOH (SmartLab), aquadest, kertas tahan panas, tali, BPW (*Buffered Peptone Water*) (Merck), cawan petri (OneMed), kapas (Medisoft), tisu, alkohol 70% (OneMed), HCL 37% (Merck), media PCA (Plate Count Agar) (Himedia), Kertas perkamen, Kertas label.

3.4. Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada umumnya disebut sebagai variabel independen. Variabel bebas juga berarti variabel yang mempengaruhi (Ulfa, 2021.). Variabel bebas merupakan suatu kondisi atau nilai yang jika muncul maka akan mengubah kondisi atau nilai yang lain (Hazizah et al., 2017). Dalam Penelitian ini menggunakan Sampel Pisang Kepok (*Musa paradisiaca L.*) dengan variasi bentuk sampel Pati Dan Tepung.

3.4.2 Variable Terikat

Variabel terikat pada umumnya disebut sebagai variabel dependen. Variabel terikat juga berarti variabel yang dipengaruhi oleh variable bebas (Yuwana & Yuwono, 2018). Variabel terikat merupakan variabel yang besarnya tergantung dari besaran variabel independen, akan memberi peluang terhadap perubahan variabel dependen (terikat) sebesar koefisien (besaran) perubahan dalam variabel independen (Ulfa, 2021.). Dalam Penelitian ini Variable Terikat yaitu Jumlah ALT yang terkandung dalam sampel.

3.5 Populasi

Tepung dan Pati Pisang Kepok (*Musa paradisiaca L.*) yang diproduksi oleh UMKM Sidod di Desa Sidodadi, Kecamatan Gedangan, Kabupaten Malang.

3.6 Sampel

Tepung dan Pati Pisang Kepok (*Musa paradisiaca L.*) yang diproduksi pada bulan Mei 2024.

3.7 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. 1 Tabel definisi operasional variabel

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Data
Nilai Angka Lempeng Total (ALT)	Jumlah koloni bakteri aerob pada sampel pati & tepung pisang kepok Yang Diproduksi UMKM di Wilayah Kecamatan Gedangan Kabupaten Malang dengan menggunakan teknik pour plate.	Menggunakan Metode ALT dengan Mengacu Pada SNI 7218-2012 yang diamandemen Tahun 2017	Hasil ALT akan dibandingkan dengan Mengacu pada Per BPOM No.13 tahun 2019 tentang serelia dan produk yang merupakan turunan dari biji sereal, akar, dan umbi, kacang-kacangan dan empulur (bagaian dalam batang tanaman)	Hasilnya dinyatakan dalam unit Forming Units per gram (CFU/g)

3.8 Prosedur

3.8.1 Sterilisasi Alat

Alat yang digunakan untuk penelitian ini dilakukan sterilisasi terlebih dahulu. Prosedur sterilisasi yaitu alat-alat yang akan digunakan 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.

3.8.2 Pembuatan Larutan BPW (*Buffered Peptone Water*)

Pembuatan larutan pengencer *Buffered Peptone Water* (BPW) dilakukan dengan menimbang bubuk BPW sebanyak 60,21 gram. Selanjutnya, larutkan bubuk peptone tersebut dalam aquades hingga volume mencapai 3000 mL. setelah larutan tercampur rata, lakukan pengukuran 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 BPW disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, dengan atasnya yang berlubang diberi kapas kemudian dibungkus menggunakan kertas tahan panas (BSN,2013).

3.8.3 Pembuatan Media PCA (*Plate Count Agar*)

Pembuatan media PCA dilakukan dengan cara menimbang bubuk PCA sesuai dengan petunjuk pada etiket produk. Berdasarkan informasi pada etiket, diperlukan 17,5 gram bubuk PCA untuk melarutkan 1000 mL larutan. Larutan untuk membuat 1500 mL media, jumlah bubuk PCA yang dibutuhkan dihitung secara proposional, yaitu sebanyak 26,25 gram. Bubuk PCA yang telah ditimbang kemudian dilarutkan dalam 1500 mL aquadest steril sambil dipanaskan dan diaduk hingga larutan homogen. Setelah, larutan benar-benar homogen dengan ditandai tidak ada gumpalan dan larutan menjadi kuning bening, media PCA disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media yang disterilisasikan dibiarkan terlebih dahulu hingga suhu turun antara 44-47°C sebelum dituangkan ke dalam cawan petri untuk digunakan dalam pengujian mikrobiologi. (BSN,2013).

