

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Objek Penelitian

Objek dalam penelitian ini adalah uji daya hambat bakteri *Staphylococcus aureus* dengan sampel bahan alam dari fermentasi *eco-enzyme*. Penelitian ini di fokuskan dengan mengamati dan membandingkan pengaruh jenis bahan organik dalam *eco-enzyme* terhadap daya hambat bakteri *Staphylococcus aureus*. Terdapat jenis bahan organik yang di bedakan pada 3 kombinasi pada setiap formulanya.

Eko-enzim 1: kulit lemon+ air+ gula pohot

Eko-enzim 2: kulit lemon+ kulit nanas+air+gula pohot

Eko-enzim 3: kulit lemon+kulit nanas+kangkung+air+gula pohot

3.2 Sampel dan Teknik Sampling

Sampel yang digunakan dalam pembuatan *Eco-enzyme* adalah fermentasi bahan organik. Bahan organik yang digunakan ada kulit lemon yang diperoleh dari pejual jeruk peras di Jl. Kartini Kota Tegal, kulit nanas dan kangkung yang diperoleh di Pasar Pagi Kota Tegal, kemudian dicampurkan air dan gula pohon yang diperoleh di Talang Kota Tegal untuk difermentasikan selama 3 bulan.

Teknik sampling yang digunakan untuk pengambilan sampel yaitu *Total sampling* karena pengambilan sampel berdasarkan campuran bahan organik *Eco-enzyme* yang terkandung pada semua kelompok sampel. Kemudian

semua sampel diambil untuk memastikan campuran jenis bahan pada *Eco-enzyme* yang dapat menghambat bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.3 Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang mencakup timbulnya efek atau sebab tergantung pada jenis variabelnya. Dalam penelitian ini yang menjadi variabel adalah jenis bahan organik yang digunakan pada pembuatan *Eco-enzyme* seperti kulit lemon (*Citrus limon* (L.)) kulit nanas (*Ananas comosus*), dan kangkung (*Ipomoea aquatica*) dengan berbagai perbedaan konsentrasinya.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang mencerminkan kemampuan bahan organik *Eco-enzyme* dalam menghambat pertumbuhan atau menyebabkan kematian bakteri *Staphylococcus aureus*. Dalam penelitian ini yang menjadikan variabel adalah zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus*.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali adalah variabel yang dibuat berdasarkan konsentrasi bahan organik *Eco-enzyme* sehingga tidak dapat dipengaruhi variabel yang diteliti. Pada penelitian ini variabel terkendali yang digunakan adalah pengambilan sampel, proses pembuatan *Eco-enzyme*, proses fermentasi, dan uji aktivitas antibakteri. Dengan perbedaan jenis bahan organik yang digunakan dapat mempengaruhi daya hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.4 Teknik Pengumpulan Data

1. Alat Dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: toples, gelas ukur, batang pengaduk, beaker glass, tabung reaksi, cawan petri, kaki tiga, kompor spirtus, asbes, pH meter, inkubator, autoklaf, timbangan, neraca analitik, mikro pipet, lidi, kapas, kasa steril, plastik, aluminium foil, *Laminar Air Flow* (LAF), rak tabung reaksi, jarum ose, dan *Bothdrop*.

