

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis dan Desain Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah eksperimen dengan desain penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL). Variabel bebas adalah suhu 10°C, suhu 25°C dan lama penyimpanan selama 7 hari (yang diamati dari hari ke-0 sampai ke-7) pada roti produksi rumahan di Kota Bandar Lampung sedangkan variabel terikat adalah angka kapang pada roti.

#### **B. Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### 1. Lokasi

Pengambilan sampel pada roti produksi rumahan di beberapa Pabrik Roti Rumahan di Kota Bandar Lampung. Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kesuma Bangsa.

##### 2. Waktu

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari-Juni 2024.

#### **C. Subjek Penelitian**

Populasi penelitian ini adalah seluruh roti produksi rumahan di Kota Bandar Lampung yang berjumlah 5 pabrik. Sampel penelitian ini berjumlah 3 pabrik roti produksi rumahan dengan kriteria sampel yaitu roti produksi rumahan yang baru diproduksi dan roti dipesan langsung dari produsen tanpa melibatkan distributor yang belum dilakukan proses penyimpanan oleh pabrik berjumlah 16 sampel di tiap pabrik roti produksi rumahan di Kota Bandar Lampung dengan rumus pengulangan menggunakan rumus Federer:

$$(n-1) (14-1) \geq 15$$

$$(n-1) (13) \geq 15$$

$$13n - 13 \geq 15$$

$$13n \geq 28$$

$$n \geq 2,153 \text{ (dibulatkan menjadi 3)}$$

#### **Keterangan:**

t = banyaknya perlakuan

n = banyaknya ulangan (Arum, 2019)

## D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional

No	Variabel penelitian	Definisi Operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1	Suhu Penyimpanan	Suhu penyimpanan roti kemasan produksi rumahan yang diambil dari pabrik roti rumahan di Kota Bandar Lampung	Mengukur suhu penyimpanan	<i>Thermometer</i>	Suhu dingin (10-10,9°C)  Suhu ruang (25-25,9°C) (Suryati, 2016)	<i>Interval</i>
2	Lama Penyimpanan	Masa penyimpanan roti kemasan produksi rumahan yang diambil dari pabrik roti rumahan di Kota Bandar Lampung	Menghitung lama hari penyimpanan	Kalender	0 hari 1 hari 2 hari 3 hari 4 hari 5 hari 6 hari 7 hari (Asiah, 2020)	<i>Ordinal</i>
3	Angka Kapang pada Roti	Angka kapang yang terkandung dalam roti kemasan dari pabrik roti rumahan di Kota Bandar Lampung	Menghitung koloni kapang pada cawan	SNI 7388-2009 (maksimal $1 \times 10^4$ koloni/g)	Memenuhi syarat $\leq 1 \times 10^4$ koloni/g  Tidak Memenuhi Syarat $> 1 \times 10^4$ koloni/g (SNI 7388-2009)	<i>Ordinal</i>

## E. Pengumpulan Data

### 1. Prosedur Penelitian

- a. Mengajukan permohonan surat izin penelitian dari Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang untuk melakukan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kesuma Bangsa.
- b. Pengumpulan bahan – bahan pemeriksaan

## 2. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara membeli roti yang baru diproduksi di Pabrik Roti Rumahan Kota Bandar Lampung dan belum dilakukan proses penyimpanan oleh pabrik tersebut. Masing-masing roti diberi label yang mencantumkan kode sampel, tanggal dan waktu pengambilan sampel, serta nama pabrik dengan inisial. Setelah itu, diletakkan dalam box penyimpanan, lalu sampel dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kesuma Bangsa. Penyimpanan dilakukan dalam 2 suhu dan 7 waktu. Sampel dibawa ke laboratorium kemudian dilakukan perlakuan penyimpanan 7 hari (yang diamati dari hari ke-0 sampai ke-7) pada kondisi suhu ruang ( $25^{\circ}\text{C}$ - $25,9^{\circ}\text{C}$ ) di simpan dalam inkubator yang berada di laboratorium dan suhu dingin ( $10^{\circ}\text{C}$ - $10,9^{\circ}\text{C}$ ) di simpan dalam plastik kemasan yang kemudian diletakkan ke dalam kulkas laboratorium. Pengambilan sampel dilakukan secara bertahap dari pabrik pertama terlebih dahulu, kemudian sampel akan dilakukan pemeriksaan sesuai prosedur sampai selesai. Setelah itu, baru dilanjutkan pengambilan sampel ke pabrik selanjutnya.

