

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Objek Penelitian

Objek pada penelitian yaitu aktivitas antibakteri dari beberapa *eco-enzyme* yang telah di fermentasi selama 3 bulan, 4 bulan, dan 5 bulan.

3.2. Sampel dan Teknik Sampling

3.2.1. Sampel

Sampel yaitu salah satu susunan dari populasi yang mewakili populasi serta bersifat representative (Nurrahman et al., 2021). Sampel dalam penelitian ini adalah hasil fermentasi *eco-enzyme* dengan lama fermentasi 3 bulan, 4 bulan, dan 5 bulan. *Eco-enzyme* yang dibuat terdiri dari kulit buah-buahan segar seperti kulit melon, kulit semangka, kulit papaya, kulit nanas dan kulit pisang.

3.2.2. Teknik Sampling

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini yaitu menggunakan *probability sampling* (random sampel) berupa *simple random sampling* (sampel acak sederhana). Satu kelompok media MHA mendapat 4 sumuran sebagai uji antibakteri metode difusi yaitu sumuran 1 berisi aquadest, sumuran 2 berisi *eco-enzyme* fermentasi 3 bulan, sumuran 3 berisi *eco-enzyme* fermentasi 4 bulan dan sumuran 4 berisi *eco-enzyme* fermentasi 5 bulan. Kemudian kelompok media MHA di replikasi sebanyak 3 kali. Sehingga total sampel yang diperlukan sebanyak 12.

3.3 Variable Penelitian dan Definisi Operasional

3.3.1. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan ialah aktivitas *eco-enzyme* dengan lama fermentasi masing-masing 3 bulan, 4 bulan, dan 5 bulan.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini yaitu diameter zona hambat pada bakteri *Staphylococcus aureus*.

3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini adalah volume media uji yang digunakan, suhu dan waktu inkubasi.

3.3.2. Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

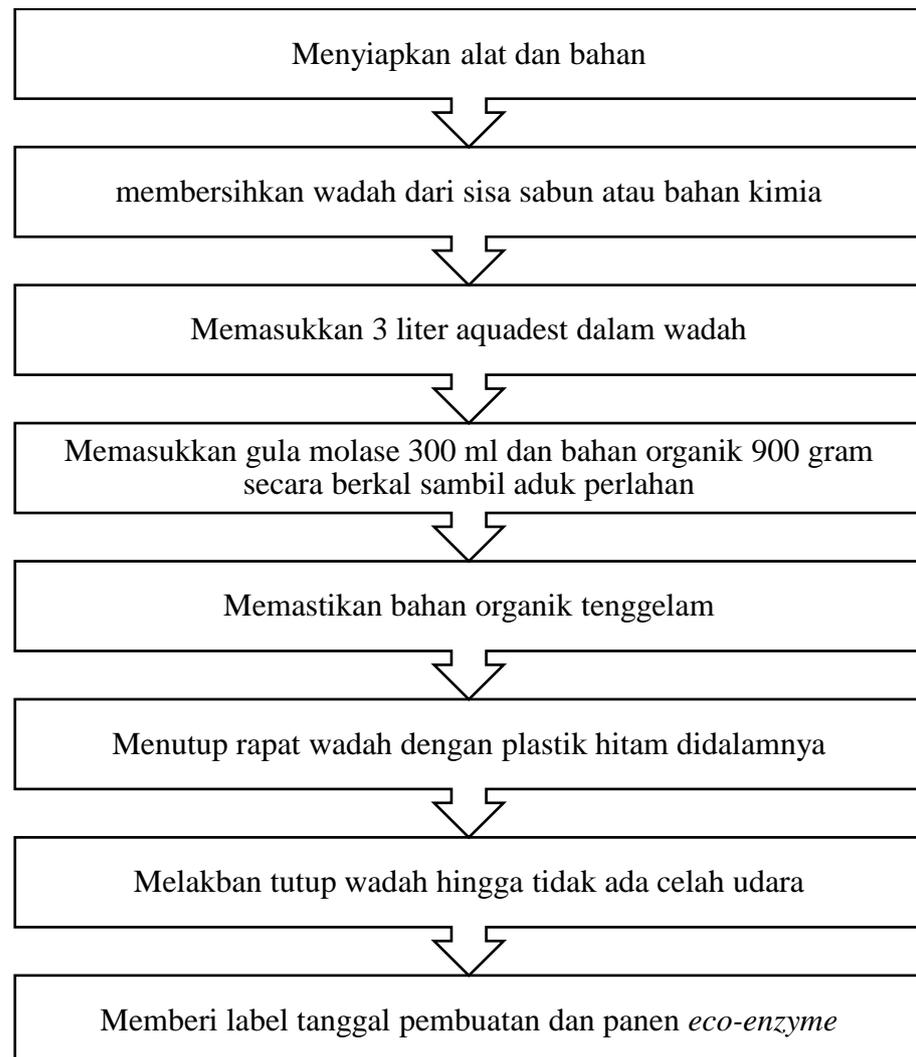
No.	Variabel	Definisi Operasional	Alat ukur	Kategori
1.	<i>Eco-enzyme</i>	Larutan organik kompleks yang terbuat dari bahan dasar sampah organik berupa limbah sayur dan buah yang difermentasi dengan gula dan air selama tiga bulan. Hasil fermentasi berupa cairan dan ampas.	Timbangan digital, gelas ukur	
2.	Uji aktivitas antibakteri pada cairan <i>eco-enzyme</i>	Mengukur zona hambat pada cairan <i>eco-enzyme</i> terhadap bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .	Jangka sorong	Lemah = < 5 mm Sedang = 6 – 10 mm Kuat = 11 – 20 mm Sangat kuat = > 20 mm

