

BAB 3

PROSEDUR PENELITIAN

3.1 Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan menggunakan pendekatan kuantitatif. Sukmadinata (2013:194) mengatakan bahwa karakteristik penelitian eksperimen ditunjukkan oleh dua hal, pertama dengan menguji secara langsung pengaruh suatu variabel terhadap variabel lain, kedua menguji hipotesis tentang kausalitas. Metode penelitian kuantitatif merupakan metode penelitian yang berlandaskan pada filsafat positivisme, digunakan untuk meneliti pada populasi atau sampel tertentu, teknik pengambilan biasanya dilakukan secara acak, pengumpulan data menggunakan instrumen penelitian, analisis data bersifat kuantitatif atau statistik, tujuannya adalah untuk menguji hipotesis yang telah ditetapkan (Sugiyono, 2015:14). Melalui pendekatan kuantitatif ini peneliti dapat menguji hipotesis yang telah dibuat dengan menganalisis data yang akan di dapatkan melalui serangkaian proses ilmiah. Sehingga nantinya akan ditarik kesimpulan yang hasilnya penolakan atau penerimaan hipotesis.

3.2 Variabel Penelitian

Sugiyono (2015:61) menyatakan bahwa variabel penelitian adalah suatu atribut atau sifat, atau nilai dari orang, obyek atau kegiatan yang mempunyai variasi tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya. Variabel penelitian dapat dibedakan menjadi variabel independen (bebas), variabel dependen (terikat), variabel moderator, dan variabel intervening. Variabel yang sering menjadi fokus utama penelitian adalah variabel independen (bebas) dan variabel dependen (terikat). Sugiyono (2015:16) mengatakan bahwa variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi penyebab perubahan atau timbulnya variabel dependen (terikat). Sedangkan variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi atau hasil dari variabel bebas.

Berdasarkan judul penelitian pengaruh lama penyimpanan yoghurt mangga (*Mangifera indica* L.) terhadap total bakteri asam laktat, maka terdapat dua variabel, yaitu:

a. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah total bakteri asam laktat.

b. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah lama penyimpanan pada suhu *refrigerator*.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi adalah wilayah generalisasi yang terdiri dari objek atau subjek dengan kualitas dan karakteristik tertentu yang ditentukan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya (Sugiyono, 2015:117). Populasi dalam penelitian ini adalah yoghurt mangga yang beredar dan biasa di perjual belikan di wilayah Kota Tasikmalaya yaitu Yoghurt Alwa, Sha's Yoghurt, Yoghurt Kawitna, dan Yoghurt Cimory.

3.3.2 Sampel

Sampel penelitian merupakan bagian dari populasi penelitian. Sugiyono (2015:118) menyatakan bahwa sampel adalah bagian dari jumlah dan karakteristik suatu populasi. Pada penelitian ini menggunakan *purposive sampling*. Karena saat memilih yoghurt ada beberapa kriteria yang digunakan seperti tanggal dan proses pembuatan yang sama, dan harus yoghurt mangga.

3.4 Desain Penelitian

Desain penelitian merupakan alur, kerangka kerja, dan prosedur untuk mendapatkan informasi yang dibutuhkan untuk menyusun dan menyelesaikan masalah dalam penelitian. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen murni dengan menggunakan rancangan penelitian berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan yang diberikan yaitu lama penyimpanan pada suhu *refrigerator* (3 hari, 6 hari, 9 hari, 12 hari, dan 15 hari) dengan keluaran adalah total

bakteri asam laktat. Yoghurt yang dijadikan sampel pada penelitian ini sebanyak satu sampel yoghurt, sedangkan total yoghurt yang digunakan selama penelitian ini adalah 6 yoghurt mangga.