## 3. Pengukuran Data

Pengukuran data yang digunakan dengan metode penelitian cawan tuang.

## 4. Persiapan Alat dan Bahan

### a. Alat

Oven, cawan petri, pipet ukur 1 mL dan 10 mL, inkubator, autoklaf, erlenmeyer, gelas ukur, spatula, neraca elektrik, batang pengaduk, gunting, *hot plate*, vortex, tabung reaksi, kapas, kertas kopi/koran, benang kasur, lampu spirtus, *objek glass*, *deck glass* dan mikroskop.

### b. Bahan

Bahan yang diperlukan roti kemasan, media PDA (*Potato Dextrose Agar*), *chloramfenicol*, PDF (*Pepton Dilution Fluid*), aquades, alkohol, dan *Lactonphenol Cotton Blue* (LCB).

## 5. Prosedur Kerja

### a. Sterilisasi alat

Alat gelas yang dipakai pada penelitian ini dicuci dan dikeringkan sebelumnya lalu dilapisi menggunakan kertas koran atau kertas kopi. Disterilkan menggunakan oven pada suhu 170°C selama 60 menit (Murtius, 2018).

### b. Pembuatan larutan *Pepton Dilution Fluid* (PDF)

Ditimbang bubuk pepton sebanyak 20 g, kemudian dicampurkan dengan aquades sebanyak 1 L, lalu dipanaskan sampai larut dan dihomogenkan. Setelah itu, disterilkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dalam tekanan 1 atm (Microbeholic, 2020).

### c. Pembuatan larutan *chloramphenicol*

Setiap 100 mL *Potato Dextrose Agar* (PDA) diberi 1 mL larutan 500 mcg antibiotik *chloramphenicol* ke dalam 10 mL aquades.

### d. Pembuatan *Lactonphenol Cotton Blue* (LCB)

Ditimbang *cotton blue* sebanyak 0.125 gram dilarutkan dalam 50 ml aquades. Selanjutnya, 50 gram *kristal fenol* ditambahkan ke dalam 50 ml asam laktat dalam gelas kimia. lalu dicampurkan dan diaduk menggunakan spatula hingga larut, lalu ditambahkan 100 ml gliserol dan dilakukan penyaringan. Selanjutnya, larutan disimpan pada suhu ruang. Pengujian kualitas reagen LCB menggunakan spesimen jamur, dimana spesimen jamur ditambahkan ke *objek glass* yang bersih lalu tambahkan satu tetes larutan LCB dan tutup dengan *deck glass* yang bersih dan steril. Setelah itu, amati di bawah mikroskop dengan perbesaran 40x untuk melihat bentuk spora dan struktur jamur (Microbenotes, 2021).

### e. Pembuatan persiapan media *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Ditimbang serbuk PDA seberat 39 gram ke dalam erlenmeyer dan melarutkan ke dalam 1 liter aquades. Selanjutnya, melakukan proses pemanasan menggunakan alat *hot plate* dan *magnetic stirrer*. Kemudian memastikan bahwa media benar-benar larut dan tidak terjadi penggumpalan. Melakukan pengaturan pH media hingga

mencapai 5,6 dengan menggunakan alat pH meter agar hasilnya lebih akurat. Media yang sudah larut ditutup dengan aluminium foil, lalu mensterilkan di autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm. Setelah dikeluarkan dari autoklaf, antibiotik seperti *chloramphenicol* ditambahkan. Setelah media dingin, melakukan penuangan ke dalam petridish atau cawan petri dengan volume 20 ml per petri. Media kemudian didinginkan hingga membeku (Microbeholic, 2020).

f. Pembuatan pengenceran sampel

Mengambil roti yang sudah diberi perlakuan penyimpanan waktu (dimulai dari 0- 7 hari) dan 2 suhu (suhu ruang 25°C dalam inkubator di laboratorium serta suhu dingin 10°C di dalam kulkas yang dalam plastik). Membuka sampel roti dengan gunting steril di depan lampu spiritus kemudian menimbang 25g roti lalu memasukkan ke dalam erlenmeyer berisi 225 mL larutan PDF hingga diperoleh pengenceran  $10^{-1}$ . Dihomogenkan campuran beberapa kali dengan cara di vortex (SNI 2332.7:2015).