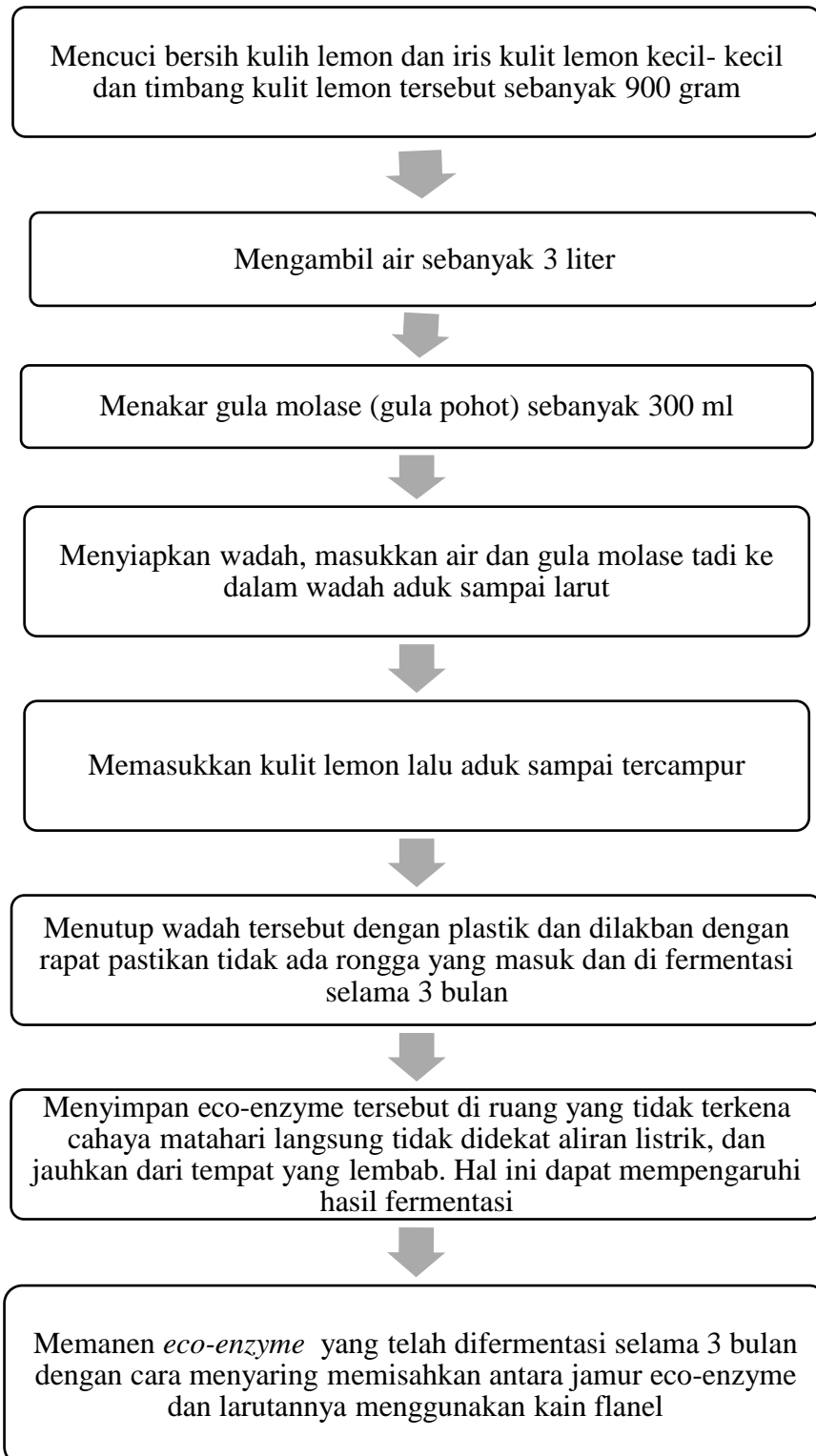
b. Bahan

Bahan yang dipakai pada penelitian ini antara lain: 1650 gram kulit lemon, 750 gram kulit nanas, 300gram kangkung, 9000 ml air, gula pohot 9000 ml, 1,5 gram media NA, 2.78 gram media BHI, 11.4 gram media MHA, dan *aquadest* 550 ml.