3. Kontrol negative	Kontrol negatif (pelarut) yang diketahui tidak mengandung aktivitas antibakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dan sebagai pembanding dalam uji aktivitas antibakteri	Mikropipet Aquadest
---------------------	---	---------------------

3.4. Teknik Pengumpulan Data

3.4.1. Pembuatan *Eco-Enzyme*

Eco-enzyme terbuat dari sisa sayuran dan buah segar beserta gula molase dan air. Takaran sisa sayur dan buah: molase: air ialah 3:1:10 (Mahdia et al., 2022). Wadah *eco-enzyme* kali ini memiliki kapasitas 13 liter, agar fermentasi aman dari ledakan karbondioksida yang dihasilkan *eco-enzyme* digunakan air 3 liter, gula molase 300 gram, dan bahan organik 900 gram. Bahan organik yang digunakan terdiri dari kulit nanas 200 gram, kulit papaya 200 gram, kulit melon 200 gram, kulit semangka 200 gram, dan kulit pisang 100 gram. Dibuat sebanyak 3 wadah dengan jangka waktu masing masing 3 bulan, 4 bulan dan 5 bulan fermentasi. Alat yang digunakan untuk pembuatan *eco-enzyme* ini diantaranya wadah 3, timbangan, gelas ukur 1 liter, dan pengaduk kayu. Berikut skema cara kerja pembuatan *eco-enzyme*:



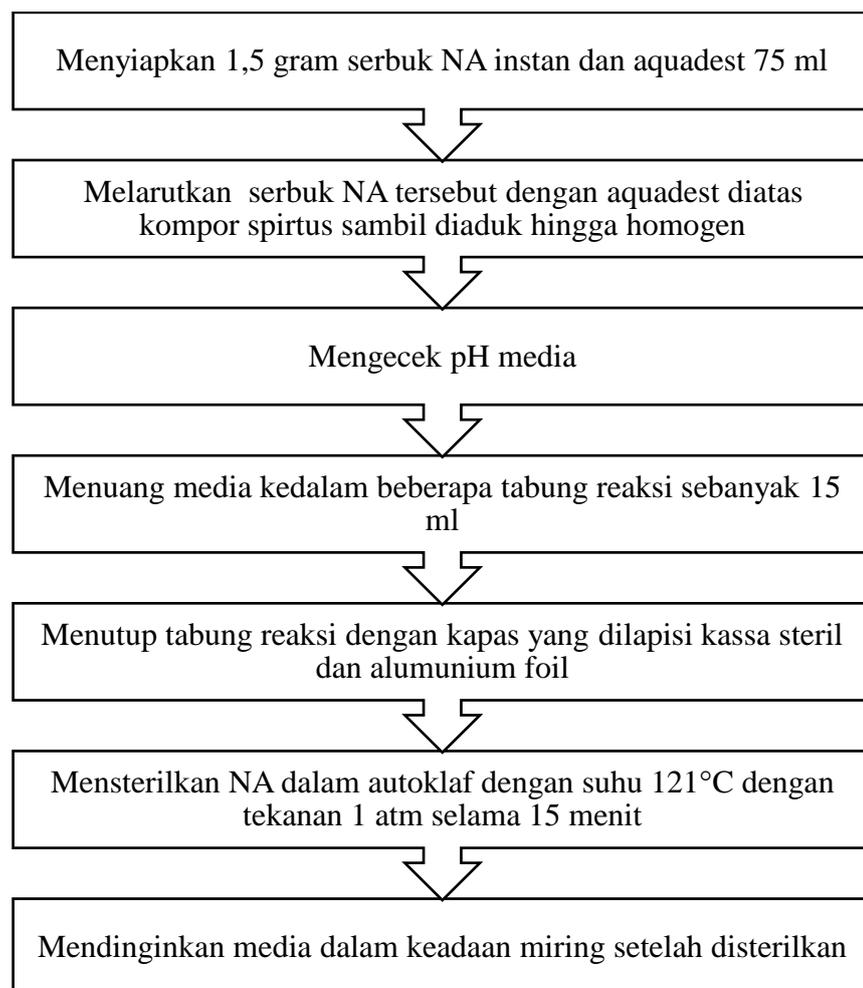
Gambar 3. Skema Pembuatan Eco-enzyme
(Sumber: Shinta, 2016)

3.4.2. Pembuatan Media

a. Nutriet Agar (NA)

Alat yang digunakan dalam pembuatan NA diantaranya timbangan, gelas beker, kompor spirtus, batang pengaduk, tabung reaksi, kassa steril, kapas, alumunium foil, dan autoklaf. Sedangkan bahan yang dibutuhkan yaitu serbuk NA dan aquadest. Media NA dibuat dengan melarutkan 1,5 gram serbuk NA instan

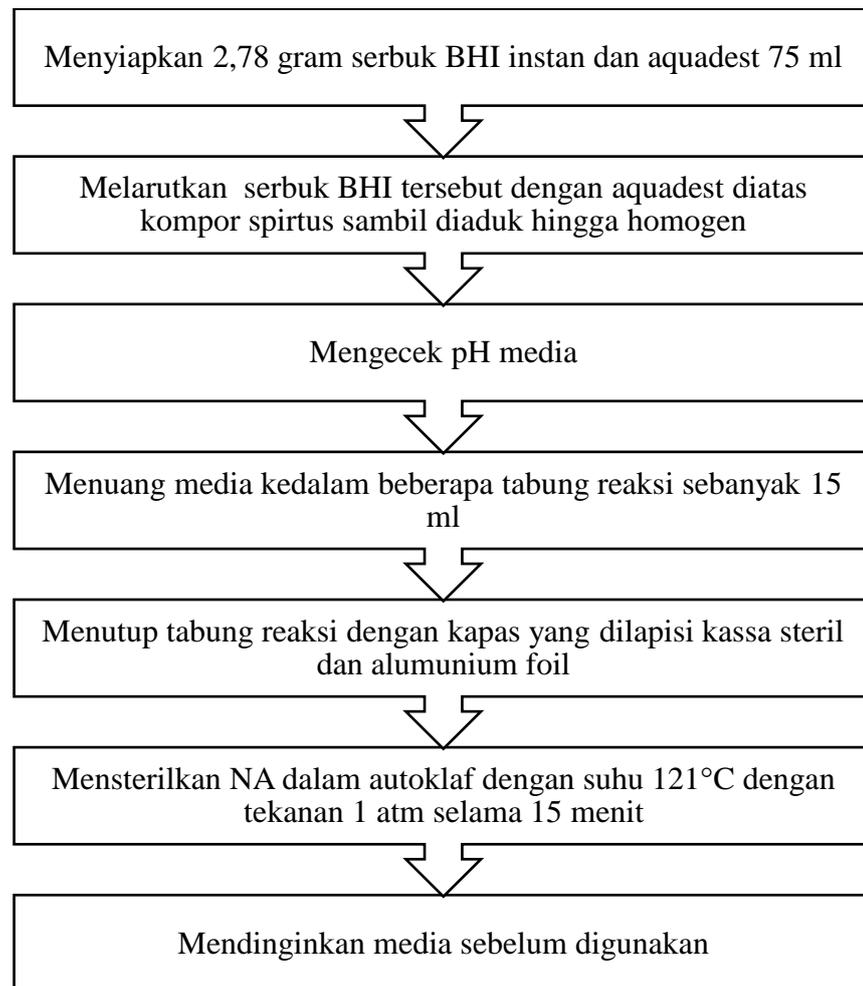
dengan 75 ml aquadest steril yang hangat dalam beaker glass, lalu dilakukan pengecekan pH media (6,8-7). Bagi media NA yang telah jadi kedalam beberapa tabung reaksi sebanyak 15 ml. Sterilkan media dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Sebelum disterilkan tutup lubang tabung reaksi menggunakan kapas yang dilapisi kasa kemudian tutup rapat kembali dengan alumunium foil. Dari proses diatas dapat dibuat skema sebagai berikut:



Gambar 4. Skema Pembuatan Media NA
(Sumber: Shinta, 2016)

b. *Brain Heart Infusion* (BHI)

Alat yang digunakan dalam pembuatan BHI diantaranya timbangan, gelas beker, kompor spirtus, batang pengaduk, tabung reaksi, kassa steril, kapas, alumunium foil, dan autoklaf. Sedangkan bahan yang dibutuhkan yaitu serbuk BHI dan aquadest. Media BHI dibuat dengan cara melarutkan 2,78 gram serbuk BHI instan dengan 75 ml aquadest steril yang hangat dalam beaker glass, lalu dilakukan pengecekan pH 6,8-7. Bagi media untuk beberapa tabung reaksi sebanyak 15 ml. Sterilkan media menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atmosfer selama 15 menit. Sebelum disterilkan tutup lubang tabung reaksi menggunakan kapas yang dilapisi kasa kemudian tutup rapat kembali dengan alumunium foil. Dari proses diatas dapat dibuat skema sebagai berikut:

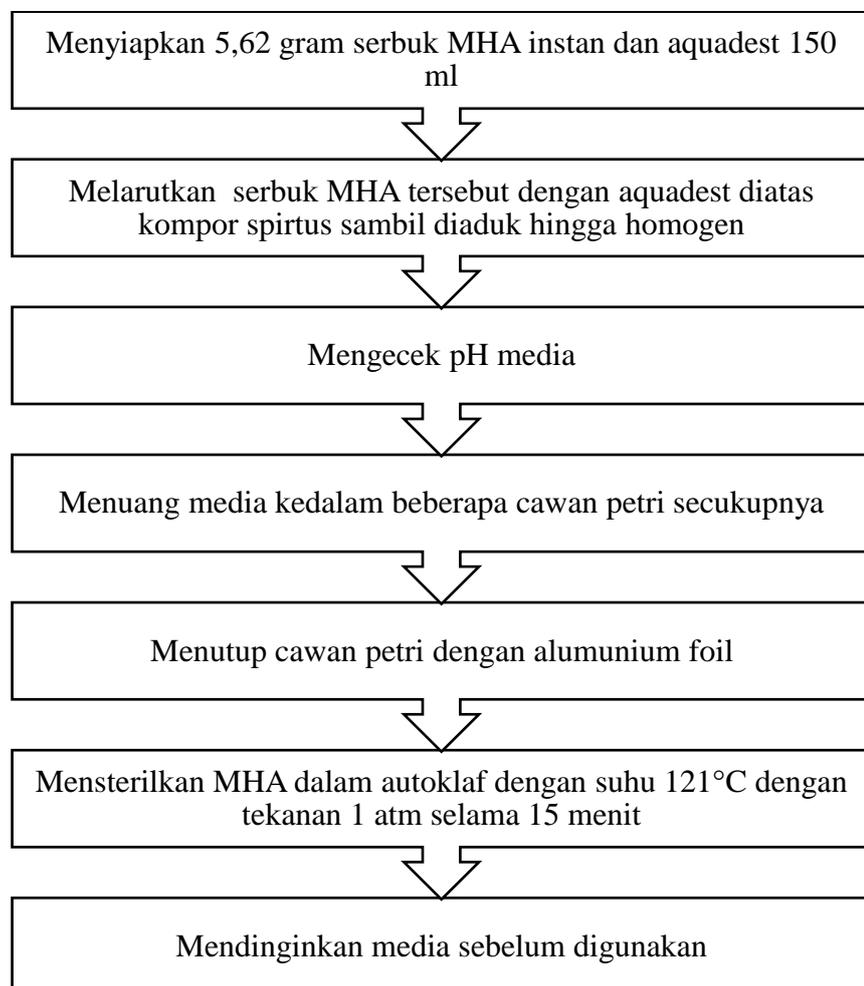