g. Prosedur pemeriksaan angka kapang

- 1) Dipipet 1 mL menggunakan pipet steril dari pengenceran  $10^{-1}$  dari Erlenmeyer menghomogenkan dengan di vortex lalu dimasukkan ke tabung yang berisi 9 mL larutan pengenceran PDF dan diperoleh pengenceran  $10^{-2}$ , selanjutnya menyiapkan pengenceran  $10^{-3}$  dengan mengambil 1 mL dari pengenceran  $10^{-2}$  lalu memasukkan ke dalam 9 mL larutan pengenceran PDF, dan dihomogenkan dengan cara di vortex.
- 2) Dipipet 1 mL masing – masing sampel yang sudah dilakukan pengenceran  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  ke cawan petri. Menuangkan media PDA sejumlah 15 mL ke cawan petri kemudian menghomogenkan dengan pola angka delapan.
- 3) Setelah media memadat, dilakukan inkubasi selama 5 hari pada suhu 28°C

4) Pengamatan dapat dikontrol di hari ke-0 hingga hari ke-7 (SNI 2332.7:2015).

#### h. Identifikasi Hasil

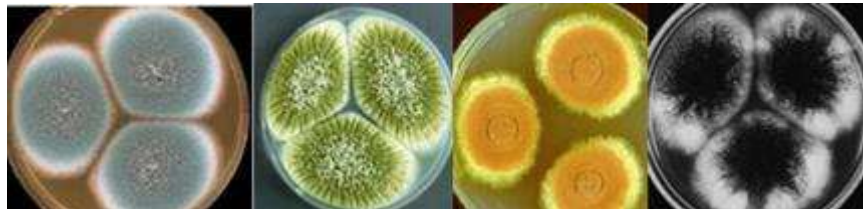
Mengidentifikasi hasil dengan pengambilan langsung dari inkubasi sampel pada hari ke-5 yang dilakukan dengan pengamatan morfologi secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis dilakukan dengan mengamati warna dan tekstur koloni, sedangkan pengamatan mikroskopis dilakukan dengan mengamati sediaan yang diperoleh dari *slide culture* dengan pewarnaan *Lactonphenol Cotton Blue* (LCB) serta bantuan mikroskop dengan perbesaran 10x dan 40x (Azizah *et. al*, 2019).

### 6. Interpretasi Hasil

#### a. *Aspergillus sp.*

##### 1) Makroskopis

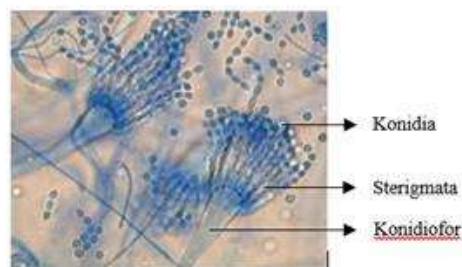
*Aspergillus sp.* dapat memiliki pertumbuhan dengan koloni berserat dengan warna yang bervariasi, seperti hijau abu-abu, hijau, coklat dan putih kehitaman (Hidayatunnafsiyah, 2023).



Sumber: Refai *et al.*, 2014

##### 2) Mikroskopis

*Aspergillus sp.* memiliki hifa yang bersekat dan bercabang dengan konidiofor yang tumbuh tegak dan membesar. Bagian pendukung konidiofor yang disebut sterigmata. Di dalamnya membentuk konidia-konidia (Cantika, 2021).

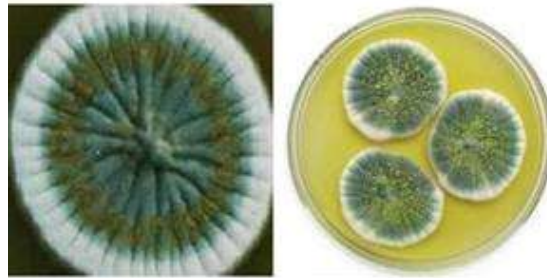


Sumber: Refai *et al.*, 2014

b. *Penicillium sp.*

1) Makroskopis

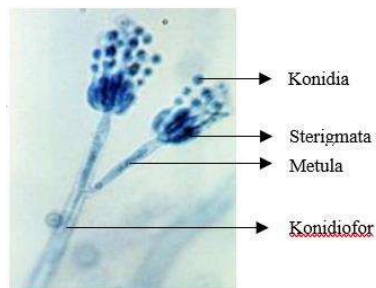
Koloni *Penicillium* biasanya memiliki pertumbuhan yang sangat cepat dan berwarna hijau keputihan. Koloni yang akan terbentuk seperti kapas berserabut berwarna hijau kebiruan (Indrawati, 2016).