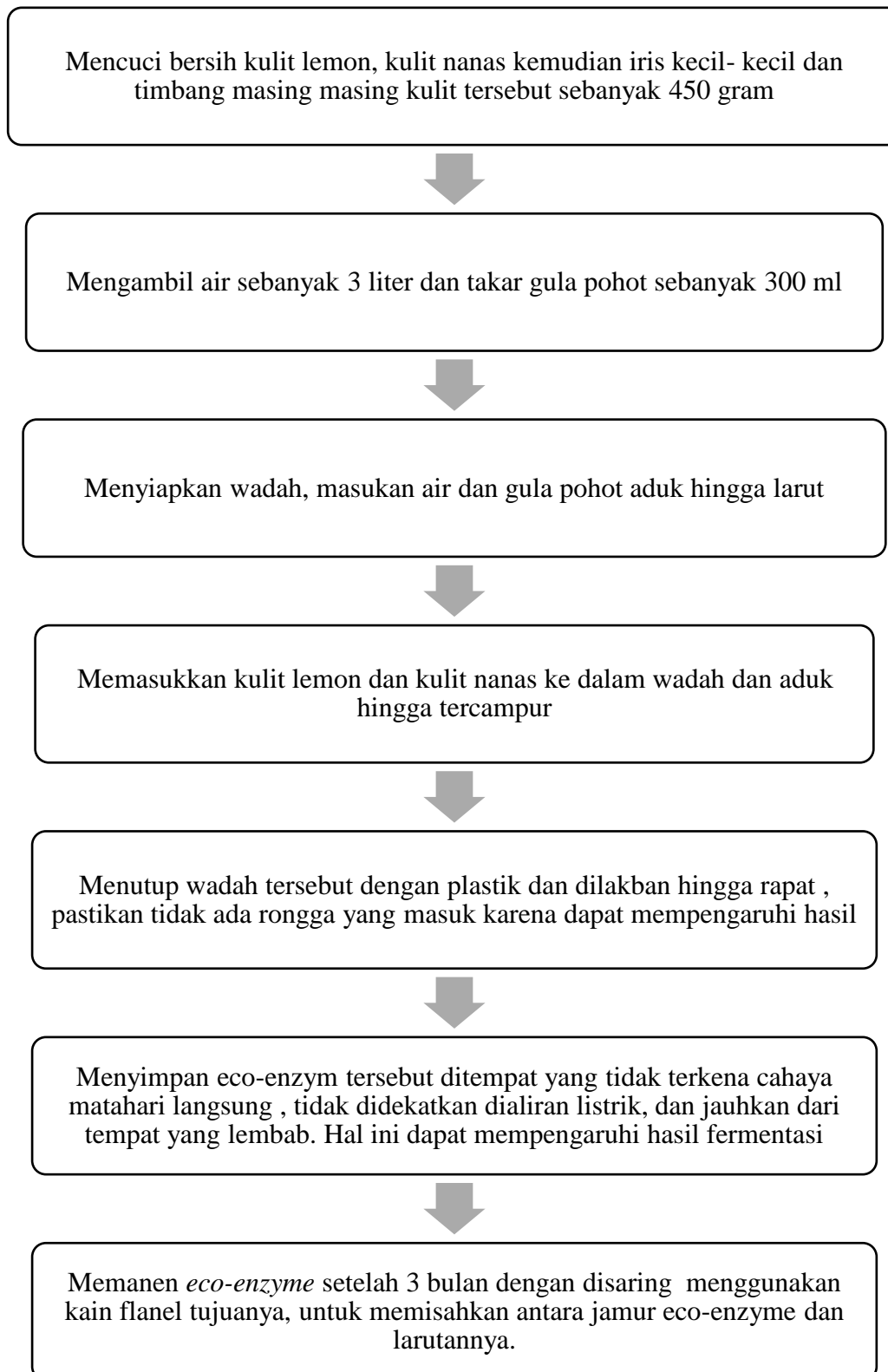
2. Cara Kerja

a. Pembuatan *Eco-enzyme*

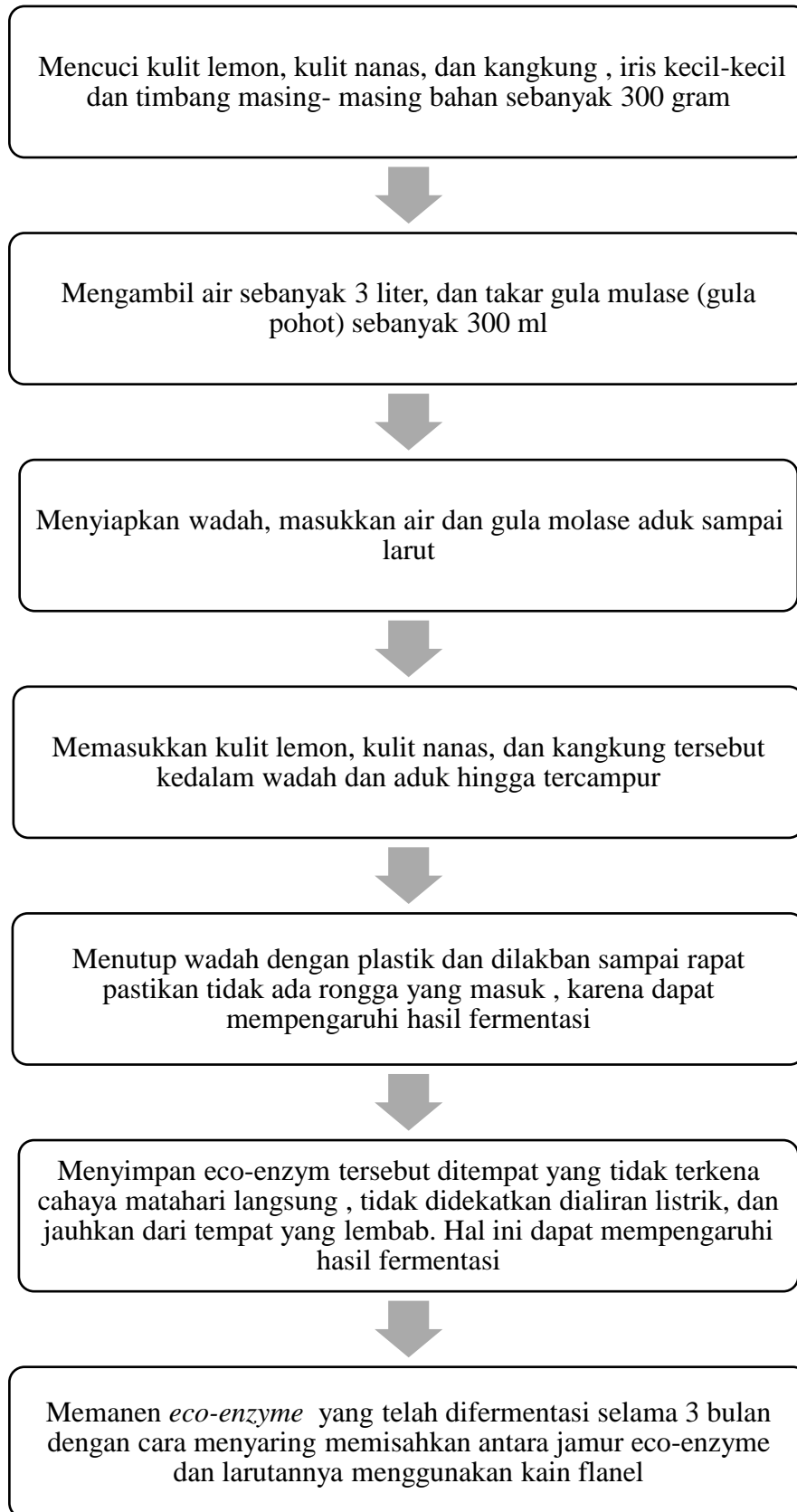
Eco-enzyme merupakan hasil fermentasi campuran dari bahan organik, air, dan gula (molase). Perbandingan pembuatan *Eco-enzyme* air: bahan organik: gula yang digunakan gula pohot (10:3:1). Pembuatan *Eco-enzyme* dibedakan dari banyaknya jenis bahan organik yang digunakan pada setiap wadah.