Menurut Gomez (1984) penentuan banyaknya pengulangan masing-masing yoghurt mangga berdasarkan perhitungan rumus:

$$(t) (r-1) \geq 15$$

Keterangan:

t = Perlakuan

r = Pengulangan

15 = Faktor nilai derajat kebebasan umum

Berdasarkan rumus diatas jika jumlah perlakuan (t) = 5 maka jumlah pengulangan dapat diketahui sebagai berikut:

$$(t) (r-1) \geq 15$$

$$(5) (r-1) \geq 15$$

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Maka pada penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali pada tiap perlakuan. Penentuan perlakuan dilakukan secara Rancangan Acak Lengkap yang diperoleh menggunakan program *Microsoft Excel* dengan rancangan selengkapnya ditampilkan pada tabel 3.1 sebagai berikut:

Tabel 3.1 Rancangan Acak Lengkap

Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4
P0	P0	P0	P0
P1	P1	P1	P1
P2	P2	P2	P2
P3	P3	P3	P3
P4	P4	P4	P4
P5	P5	P5	P5

Keterangan:

P0: Kontrol (Hari ke-0)

P1: Hari ke-3

P2: Hari ke-6

P3: Hari ke-9

P4: Hari ke-12

P5: Hari ke-15

3.5 Langkah-langkah Penelitian

Secara umum, penelitian ini terdiri dari 2 tahapan, yaitu:

a. Tahap perencanaan dan persiapan, yang meliputi:

- 1) Mendapatkan SK mengenai penetapan pembimbing skripsi pada tanggal 1 November 2021;
- 2) Mengkonsultasikan judul skripsi dengan pembimbing I dan pembimbing II;
- 3) Judul yang sudah diajukan telah diterima dan ditandatangani oleh pembimbing I dan pembimbing II pada tanggal 18 November 2021;
- 4) Mengajukan judul ke Dewan Bimbingan Skripsi (DBS) kemudian diterima dan ditandatangani pada tanggal 19 November 2021;
- 5) Menyusun proposal penelitian dengan dimbimbing oleh pembimbing I dan pembimbing II;
- 6) Mengajukan permohonan seminar proposal penelitian kepada Dewan Bimbingan Skripsi (DBS);
- 7) Melaksanakan seminar proposal penelitian untuk mendapatkan saran, masukan, dan perbaikan mengenai proposal penelitian;



Gambar 3.1 Seminar Proposal Penelitian

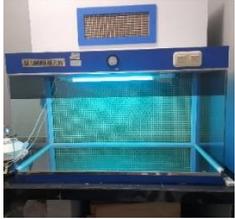
Sumber: Dokumentasi Pribadi

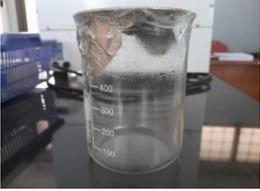
- 8) Melakukan konsultasi dengan pembimbing I dan Pembimbing II mengenai perbaikan proposal penelitian;
- 9) Mengurus perizinan untuk melaksanakan penelitian, seperti surat peminjaman laboratorium dan surat peminjaman alat laboratorium untuk melaksanakan penelitian di laboratorium;

b. Tahap pelaksanaan, yang meliputi:

1. Mempersiapkan alat dan bahan yang akan digunakan untuk penelitian yang dituliskan pada tabel 3.2 sebagai berikut:

Tabel 3.2 Alat dan Bahan

No	Alat dan Bahan	Spesifikasi dan Kegunaan	Gambar
1.	Inkubator	Untuk menginkubasi isolat bakteri	
2.	Mikroskop	Untuk mengidentifikasi bakteri asam laktat	
3.	Kulkas	Sebagai tempat dalam memberi perlakuan dan menyimpan yoghurt mangga	
4.	Laminar Air Flow	Untuk menjaga kesterilan	
5.	Autoklaf	Untuk mensterilkan alat	

No	Alat dan Bahan	Spesifikasi dan Kegunaan	Gambar
6.	Neraca analitik	Untuk menimbang media MRSA dan larutan pengencer BPW	
7.	Cawan petri	Sebagai media untuk mengisolasi dan membiakan bakteri	
8.	Tabung reaksi	Untuk tempat atau wadah dalam pengenceran bertingkat	
9.	Gelas ukur 10 ml	Untuk mengukur larutan pengencer dengan tepat	
10.	Gelas kimia 100 ml	Untuk tempat melarutkan dan memanaskan larutan pengencer BPW	
11.	Gelas kimia 500 ml	Untuk tempat melarutkan dan memanaskan media MRSA	
12.	Pipet tetes	Untuk mengambil crystal violet, lugol, alkohol, safranin, dan minyak imersi saat pewarnaan gram	