Sumber: Refai *et al.*, 2015

2) Mikroskopis

*Penicillium* memiliki bentuk badan seperti sapu yang diikuti dengan sterigmata dan konidia yang tersusun seperti rantai, bersepta hampir sebagian memiliki konidiofor yang besar, tunggal atau majemuk yang terdiri dari phialid. Phialid atau sterigmata berfungsi sebagai cabang konidia. Konidia berbentuk rantai panjang, kolom, globular, elips. Pangkal sterigmata disebut metulla (Indrawati, 2016).



Sumber: Refai *et al.*, 2015

c. *Fusarium sp.*

1) Makroskopis

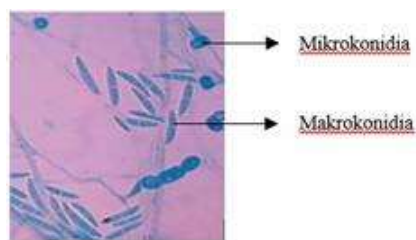
Sebagian spesies *Fusarium* menghasilkan koloni berbulu seperti kapas, datar, dan menyebar. Warna koloni biasanya berwarna putih, krem, cokelat, salmon, kayu manis, kuning, merah, ungu, merah jambu dan mungkin tidak berwarna (Refai *et al.*, 2015).



Sumber: Refai *et al.*, 2015

## 2) Mikroskopis

Struktur *Fusarium* mampu menghasilkan dua jenis konidia, yaitu makrokonidia yang berbentuk panjang melengkung dengan kedua ujungnya yang sempit, dan mikrokonidia yang berbentuk bulat kecil dan pendek-lurus. Sporodokium merupakan suatu ikatan konidiofor padat yang terdapat pada bagian bawah (Kurniawan, 2022).



Sumber: Refai *et al.*, 2015

## d. *Rhizopus stolonifer*

### 1) Makroskopis

*Rhizopus stolonifer* mempunyai koloni yang berwarna keputihan menjadi abu-abu kecoklatan hitaman hingga coklat kekuningan (Maulidi, 2023).



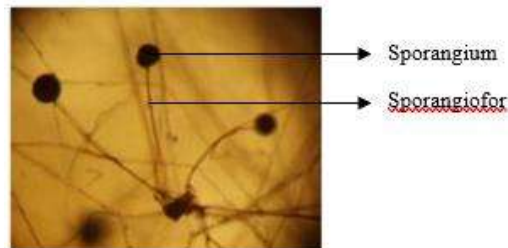
Sumber: Gonu *et al.*, 2015

### 2) Makroskopis

Rhizoid yang berwarna coklat, bercabang dan berlawanan arah dengan sporangiofor bisa muncul langsung dari stolon tanpa



adanya rhizoid. Sporangiofor bisa satu atau berkelompok meyerupai garpu, dinding berduri, berwarna coklat gelap hingga coklat kehitaman. Stolonya berdinding halus atau agak kasar dan hampir tidak berwarna, sporangiospora jamur ini berbentuk bulat atau poligonal (Maulidi, 2023).



Sumber: Gonu *et al.*, 2015

## F. Pengolahan Data dan Analisis Data

### 1. Pengolahan Data

Data yang dihasilkan berupa data primer yaitu data yang diperoleh peneliti berupa angka kapang dengan perlakuan suhu dan lama penyimpanan yang tumbuh pada media PDA.

$$\text{Angka Kapang} = A \times B = N \text{ Koloni/gram}$$

Keterangan:

A = jumlah koloni dari kedua cawan petri yang menunjukkan jumlah antara 10 – 150 koloni.