Gambar 5. Pembuatan *Eco-enzyme* 1



Gambar 6. Pembuatan *Eco-enzyme 2*

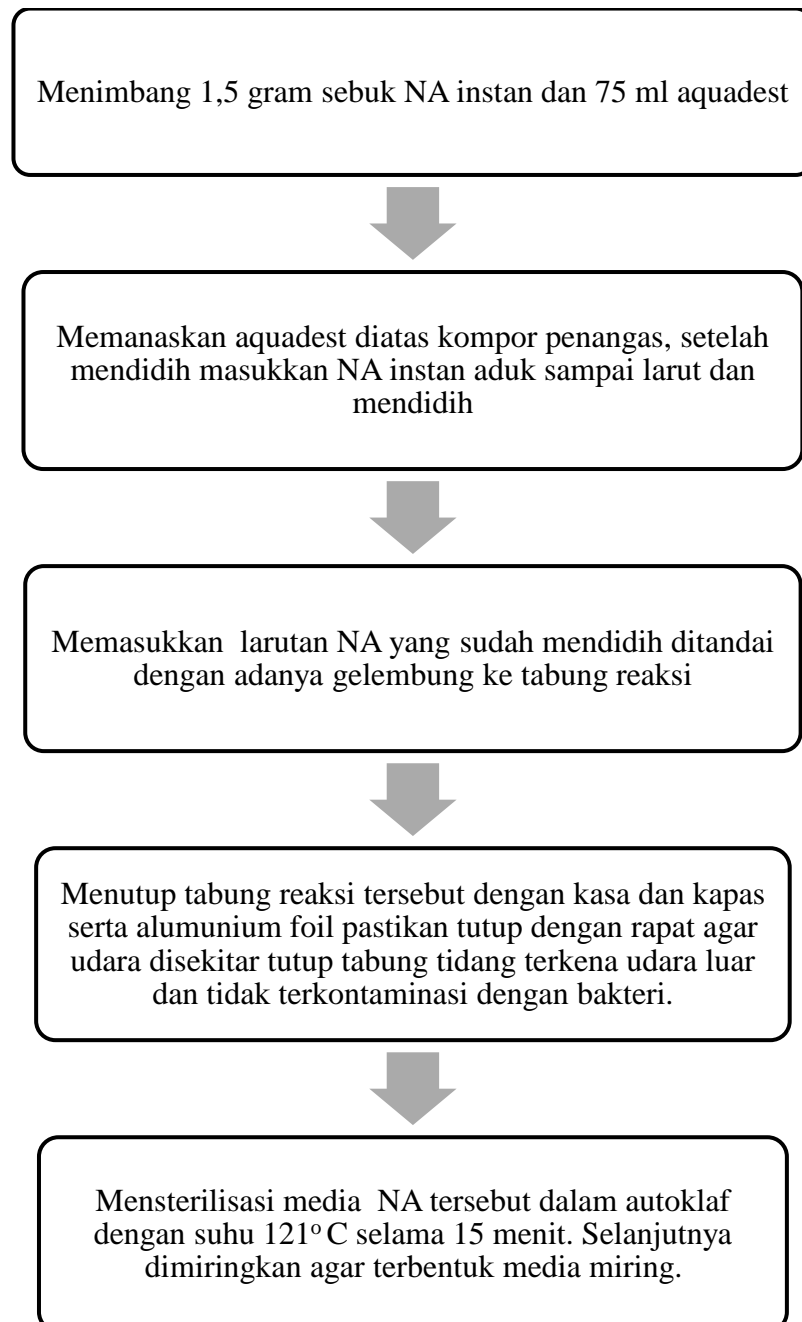


Gambar 7. Pembuatan *Eco-enzyme* 3