3.8.4 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.

3.8.5 Pembuatan NaOH 1 N

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 kemudian ditambahkan aquadest secara perlahan hingga mencapai tanda batas labu ukur. Selanjutnya, larutan dikocok perlahan hingga homogen, labu ukur dengan menambahkan aquadest, kemudian dikocok perlahan hingga homogen.

3.8.6 Pengenceran Sampel

Sebanyak 1 ml. dari larutan 10^{-1} dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 9 ml. larutan BPW 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 BPW steril untuk membuat pengenceran 10^{-3} , dan langkah ini diulangi secara berurutan hingga mencapai pengenceran 10^{-11} . Seluruh proses dilakukan secara aseptis di dalam laminar air flow untuk mencegah kontaminasi (BSN, 2012).

3.8.7 Uji Angka Lempeng Total (ALT) Metode Tuang

Sebanyak 1 ml. dari tingkat pengenceran 10^{-5} hingga 10^{-11} diinokulasikan secara aseptis ke dalam dua cawan petri steril (3 replikasi per pengenceran), kemudian ditambahkan 15-20 ml. media PCA cair steril yang telah didinginkan hingga suhu sekitar 44°C - 47°C . Campuran tersebut dihomogenkan dengan gerakan memutar, dibiarkan mengeras, dan diinkubasi dalam posisi terbalik pada suhu $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 72 ± 3 jam. Setelah inkubasi, jumlah kolumbuh

dihitung untuk menentukan angka lempeng total (*Total Plate Count*) menggunakan *colony counter* (BSN, 2013), kurang dari 25 koloni, catat koloni yang ada, tetapi nyatakan sebagai kurang dari 25 koloni dan dikalikan dengan 1/d, dimana d adalah faktor pengenceran pertama yang digunakan dan dilaporkan sebagai perkiraan ALT (BSN,2012).

3.8.8 Perhitungan Koloni Angka Lempeng Total (ALT)

Prosedur perhitungan Koloni Angka Lempeng Total (ALT) dilakukan dengan memperhatikan jumlah maksimum koloni yang dapat dihitung, yaitu 300 koloni per cawan, dan minimal satu cawan harus mengandung setidaknya 10 koloni. Apabila koloni menunjukkan penyebaran yang sulit dihitung maka nyatakan sebagai berikut (BSN, 2017):

1. Koloni yang menyebar dianggap sebagai satu koloni tunggal.
2. Jika kurang dari seperempat lempeng agar tertutup oleh koloni yang tersebar, koloni pada bagian yang tidak terpengaruh dihitung dan jumlah koloni teoritis diekstrapolasi untuk seluruh lempeng
3. Jika lebih dari seperempat lempeng tertutup koloni yang tersebar, hasil tersebut diabaikan.
4. Selain itu, rantai koloni dihitung sebagai satu unit pembentuk koloni.

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

Dengan keterangan :

N adalah jumlah koloni sampel, dinyatakan dalam koloni perml atau koloni per g;

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

n1 adalah jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung;

n2 adalah jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung;

d adalah pengenceran pertama yang digunakan (BSN,2012).

3.9 Penyajian Data

Tabel 3. 2 Tabel penyajian data

Sampel	Pengenceran	Jumlah Koloni					
		Replikasi 1		Replikasi 2		Replikasi 3	
		A	B	A	B	A	B
Tepung Pisang Kepok	10 ⁻⁵						
	10 ⁻⁶						
	10 ⁻⁷						
	10 ⁻⁸						
	10 ⁻⁹						
	10 ⁻¹⁰						
	10 ⁻¹¹						
Pati Pisang Kepok	10 ⁻⁵						
	10 ⁻⁶						
	10 ⁻⁷						
	10 ⁻⁸						
	10 ⁻⁹						
	10 ⁻¹⁰						
	10 ⁻¹¹						
Blanko (Media + Larutan BPW)							
Blanko (Media)							

Tabel 3.3 Tabel data hasil perhitungan

Nilai ALT (CFU/g)				
Sampel Uji	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Rata-rata
Tepung Pisang Kepok				
Pati Pisang Kepok				