B = faktor pengencer

N = angka kapang (SNI 2332.7:2009)

Dengan catatan:

Cara menganalisis hasil pengujian untuk nilai Angka Kapang/Khamir sesuai dengan ketentuan PPOMN (2006) yaitu : cawan petri yang menunjukkan jumlah koloni 10-150 dari satu pengenceran dipilih dan dihitung dari kedua cawan lalu dikalikan dengan faktor pengencerannya. Bila pada cawan petri dari dua tingkat pengenceran yang berurutan menunjukkan jumlah antara 10-150, maka dihitung jumlah koloni dan dikalikan dengan faktor pengenceran, kemudian diambil angka rata-rata. Hasil dikalikan sebagai Angka Kapang/Khamir dalam tiap gram atau mililiter sampel. Beberapa kemungkinan dapat terjadi jika tidak sesuai pada pernyataan di atas:

- a. Bila hanya salah satu diantara kedua cawan petri dari pengenceran yang menunjukkan jumlah antara 10-150 koloni, dihitung jumlah koloni dari kedua cawan dan dikalikan faktor pengenceran.
- b. Bila tingkat pengenceran yang lebih tinggi didapat jumlah koloni lebih besar dari dua kali jumlah koloni pada pengenceran dibawahnya, maka dipilih tingkat pengenceran terendah.
- c. Bila pada pengenceran yang lebih tinggi didapat jumlah koloni kurang dari dua kali jumlah koloni pengenceran dibawahnya, maka diambil angka rata-rata dari jumlah koloni kedua pengenceran tersebut. Hasil dinyatakan sebagai Angka Kapang dan Khamir dalam tiap gram per sampel.
- d. Bila dari seluruh cawan petri tidak ada satupun yang menunjukkan jumlah antara 10-150 koloni, maka dicatat angka sebenarnya dari tingkat pengenceran terendah dan dihitung sebagai Angka Kapang/Khamir perkiraan.
- e. Bila tidak ada pertumbuhan pada semua cawan maka Angka Kapang/Khamir dilaporkan sebagai kurang dari satu dikalikan faktor pengenceran terendah ( $<1 \times$  faktor pengenceran terendah) (Dwisari, 2021).

## 2. Analisis Data

### a. Analisis Univariat

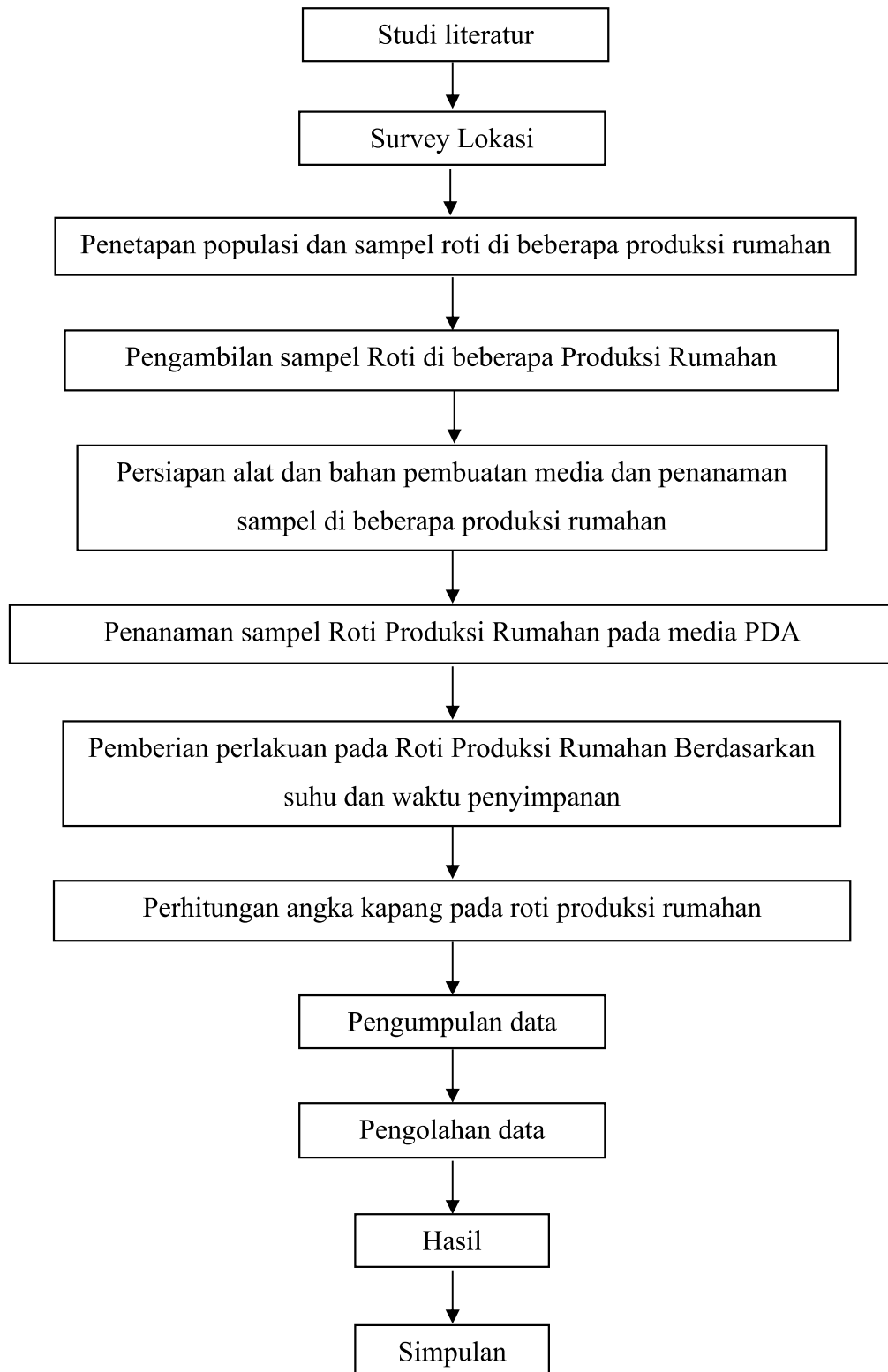
Analisis univariat untuk mengetahui angka kapang pada sampel roti produksi rumahan pada suhu ruang ( $25^{\circ}\text{C}$ ) dan suhu dingin ( $10^{\circ}\text{C}$ ) dan lama penyimpanan 7 hari (yang diamati dari hari ke-0 sampai ke-7) dengan perhitungan AKK (Angka Kapang Khamir) yang disajikan dalam bentuk tabel. Mengetahui angka kapang pada roti yang masih memenuhi syarat atau tidak memenuhi syarat sesuai dengan SNI 3788-2009 berdasarkan jumlah kapang yaitu  $1 \times 10^4$  koloni/g. data disajikan dalam bentuk tabel (Lampiran 1).