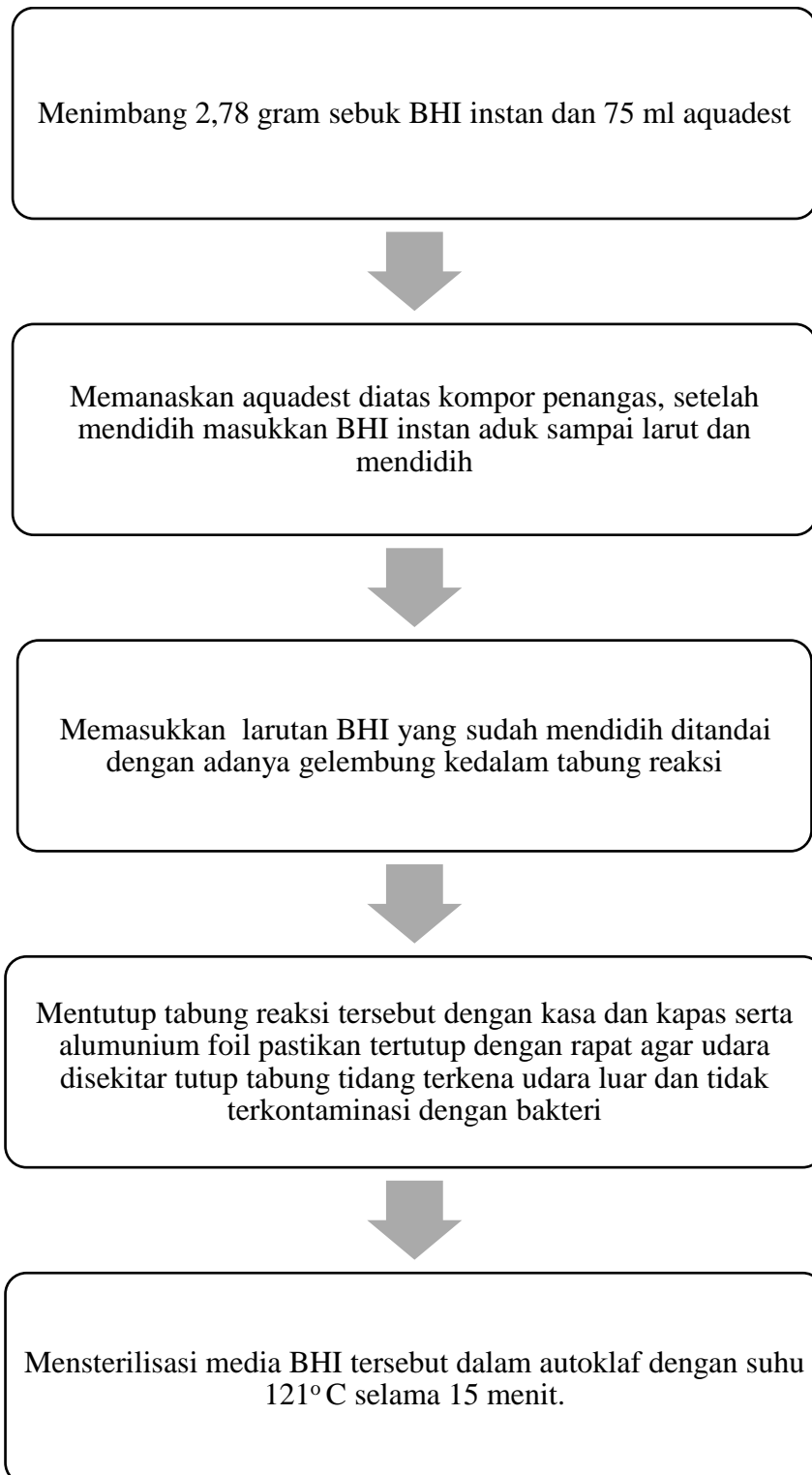
3. Pembuatan Media

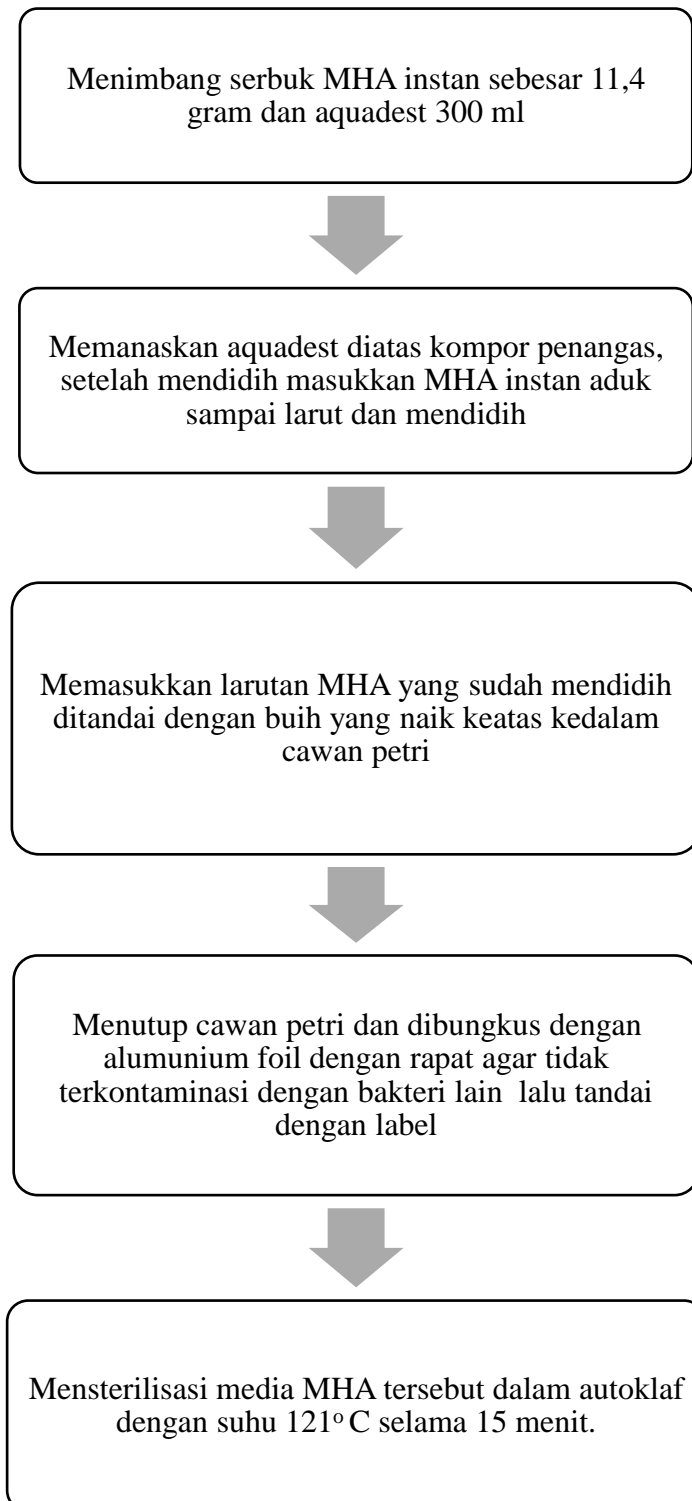
a. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