No	Alat dan Bahan	Spesifikasi dan Kegunaan	Gambar
13.	Mikropipet P1000 (yang bisa digunakan untuk mengambil cairan 100 μ l - 1000 μ l)	Untuk mengambil sampel dengan tepat	
14.	Objek glass	Untuk menempatkan objek yang akan diamati di mikroskop	
15.	Cover glass	Untuk menutup objek yang telah diletakan di atas objek glass	
16.	Jarum ose	Untuk menginokulasi mikroba	

No	Alat dan Bahan	Spesifikasi dan Kegunaan	Gambar
17.	Vortex centrifuge	Untuk proses homogenisasi	
18.	Tip mikropipet	Sebagai wadah penampung sampel dan untuk pengenceran	
19.	Erlenmeyer 500 ml	Wadah dalam pembuatan media MRSA	
20.	Spatula	Untuk mengambil media MRSA dan larutan BPW yang akan ditimbang	
21.	Batang pengaduk	Untuk mengaduk dalam pembuatan media MRSA dan larutan pengencer BPW	
22.	Hotplate magnetic stirrer	Untuk menghomogenkan media MRSA dan Larutan BPW	

No	Alat dan Bahan	Spesifikasi dan Kegunaan	Gambar
23.	Rak tabung reaksi	Untuk meletakkan tabung reaksi	
24.	Lampu spiritus atau bunsen	Untuk pemanasan, sterilisasi	
25.	Thermometer	Untuk mengukur suhu	
26.	Media MRSA (de Man, Rogosa, and Sharpe Agar)	Untuk mengisolasi dan mendukung pertumbuhan bakteri asam laktat	
27.	BPW (Buffered Peptone Water)	Untuk pengenceran	
28.	Alumunium foil	Melapisi alat dan bahan saat sterilisasi	

No	Alat dan Bahan	Spesifikasi dan Kegunaan	Gambar
29.	Aquadest	Untuk pembuatan media MRSA dan larutan pengencer BPW	
30.	Alkohol 70%	Untuk sterilisasi	
31.	Crystal violet	Untuk memberikan warna ungu pada mikroba sebagai pewarna primer	
32.	Lugol	Untuk melekatkan warna pada dinding sel bakteri	
33.	Alkohol	Untuk membilas atau melunturkan kelebihan zat warna pada sel bakteri	

No	Alat dan Bahan	Spesifikasi dan Kegunaan	Gambar
34.	Safranin	Sebagai pewarna tandingan atau sekunder	
25.	Minyak immersi	Untuk memperjelas objek dan melindungi mikroskop	
36.	Kertas payung	Untuk sterilisasi	
37.	Kertas label	Untuk melabeli sampel	
38.	Plastik tahan panas (polipropilen)	Untuk sterilisasi	

No	Alat dan Bahan	Spesifikasi dan Kegunaan	Gambar
39.	Sarung tangan	APD (Alat Pelindung Diri)	
40.	Masker	APD (Alat Pelindung Diri)	
41.	Plastik wrap	Untuk membungkus dengan rapat dan menjaga kesterilan	
42.	Karet gelang	Untuk sterilisasi	
43.	Tisu	Untuk membersihkan	
44.	Kapas	Untuk menutup beberapa alat agar terhindar dari kontaminan	

No	Alat dan Bahan	Spesifikasi dan Kegunaan	Gambar
45.	Yoghurt mangga	Yoghurt mangga sebagai sampel yang diteliti	
46.	Kalkulator	Kalkulator untuk menghitung total bakteri asam laktat	
47.	Pulpen	Pulpen untuk mencatat data	
48.	Binder	Binder untuk mencatat data	
49.	Solasiban	Untuk merekatkan saat sterilisasi	
50.	Cutter	Untuk membagi kertas payung	

No	Alat dan Bahan	Spesifikasi dan Kegunaan	Gambar
51.	Pisau	Untuk memotong plastik wrap	
52.	Korek api	Untuk menyalakan pembakar bunsen	
53.	Super pel	Untuk kebersihan lantai dan kesterilan lantai di laboratorium	
54.	Saniter spray	Untuk mensterilkan udara pada ruangan	