### b. Analisis Bivariat

Analisis bivariat bertujuan melihat pengaruh suhu dan lama penyimpanan terhadap angka kapang pada roti. Data berupa angka

kapang terhadap suhu dan lama penyimpanan pada roti produksi rumahan kemudian diolah dengan SPSS dan dilakukan uji normalitas dan homogenitas terlebih dahulu. Dalam uji normalitas yaitu, jika nilai *sig.*  $>0,05$  maka data tersebut berdistribusi normal dan jika nilai *sig.*  $<0,05$  maka data tersebut tidak berdistribusi normal. Uji homogenitas juga memiliki nilai yang sama dengan uji normalitas, dimana jika nilai *sig.*  $>0,05$  maka data tersebut homogen dan jika nilai *sig.*  $<0,05$  maka data tersebut tidak homogen. Jika data tersebut tidak berdistribusi normal dan tidak homogen, maka dilanjutkan dengan menggunakan *Uji Kruskal Wallis* dan *Uji Man Whitney*. Apabila terdapat perbedaan angka kapang pada roti produksi dengan *sig* 0,05 maka dilanjutkan dengan *Uji Kruskal Wallis Pairwise Comparison* pada tingkat kesalahan 5%.

### G. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian.

## H. *Ethical Clearance*

*Ethical clearance* yang diterapkan dalam penelitian ini tidak melibatkan manusia sebagai subjek penelitian, namun tetap mematuhi aspek etika. Penelitian telah diserahkan kepada Komite Etik Poltekkes Tanjungkarang dan dinilai kelayakannya dengan nomor surat No.115/KEPK-TJK/II/2023. Penelitian yang dilakukan dengan izin dari komite etik ini tidak menimbulkan risiko bagi lingkungan. Segala jenis limbah dari penelitian ini, termasuk limbah sampel roti kemasan, limbah B3, limbah larutan pengenceran, dan limbah lainnya, dikumpulkan dan dieliminasi dengan prosedur penanganan limbah yang sesuai. Limbah dari medium cawan petri dan limbah dari pertumbuhan kapang di medium dihancurkan melalui perebusan pada suhu 100°C selama 30 menit. Sisa sampel roti kemudian dibuang ke tempat pembuangan B3, sementara cawan petri direbus kembali dengan penambahan sabun dalam air mengalir.