Pembuatan media ini dibuat media bakteri yaitu: media nutrient agar sebagai media dasar yang digunakan untuk pembiakan bakteri.



Gambar 3. 1 Pembuatan media *Nutrient Agar* (NA)

b. Pembuatan Media Brain Heart Infussion (BHI)**Gambar 8.Pembuatan Media *Brain Heart Infussion* (BHI)**

c. Pembuatan Media Mueller Hinton Agar (MHA)**Gambar 9. Pembuatan Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)**

4. Peremajaan Kultur Bakteri

Peremajaan kultur bakteri adalah proses memperbaharui kultur bakteri yang telah tumbuh dan berkembang dalam media, untuk mempertahankan keberagaman genetik dan kualitas kultur bakteri tersebut. Caranya adalah dengan mengambil sejumlah kecil kultur bakteri *Staphylococcus aureus* yang sudah tumbuh pada satu biakan dan diambil menggunakan jarum ose steril dari kultur murninnya. Kemudian dioleskan secara merata pada permukaan media dengan menggunakan loop steril. Kemudian, loop steril digunakan untuk melakukan pengulangan pola garis-garis pada permukaan media. Hal ini dilakukan untuk memastikan bahwa setiap koloni bakteri yang terbentuk berasal dari satu sel bakteri (Hendri *et al.*, 2023).

5. Uji aktivitas Antibakteri

Pengujian daya hambat bakteri dilakukan dengan metode difusi sumuran. Dengan cara membuat lubang pada media menggunakan *boor drop* sebanyak 4 lubang dan mencelupkan kapas lidi yang steril kedalam media BHI cair. Kemudian mengusapkannya secara perlahan dan merata pada permukaan media MHA yang terdapat dalam cawan petri. Penelitian ini menggunakan tiga sampel yaitu *Eco-enzyme* satu (hanya menggunakan kulit lemon sebagai campuran bahan organik pada *eco-enzyme*), *Eco-enzyme* dua (kulit lemon dan kulit nanas sebagai campuran bahan organik pada *Eco-enzyme*), *Eco-enzyme* tiga (kulit lemon, kulit nanas, dan sayur kangkung sebagai campuran bahan organik pada *eco-enzyme*) dan *aquadest* steril untuk kontrol negatif. Masing-masing diberi volume sebanyak 50 mikro menggunakan mikropipet pada setiap lubang sumuran

yang sudah diberi label penanda cawan petri. Rangkaian cara kerja tadi dilakukan sebanyak tiga kali replikasi diruang steril dengan api bunsen menyala serta menggunakan sarung tangan dan masker sehingga tidak terkontaminasi dengan bakteri lainnya. Proses selanjutnya menggunakan incubator dengan suhu 370°c selama 1-2 kali 24 jam. Setelah itu diamati dan mengukur daerah zona bening yang tampak pada media dengan menggunakan jangka sorong.

3.5 Cara analisis

Diameter zona hambat yang didapatkan dengan menggunakan jangka sorong. Semakin besar zona hambat bakteri ditandai dengan mengukur zona total dan sumuran. Semakin lebar diameter zona bakteri maka semakin bagus bahan/ sampel yang digunakan dalam menghambat bakteri. Hasil tersebut selanjutnya dianalisis menggunakan statistic *one way analysis of varian* (ANOVA) pada taraf 5% untuk perbandingan hasil uji luas daya hambat bakteri.