Gambar 5. Skema Pembuatan Media BHI
(Sumber: Shinta, 2016)

c. *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Alat yang digunakan dalam pembuatan MHA diantaranya timbangan, gelas beker, kompor spirtus, batang pengaduk, cawan petri, autoklaf, dan alumunium foil. Sedangkan bahan yang dibutuhkan yaitu serbuk MHA dan aquadest. Pembuatan media MHA diawali dengan menimbang serbuk media MHA instan sebanyak 5,62 gram kemudian memasukan kedalam labu beaker glass, melarutkan dengan aquadest steril sebanyak 150 ml diatas

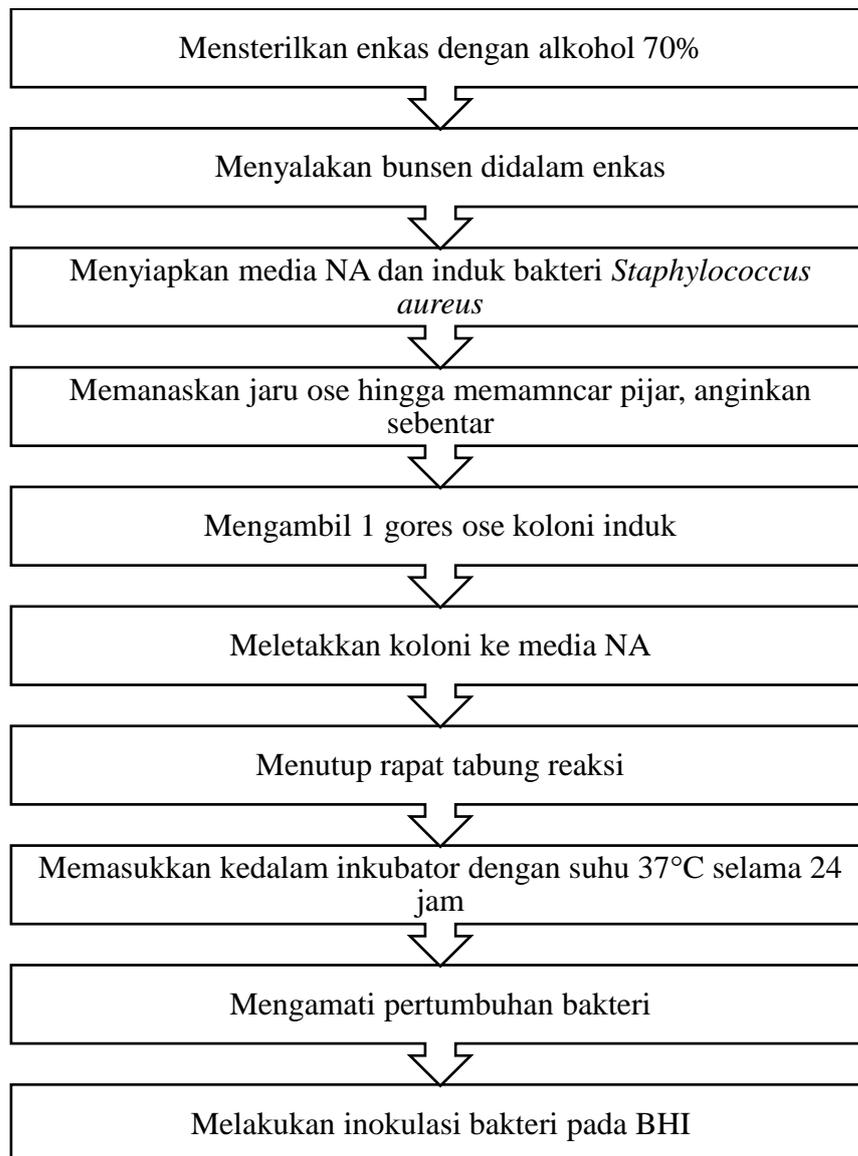
lampu spirtus. Sambil diaduk-aduk perlahan hingga terlarut sempurna. Selanjutnya bagi media MHA kedalam cawan petri yang kemudian ditutup dengan kapas dan kassa steril yang dilapisi alimunium foil. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Dari proses diatas dapat dibuat skema sebagai berikut:



Gambar 6. Skema Pembuatan Media MHA
(Sumber: Shinta, 2016)

3.4.3. Pembuatan Inokulum Bakteri

Alat yang digunakan dalam pembuatan inokulum bakteri yaitu enkas, lampu bunsen, jarum ose, dan inkubator. Sedangkan bahan yang dibutuhkan adalah media NA dan bakteri induk *Staphylococcus aureus*. Pembuatan inokulum atau penanaman bakteri dilakukan dengan cara mengambil 1 ose koloni *Staphylococcus aureus* dari media induk dan ditanam pada media NA dibuat garis lurus dengan menarik dasar tabung lurus keatas, dilakukan beberapa kali menggunakan jarum ose. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam diamati perubahan yang terjadi, jika bakteri tersebut tumbuh kemudian proses dilanjutkan dengan menginokulasi pada media BHI. Proses-proses tersebut dilakukan pada ruang enkas aseptik dengan lampu spirtus yang menyala dan menggunakan masker dan sarung tangan. Dari proses diatas dapat dibuat skema sebagai berikut:

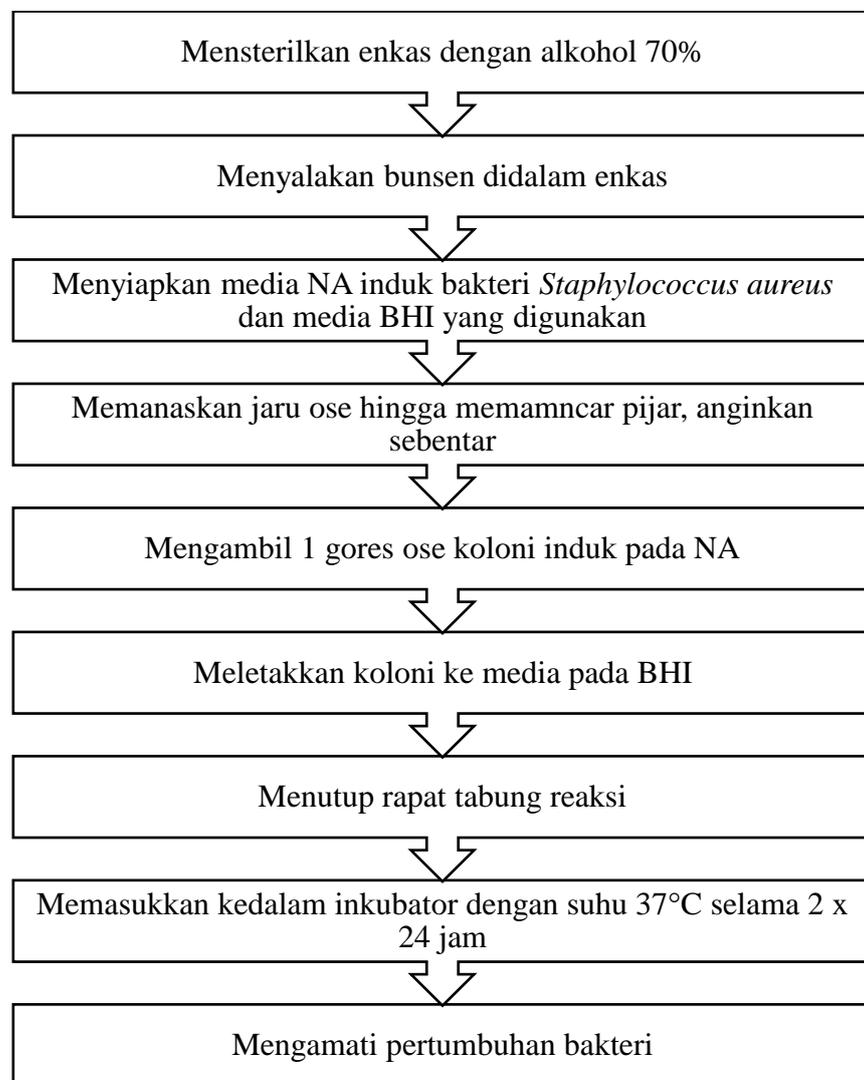


Gambar 7. Skema Pembuatan Inokulum Bakteri
(Sumber: Astutiningrum, 2016)

3.4.4. Inokulasi Induk Bakteri

Alat yang digunakan dalam inokulasi bakteri yaitu enkas, lampu bunsen, jarum ose, dan inkubator. Sedangkan bahan yang dibutuhkan adalah NA bakteri induk *Staphylococcus aureus* dan media BHI baru. Inokulasi pada media BHI dengan cara hasil pembiakkan dari media

NA diambil dengan menggunakan ose bulat dan dimasukkan kedalam media BHI yang berupa media cair, dilakukan satu kali dan proses tersebut diulang pada media BHI lainnya. Selanjutnya media BHI yang terdapat koloni bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam. Proses-proses tersebut dilakukan pada ruang *in case aseptik* dengan lampu spirtus yang menyala dan menggunakan masker dan sarung tangan. Dari proses diatas dapat dibuat skema sebagai berikut:

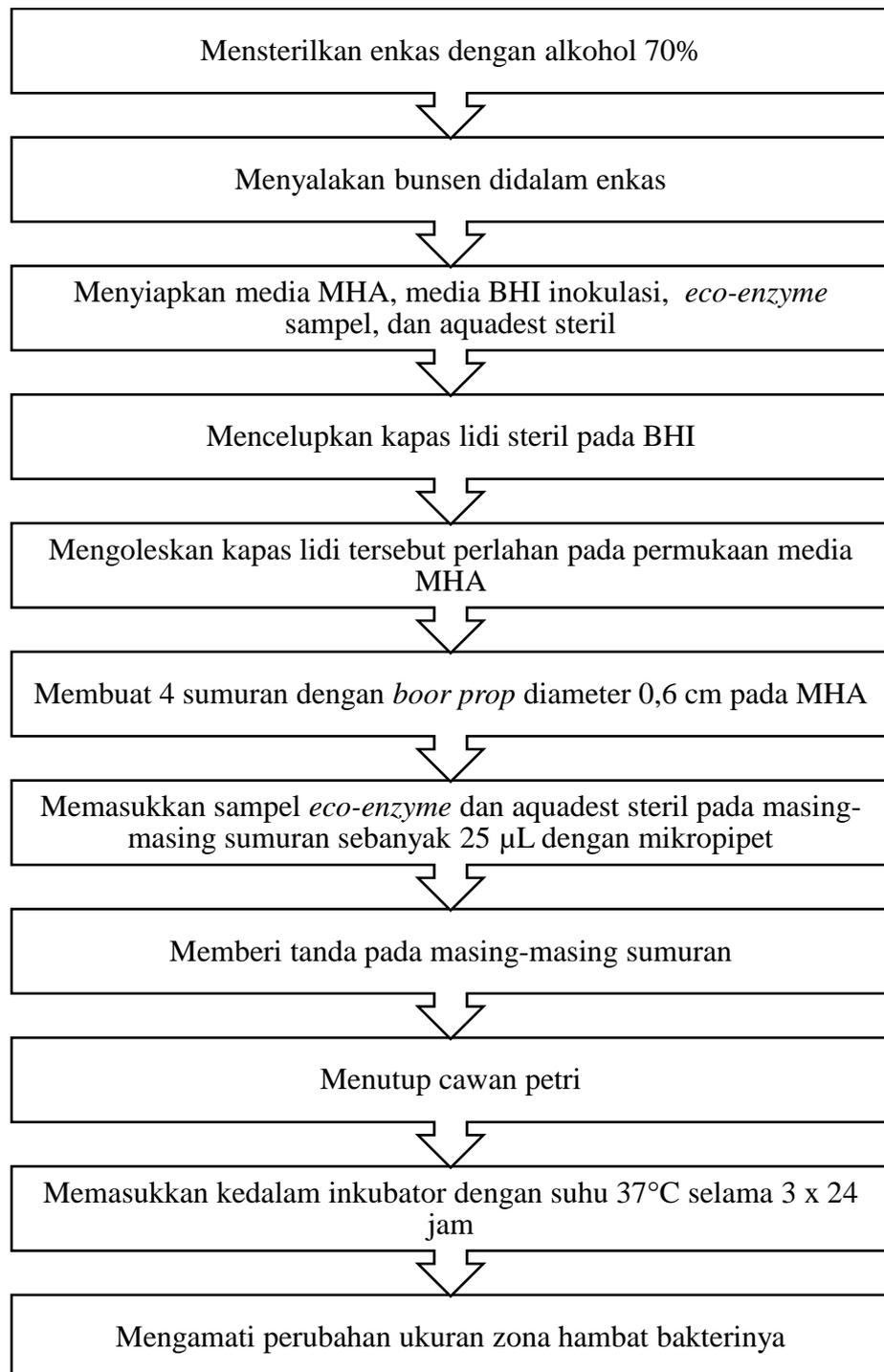


Gambar 8. Skema Inokulasi Induk Bakteri
(Sumber: Astutiningrum, 2016)

3.4.5. Pengujian Daya Hambat Bakteri

Alat yang digunakan pada pengujian daya hambat bakteri yaitu *boor prop*, jarum ose, kassa lidi steril, mikropipet, label dan inkubator. Sedangkan bahan yang dibutuhkan adalah inokulasi bakteri *Staphylococcus aureus* pada BHI, media MHA, *eco-enzyme* sampel, aquadest steril. Pengujian daya antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi cetak lubang yaitu dengan cara mencelupkan kapas lidi pada media BHI cair kemudian mengusapkannya secara perlahan pada media MHA yang terdapat dalam cawan petri sampai rata. Biarkan mengering selama 3-5 menit, kemudian mencetak sumuran pada media tersebut dengan menggunakan *boor prop* dengan diameter 0,6 cm.

Pada penelitian ini dibuat 4 sumuran, tiga untuk *eco-enzyme* dengan waktu fermentasi berbeda-beda yaitu 3 bulan, 4 bulan, dan 5 bulan masing-masing sebanyak 25 μ L, menggunakan mikropipet, memberi tanda pada masing-masing sumuran. Rangkaian cara kerja tersebut dilakukan sebanyak tiga kali replikasi. diruang in case aseptik dengan lampu