No	Alat dan Bahan	Spesifikasi dan Kegunaan	Gambar
55.	Sabun cuci piring	Untuk membersihkan alat-alat laboratorium yang sudah digunakan	
56.	Sikat tabung	Untuk membersihkan tabung reaksi, gelas ukur, dan erlenmeyer	
57.	Spons	Untuk membersihkan cawan petri	

2. Pelaksanaan penelitian, meliputi

a. Sterilisasi alat dan bahan, meliputi:

- 1) Pertama-tama cuci alat-alat yang terbuat dari kaca menggunakan sabun dan bilas dengan air mengalir sampai bersih kemudian dikeringkan;
- 2) Setelah kering, alat yang akan digunakan dibungkus dengan menggunakan kertas;
- 3) Setelah dibungkus, alat yang akan digunakan dimasukkan kedalam autoklaf untuk di sterilisi dengan suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 15 menit;
- 4) Pemanas dimatikan kemudian tunggu hingga tekanan 0 atm;
- 5) Alat-alat dikeluarkan dari autoklaf
- 6) Alat siap digunakan.

Proses sterilisasi dapat dilihat pada gambar 3.2.



Gambar 3.2 Proses Sterilisasi
Sumber: Dokumentasi Pribadi

b. Pembuatan Medium MRSA

- 1) Pertama-tama, bahan-bahan disiapkan;
- 2) Larutkan 30,69 gr medium MRSA ke dalam 450 ml aquades;
- 3) Selanjutnya panaskan sambil diaduk hingga larut dan homogen, kemudian masukkan ke dalam erlenmeyer dan tutup dengan kapas;
- 4) Setelah itu bungkus erlenmeyer menggunakan plastik tahan panas kemudian disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.

Proses pembuatan media MRSA dapat dilihat pada gambar 3.3.



Gambar 3.3 Proses Pembuatan Media MRSA
Sumber: Dokumentasi Pribadi

c. Pembuatan larutan pengencer BPW

- 1) 2,55 gr BPW ditimbang kemudian dilarutkan ke dalam 100 ml aquades;
- 2) Setelah itu diaduk hingga benar-benar larut;
- 3) Selanjutnya dimasukkan ke dalam 9 tabung reaksi sebanyak 9 ml untuk masing-masing tabung reaksi, kemudian ditutup;
- 4) Setelah itu disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

Proses pembuatan larutan pengencer BPW dapat dilihat pada gambar 3.4.



Gambar 3.4 Proses Pembuatan Larutan Pengencer BPW

Sumber: Dokumentasi Pribadi

d. Total Bakteri Asam Laktat.

- 1) 1 ml sampel yoghurt dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml larutan BPW dan diaduk menggunakan spatula hingga diperoleh pengenceran 1 (P^{-1});
- 2) Selanjutnya dari P^{-1} diambil 1 ml untuk dilarutkan kedalam larutan pengencer 9 ml BPW sehingga diperoleh P^{-2} ;
- 3) Lakukan hal yang sama hingga memperoleh pengenceran 9 (10^{-9});
- 4) Setelah itu dilakukan inokulasi dengan metode tuang atau metode *pour plate*. Pemupukan dengan metode tuang dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 1 ml sampel yang telah diencerkan kemudian disebar pada permukaan cawan Petri. Media MRSA steril sebanyak 12–15 ml dituangkan

ke dalam cawan Petri dan dihomogenisasi agar sampel tersebar merata, lalu dibiarkan hingga media agar mengeras;

- 5) Cawan Petri kemudian dibalik dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam;
- 6) Jumlah bakteri asam laktat (BAL) ditentukan melalui penghitungan koloni BAL dalam cawan. Hasil analisis ditentukan *berdasarkan Bacteriological Analytical Manual (BAM)*, dan dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$N = \frac{\sum c}{\{(1 \times n1) + (0,1 \times n2)\} \times d}$$

Keterangan:

N = jumlah koloni per ml atau per gram

$\sum c$ = jumlah koloni dari tiap-tiap cawan petri (25-250 koloni cawan)

