

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial. Pada penelitian ini digunakan 2 faktor dan 5 kali ulangan. Factor pertama variasi suhu penyimpanan tepung cacing. Factor kedua variasi lama penyimpanan tepung cacing tanah *Lumbricus rubellus*. Perlakuan dalam penelitian adalah hasil kombinasi antar faktor dari seluruh taraf perlakuan dengan 5 perlakuan dan 5 ulangan.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini menggunakan variasi suhu penyimpanan (suhu kamar, kulkas dan freezer) dan lama penyimpanan (0 hari, 7 hari, 14 hari dan 21 hari) terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* ini dilaksanakan pada bulan April 2011 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variable bebas yaitu factor yang sengaja diubah atau dimanipulasi oleh peneliti dengan maksud untuk mengetahui perubahan apa yang terjadi (Nurhayati, 2007). Variable yang digunakan adalah 2 variabel yaitu perbedaan suhu penyimpanan (suhu freezer 0°C, suhu kulkas 4°C, dan suhu kamar atau ruangan

26°C) dan lama penyimpanan tepung cacing yaitu 0 hari, 7 hari, 14 hari dan 21 hari.

3.3.2 Variabel Terikat

Variable terikat yaitu faktor yang diukur atau diamati sebagai akibat dari manipulasi variable bebas (Nurhayati, 2007). Variable terikat dalam penelitian ini adalah pengukuran panjang diameter zona hambat bakteri *Salmonella typhi* pada media SSA.

3.3.3 Variabel Control / Variable Kendali

Variable kendali yaitu faktor yang sengaja dikendalikan supaya tidak mempengaruhi variable bebas maupun variabel terikat (Nurhayati, 2007). Variable kendali dalam penelitian ini adalah medium biakan bakteri, temperature inkubasi, lama inkubasi, nilai pH komponen pembenihan, dan kelembaban.

3.4 Definisi Operasional Variabel

1. Konsentrasi tepung cacing tanah adalah tepung hasil penghancuran tubuh cacing tanah kering yang dibandingkan dengan aquades steril dan menggunakan perhitungan persen berat per volum (w/v).
2. Suhu penyimpanan tepung cacing tanah adalah suhu pada ruang yang digunakan untuk menyimpan tepung cacing tanah setelah pembuatan tepung cacing tanah. Suhu yang dipakai adalah (suhu freezer 0°C, suhu kulkas 4°C, dan suhu kamar atau ruangan 26°C).

3. Lama penyimpanan tepung cacing adalah waktu yang digunakan untuk menyimpan tepung cacing pada saat sebelum dilakukan perlakuan yaitu selama 0 hari, 7 hari, 14 hari dan 21 hari.
4. Cacing tanah yang digunakan yaitu dari spesies *Lumbricus rubellus* hasil budidaya dari daerah Sidoarjo Indah Surabaya.
5. Zona hambat adalah suatu area yang tidak ditumbuhi bakteri sebagai daya hambat yang diujikan dan biasanya ditandai dengan daerah yang berwarna bening. Berpengaruh atau tidaknya bahan anti mikroba dapat dilihat dari besar kecilnya area yang tidak ditumbuhi mikroba. Pengukuran diameter zona hambat menggunakan jangka sorong, dengan pengukuran berawal dari tepi daerah zona hambat hingga ke tepi zona hambat yang terpanjang lainnya. Sedangkan satuannya digunakan millimeter (Nurhayati, 2007).
6. Medium biakan adalah media yang digunakan untuk membiakkan *Salmonella typhi*. Media yang digunakan adalah media SSA (Salmonella-Shigella Agar) dalam cawan petri sebanyak 10 ml.
7. Temperatur inkubasi adalah suhu yang digunakan untuk menyimpan cawan petri yang sudah diinokulasi bakteri *Salmonella typhi* dan sudah diberi perlakuan tepung cacing dan suhu pengolahannya. Suhu yang digunakan adalah 37°C. untuk mengondisikan lingkungan mencapai suhu 37°C, cawan petri disimpan dalam incubator yang sebelumnya telah diatur sesuai dengan suhu yang diinginkan (Nurhayati, 2007).

8. Lama inkubasi adalah waktu yang digunakan untuk mengetahui pertumbuhan *Salmonella typhi* dengan melihat diameter zona hambatnya. Waktu yang digunakan adalah 1×24 jam (Salehurrahman, 2009).
9. Nilai pH adalah pH media yang sengaja dikondisikan, yaitu pada pH 6,5-7,5 media SSA ber-pH 7,0 (Nurhayati, 2007).
10. Komponen-komponen pembenihan adalah media yang digunakan, yaitu media SSA (Samonella-Shigella Agar) yang mengandung agar-agar, kaldu, dan kasein (Nurhayati, 2007).
11. Kelembaban, adalah kelembaban yang ada di ruangan ketika penelitian (Nurhayati, 2007).