spirtus yang menyala serta menggunakan sarung tangan dan masker. Proses selanjutnya adalah menggunakan inkubator yang telah diatur suhu dan waktunya. Setelah itu amati dan mengukur daerah hambat yang tampak pada media dengan menggunakan janga sorong. Dari proses diatas dapat dibuat skema sebagai berikut:



Gambar 9. Skema Pengujian Daya Hambat Bakteri
(Sumber: Singkoh, 2011)

3.4.6. Pembacaan Hasil

Pembacaan daerah hambat dari *eco-enzyme* dilakukan dengan mengukur diameter sumuran dan diameter total disekitar lubang dengan menggunakan jangka sorong.

Tabel 3. Penilaian Zona Hambat

Diameter Zona Hambat	Respon Hambatan Pertumbuhan
≤ 5 mm	Lemah
6 – 10 mm	Sedang
11 – 20 mm	Kuat
≥ 21 mm	Sangat Kuat

Sumber: Susanto et al., 2012

3.4.7. Cara Analisis

Analisis data dilakukan dengan metode analisis deskriptif yaitu suatu yang sebenarnya sesuai dengan hasil dalam penelitian, baik fenomena alamiah maupun fenomena buatan manusia yang kemudian disusun, diolah dan dianalisis untuk memberikan gambaran mengenai masalah yang ada dalam penelitian. Penelitian ini juga menggunakan analisis statistik dengan SPSS dan di uji menggunakan *One Way Anova*.