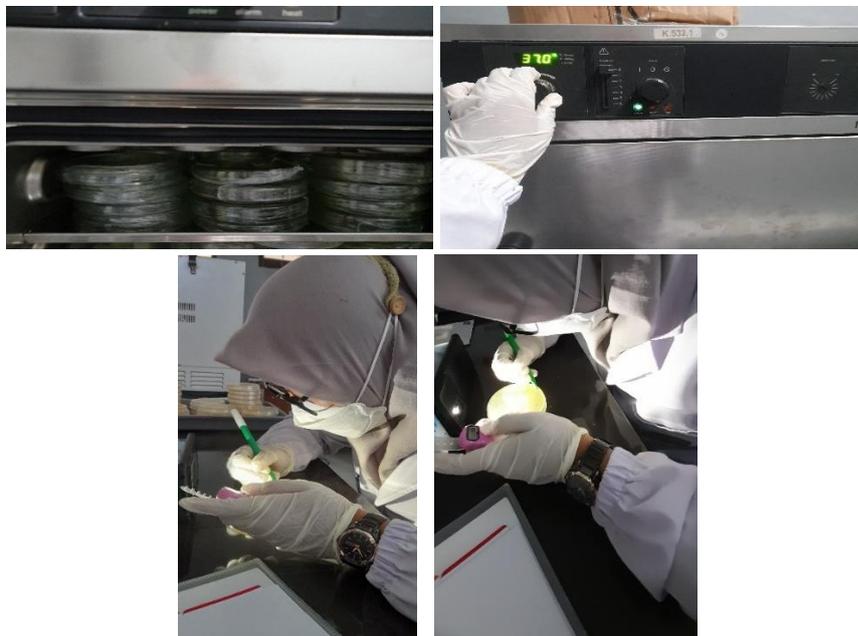
n1 = Jumlah cawan dari pengenceran pertama yang koloninya dapat dihitung

n2 = jumlah cawan dari pengenceran kedua yang koloninya dapat dihitung

d = pengenceran pertama yang dihitung

Pembuatan kultur isolat BAL dan perhitungan koloni BAL dapat dilihat pada gambar 3.5.





Gambar 3.5 Pembuatan Kultur Isolat BAL dan Perhitungan Koloni BAL
Sumber: Dokumentasi Pribadi

e. Teknik Pewarnaan Gram

- 1) Buatlah pulasan bakteri di atas objek glass, keringkan dan fiksasi dengan api;
- 2) Teteskan cat crystal violet (Gram A) dan diamkan 60 detik;
- 3) Buanglah sisa cat dan cuci dengan air mengalir;
- 4) Teteskan larutan iodine (Gram B) dan diamkan selama 1 menit;
- 5) Cuci dengan air mengalir, kemudian di decolorisasi (di beri larutan peluntur) dengan alkhohol (Gram C) (kira-kira 20 detik, hati-hati jangan sampai berlebihan yang mengakibatkan kesa;ahan hasil;
- 6) Cuci dengan air mengalir, tambahkan larutan safranin (Gram D) selama 10-20 detik;
- 7) Cuci kembali dengan air mengalir, angin-anginkan dan amati di bawah mikroskop dengan menggunakan minyak immersi;
- 8) Amati hasil-hasil pengecatan bakteri dengan diberi keterangan mengenai warna sel yang menunjukkan sifat gram dan bentuk sel.

Proses teknik pewarnaan gram dapat dilihat pada gambar 3.6.



Gambar 3.6 Proses Teknik Pewarnaan Gram
Sumber: Dokumentasi Pribadi

3.6 Teknik Pengumpulan Data

Penelitian ini dilakukan dengan observasi secara langsung di Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Siliwangi. Observasi merupakan suatu teknik atau cara mengumpulkan data dengan melakukan pengamatan terhadap kegiatan yang sedang berlangsung (Sukmadinata, 2013:220). Sugiyono (2015:203) menyatakan bahwa teknik pengumpulan data dengan observasi digunakan apabila penelitian berkaitan dengan perilaku manusia, proses kerja, gejala-gejala alam dan bila responden yang diamati tidak terlalu besar. Objek yang akan di observasi secara langsung yaitu total bakteri asam laktat yang terdapat pada yoghurt mangga yang telah diberikan perlakuan selama 3 hari, 6 hari, 9 hari, 12 hari, dan 15 hari. Teknik pengambilan data berupa total dari bakteri asam laktat menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*).