3.5 Instrumen Penelitian

3.5.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, Erlenmeyer, *beaker glass*, *micropipet*, pembakar spiritus / Bunsen, *incubator*, *autoclave*, oven, *hot plate magnetic stirrer*, jangka sorong, timbangan analitik, jarum ose, pinset, spatula, karet gelang, kertas HVS bekas, kapas, kain kasa, gelas ukur, kertas label, gunting aluminium foil, tissue, spidol permanen, corong kaca, *mortar*, spatel (spreader), toples.

3.5.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: biakan murni bakteri *Salmonella typhi*, tepung cacing tanah *Lumbricus rubellus*, medium SSA, medium NB, BaCl_2 1%, H_2SO_4 1%, aquades steril, paper disk (kertas cakram dibuat dari

kertas *Wattman* nomor 1), alcohol 70%, NaCl fisiologis, disk chloramphenicol, disk seftriakson, spiritus.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pembuatan Tepung Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*)

Pembuatan tepung cacing tanah dilakukan dengan menggunakan metode Julendra dan Sofyan (2007) yang diadopsi dari Mihara *et al* (1991) dengan modifikasi. Adapun langkahnya sebagai berikut. Pertama kali dilakukan identifikasi spesies, maksudnya agar cacing yang diproses benar-benar spesies cacing yang dimaksud yaitu *Lumbricus rubellus*. Cacing tanah dibersihkan dari tanah dan kotoran lainnya yang menempel, kemudian dicuci dengan air mengalir. Cacing tanah dioven dalam suhu 60°C selama 6 jam. Cacing tanah dihaluskan dengan cara ditumbuk hingga menjadi tepung cacing tanah kemudian diayak. Tepung cacing yang sudah diayak dimasukkan dalam toples yang tertutup rapat lalu disimpan dalam suhu kamar, suhu kulkas, suhu freezer dan penyimpanan dilakukan selama 0 hari, 7 hari, 14 hari dan 21 hari sebelum diuji.

3.6.2 Sterilisasi Alat

Metode sterilisasi adalah sebagai berikut:

a. Sterilisasi Kering

Sterilisasi kering meliputi cara sterilisasi dengan api langsung dan cara sterilisasi dengan oven pemanas

- 1) Sterilisasi dengan api langsung, sterilisasi ini dilakukan terhadap peralatan seperti jarum ose, pinset, spatel, mulut tabung biakan dan batang

pengaduk. Sesudah disterilkan peralatan tersebut didinginkan terlebih dahulu sebelum digunakan.

- 2) Sterilisasi dengan oven pemanas, oven pemanas digunakan untuk sterilisasi peralatan gelas yang tidak berskala. Alat-alat yang akan disterilkan dimasukkan ke dalam oven setelah suhu mencapai 106°C selama 1-2 jam.

b. Sterilisasi Basah

Sterilisasi dilakukan dengan menggunakan autoklaf. Peralatan yang disterilkan dengan sterilisasi basah diantaranya sterilisasi medium dan cawan petri. Proses sterilisasi ini dilakukan pada suhu 12°C dengan tekanan 12 atmosfer selama 15 menit.

3.6.3 Pembuatan Media

3.6.3.1 Pembuatan Media NB (*Nutrien Broth*)

Media NB dibuat untuk peremajaan bakteri yang pembuatannya berdasarkan aturan yang tertera pada kemasan yaitu sebagai berikut: sebanyak 18 gram NB dilarutkan dalam 1 liter aquades. Larutan dipanaskan sambil diaduk dalam *beaker glass* menggunakan *hot plate magnetic stirrer* hingga homogen. Dituang dalam tabung reaksi dan disterilkan terlebih dahulu sebelum digunakan.

3.6.3.2 Pembuatan Media SS Agar (*Salmonella-Sigella Agar*) plate

Langkah-langkah yang digunakan dalam pembuatan medium SS agar plate berdasarkan peraturan pada kemasannya adalah sebagai berikut; bubuk SSA ditimbang seberat 63 gram dan dilarutkan dalam 1 liter aquades. Larutan SSA dipanaskan sambil diaduk dalam *beaker glass* menggunakan *hot plate magnetic*

stirrer hingga homogen. Dituang dalam tabung reaksi masing-masing diisi 10 ml dan disterilkan terlebih dahulu sebelum digunakan.