3.7 Instrumen Penelitian

Sugiyono (2015:148) mengatakan bahwa instrumen penelitian merupakan suatu alat yang digunakan untuk mengukur fenomena alam maupun sosial yang diamati, secara spesifik semua fenomena ini disebut variabel penelitian. Instrumen penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *colony counter* untuk menghitung banyaknya bakteri asam laktat. Data hasil perhitungan menggunakan *colony counter* disajikan dalam data record di bawah ini.

Tabel 3.3 Data record

Perlakuan dan Kontrol	Ulangan				Rata-rata Total BAL (CFU/ml)
	1 (CFU/ml)	2 (CFU/ml)	3 (CFU/ml)	4 (CFU/ml)	
0 hari	$6,1 \times 10^8$	$4,5 \times 10^8$	$1,35 \times 10^9$	$8,6 \times 10^8$	$8,18 \times 10^8$
3 hari	$1,42 \times 10^{12}$	$1,012 \times 10^{12}$	$1,48 \times 10^{12}$	$1,70 \times 10^{12}$	$1,40 \times 10^{12}$
6 hari	$2,42 \times 10^8$	$3,71 \times 10^8$	$1,21 \times 10^8$	$5,0 \times 10^7$	$1,96 \times 10^8$
9 hari	$2,54 \times 10^4$	$1,98 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$1,99 \times 10^4$	$2,25 \times 10^4$
12 hari	$1,62 \times 10^4$	$7,3 \times 10^3$	$2,82 \times 10^4$	$3,7 \times 10^4$	$2,22 \times 10^4$
15 hari	$2,19 \times 10^4$	$1,65 \times 10^4$	$2,63 \times 10^4$	$1,68 \times 10^4$	$2,04 \times 10^4$

3.8 Teknik Pengolahan dan Analisis Data

Setelah data didapatkan maka data tersebut dianalisis dengan menggunakan bantuan aplikasi SPSS dengan tahapan sebagai berikut:

a. Uji Prasyarat analisis

1) Uji normalitas data

Uji normalitas data dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui apakah sampel yang telah diambil dari hasil penelitian berasal dari populasi yang berdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas data pada penelitian ini menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov. Apabila hasilnya data yang telah diambil berdistribusi normal maka analisis dilanjutkan dengan uji homogenitas, tetapi jika sebaliknya maka analisis dilanjutkan dengan uji statistika nonparametrik (Analisis Ragam Peringkat Satu Arah Kruskal-Wallis).

2) Uji homogenitas varians

Uji homogenitas varians digunakan untuk mengetahui apakah dua atau lebih kelompok data memiliki varians yang homogen atau tidak. Uji homogenitas varians pada penelitian ini menggunakan uji Levene. Apabila

hasilnya kelompok data mempunyai varians yang homogen maka dilanjutkan dengan analisis varians satu jalur. Tetapi apabila sebaliknya maka dilanjutkan dengan uji statistika nonparametrik (Analisis Ragam Peringkat Satu Arah Kruskal-Wallis).

b. Uji Hipotesis

Uji hipotesis dilakukan apabila hasil dari uji prasyarat analisis telah didapatkan. Analisis statistik pada penelitian ini menggunakan analisis varians satu jalur untuk mengetahui apakah terdapat pengaruh yang signifikan antar perlakuan. Jika terdapat pengaruh maka analisis dilanjutkan dengan uji Tukey HSD.

3.9 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November tahun 2021 sampai dengan bulan September 2022. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat melalui Tabel 3.4. Kemudian penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Botani Universitas Siliwangi (Gambar 3.7) di Jalan Siliwangi No. 24, Kelurahan Kahuripan, Kecamatan Tawang, Kota Tasikmalaya, Jawa Barat.



Gambar 3.7 Tempat Penelitian (Laboratorium Mikrobiologi)
Sumber: Dokumentasi Pribadi