3.6.4 Pembuatan Larutan Standart McFarland 0,5

Larutan McFarland 0,5 digunakan sebagai pembanding kekeruhan biakan bakteri dalam medium cair dengan kepadatan antara 1×10^7 sel/ml - 1×10^8 sel/ml (Quelab, 2005). Urutan kerja pembuatan McFarland 0,5 menurut Nurhayati (2007) adalah sebagai berikut; sebanyak 0,05 ml *Barium Clorida* (BaCl_2) 1% dalam aquades ditambahkan 9,95 ml *Asam Sulfat* (H_2SO_4) 1% kemudian disimpan di tempat yang terhindar dari cahaya matahari secara langsung.

3.6.5 Pembuatan Kultur

3.6.5.1 Pembuatan Kultur Stok

Bakteri *Salmonella typhi* yang telah diidentifikasi dibiakkan lagi pada medium SSA miring. Diinkubasi dengan suhu 37°C selama 2×24 jam. Kultur ini tahan disimpan hingga 3 bulan dalam suhu 4°C (dalam media NA) (Benson, 2001). Metode ini dapat diulang untuk peremajaan.

3.6.5.2 Pembuatan Kultur Kerja (Suspensi Bakteri *Salmonella typhi*)

Salmonella typhi dari kultur stok dibiarkan lagi pada medium cair NB (Nutrien Broth) dan disimpan dalam inkubator selama 2×24 jam pada suhu 37°C . setelah 2 hari dibiarkan, kekeruhan antara *Salmonella typhi* yang dikultur dalam medium cair dibandingkan dengan larutan standar McFarland 0,5. Berdasarkan Quelab (2005), 0,5 McFarland serta dengan $1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ sel/ml. jika *Salmonella typhi* yang dikultur pada NB lebih keruh, maka perlu ditambahkan larutan NaCl sedikit demi sedikit hingga kekeruhannya sama dengan larutan

standar Mcfarland 0,5. Jika kekeruhan keduanya sudah sama, maka tahap selanjutnya adalah melakukan tes sensitivitas (Fauziah dan larasati, 2008).

3.6.6 Pembuatan Kertas Cakram (Paper Disk)

Langkah-langkah yang dilakukan dalam pembuatan kertas cakram (Paper disk) berdasarkan Nurhayati (2007) adalah sebagai berikut; disk dibuat berukuran 6 mm dari kertas *Wattman* nomor 1 dengan pelubang kertas. Kertas cakram diletakkan di dalam cawan petri dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 atmosfer selama 15 menit.

3.6.7 Pengenceran Tepung Cacing

Konsentrasi yang digunakan sebesar 32% (w/v) TCT dalam aquades steril. Konsentrasi ini didasarkan pada penelitian Ratriyani (2000), dimana konsentrasi TCT yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* adalah 32%.

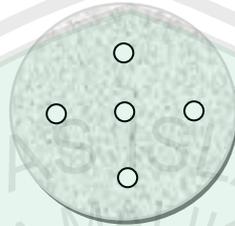
3.6.8.1 Perendaman Paper Disk

Kertas cakram direndam dalam larutan tepung cacing tanah (TCT) selama satu menit/ 60 detik.

3.6.8.2 Penanaman Bakteri *Salmonella typhi* pada Media SSA

Penanaman bakteri dilakukan berdasarkan metode spread plate dalam Benson (2001). Medium SSA yang telah dipanaskan dan dituang dalam cawan petri. Masing-masing cawan sebanyak 10 ml SSA dan ditunggu hingga memadat. Kemudian sebanyak 100 µl suspensi bakteri *Salmonella typhi* diambil dari tabung kultur menggunakan mikropipet dan ditetaskan ditengah permukaan agar yang telah padat. Susensi bakteri diratakan pada permukaan agar menggunakan spatel.

Area permukaan agar dibagi menjadi 5 area. Kertas cakram diambil menggunakan pinset steril kemudian diletakkan pada medium SSA yang telah diinokulasi *Salmonella typhi*. Semua cawan petri diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 2 × 24 jam.



Gambar 3.1 Model Peletakan *Paper disk* pada Cawan Petri

3.6.8.3 Inkubasi dalam Inkubator

Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Pengacakan dilakukan pada saat peletakan paper disk. Dimana paper disks diletakkan pada area-area dalam cawan petri secara acak tanpa adanya perlakuan yang sama dalam petri yang sama pula dan dilakukan kontrol positif dan negatif.

3.7 Pengumpulan Data

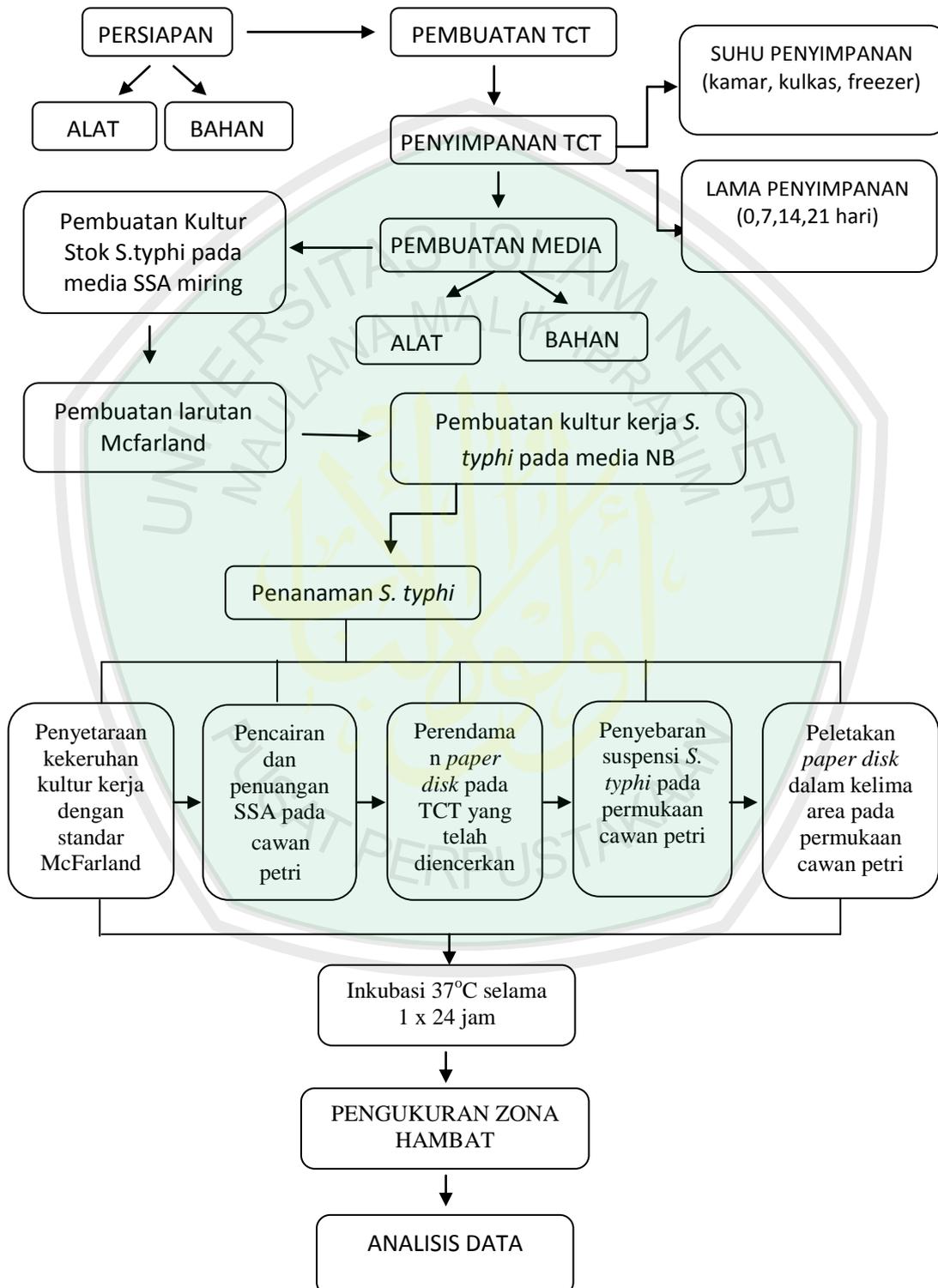
Data diperoleh dengan cara mengukur zona hambat yang terbentuk menggunakan jangka sorong.

3.8 Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh berupa ukuran zona hambat bakteri *Salmonella typhi* dianalisis dengan *One way Anova*. Apabila terjadi perbedaan yang signifikan, maka dilanjutkan dengan uji BNJ dengan taraf signifikan 0,5%.

3.9 Diagram Alir Pelaksanaan Penelitian

Langkah kerja penelitian ini dapat dilihat pada diagram alir berikut:



Gambar 3.2 Diagram Alir Pelaksanaan Penelitian