

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial atau *Completely Random Design* pola faktorial. Pada penelitian ini digunakan 2 faktor dan 6 kali ulangan. Faktor pertama adalah spesies cacing yang terdiri dari 2 taraf perlakuan. Faktor kedua adalah variasi suhu pengolahan tepung cacing yang terdiri dari 3 taraf perlakuan. Perlakuan dalam penelitian adalah hasil kombinasi antar faktor dari seluruh taraf perlakuan dengan 6 perlakuan dan 6 ulangan.

Faktor I adalah spesies cacing, diantaranya:

L = *Lumbricus rubellus*

P = *Pheretima aspergillum*

Faktor II adalah variasi suhu pengolahan tepung cacing, diantaranya:

1 = suhu pengovenan 50°C

2 = suhu pengovenan 60°C

3 = suhu pengovenan 70°C

Spesies Cacing	Suhu (°C)
<i>Lumbricus rubellus</i>	50
	60
	70
<i>Pheretima aspergillum</i>	50
	60
	70

Tabel 3.1 Kombinasi Perlakuan antara Spesies Cacing dan Variasi Suhu

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian mengenai uji *in vitro* pengaruh jenis tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus* dan *Pheretima aspergillum*) dengan variasi suhu pengolahan (50°C, 60°C, dan 70°C) terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan April sampai dengan Mei 2010.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yaitu faktor yang sengaja diubah atau dimanipulasi oleh peneliti dengan maksud untuk mengetahui perubahan apa yang terjadi (Nurhayati, 2007). Variabel bebas dalam penelitian ini ada 2 variabel yaitu variabel A dan variabel B. Variabel A adalah cacing tanah yang terbedakan atas cacing tanah spesies *Lumbricus rubellus* dan *Pheretima aspergillum*. Variabel B adalah perbedaan suhu saat pengovenan, yaitu 50°C, 60°C, dan 70°C.

3.3.2 Variabel Terikat

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

3.3.3 Variabel Kontrol / Variabel Kendali

Variabel kendali yaitu faktor yang sengaja dikendalikan supaya tidak mempengaruhi variabel bebas maupun variabel terikat (Nurhayati, 2007). Variabel kendali dalam penelitian ini adalah medium biakan, temperatur inkubasi, lama inkubasi, nilai pH, komponen pembenihan, dan air atau 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 pengovenan cacing tanah adalah suhu pada oven yang digunakan untuk mengoven cacing tanah saat pembuatan tepung cacing tanah. Suhu yang dipakai adalah 50°C, 60°C, dan 70°C.
3. Cacing yang digunakan yaitu dari spesies *Lumbricus rubellus* hasil budidaya di daerah Sidosermo Indah Surabaya dan *Pheretima aspergillum* yang didapat dari daerah Dieng Malang.
4. Zona hambat adalah suatu area yang tidak ditumbuhi bakteri sebagai daya desinfektan yang diujikan dan biasanya ditandai dengan daerah yang berwarna bening. Berpengaruh atau tidaknya bahan antimikroba 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 milimeter (Nurhayati, 2007).

5. 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.
6. Temperatur inkubasi adalah suhu yang digunakan untuk menyimpan cawan petri yang sudah diinokulasi bakteri *Salmonella typhi* dan sudah diberi perlakuan sesuai jenis tepung cacing dan suhu pengolahannya. Suhu yang digunakan adalah 37°C. Untuk mengondisikan lingkungan mencapai suhu 37°C, cawan petri disimpan dalam oven yang sebelumnya telah diatur sesuai dengan suhu yang diinginkan (Nurhayati, 2007).
7. Lama inkubasi adalah waktu yang digunakan untuk mengetahui pertumbuhan *Salmonella typhi* dengan melihat diameter zona hambatnya. Waktu yang digunakan adalah 2 x 24 jam (Salehurrahman, 2009).
8. Nilai pH adalah pH media yang sengaja dikondisikan, yaitu pada pH 6,5 – 7,5. (Nurhayati, 2007). Media SSA ber-pH 7,0 (Prescott, 2002)
9. Komponen-komponen pembenihan adalah media yang digunakan, yaitu media SSA (Salmonella-Shigella Agar) yang mengandung agar-agar, kaldu, dan kasein (Nurhayati, 2007).
10. Air, adalah kandungan air pada media dikatakan normal atau optimal apabila media berumur maksimal 48 jam setelah proses pembuatan (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*).

3.5.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: biakan murni bakteri *Salmonella typhi*, tepung cacing tanah *Lumbricus rubellus* dan *Pheretima aspergillum*, medium SSA, medium NB, BaCl₂ 1%, H₂SO₄ 1%, aquades steril, *paper disk* (kertas cakram dibuat dari kertas *Wattman* nomor 1), aquades steril, alkohol 70%, NaCl fisiologis, disk chloramphenicol, disk seftriakson, spiritus.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pembuatan Tepung Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus* dan *Pheretima aspergillum*)

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 yang dimaksud yaitu *Lumbricus rubellus* dan *Pheretima aspergillum*. Cacing tanah dibersihkan dari tanah dan kotoran lainnya yang menempel, kemudian

dicuci dengan air mengalir. Sebagian cacing tanah dioven dalam suhu 50°C, 60°C, dan 70°C selama 6 jam. Cacing tanah dihaluskan dengan cara ditumbuk hingga menjadi tepung cacing tanah kemudian diayak.

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 160°C selama 1-2 jam.

b. Sterilisasi Basah

Sterilisasi dilakukan menggunakan autoklaf. Peralatan yang disterilkan dengan sterilisasi basah diantaranya sterilisasi medium, dan cawan petri. Proses sterilisasi ini dilakukan pada suhu 121°C dengan tekanan 15 atmosfer selama 15 menit.

3.6.3 Pembuatan Media

3.6.3.1 Pembuatan Media NB (*Nutrien Broth*)

Media NB dibuat 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 dilakukan 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 larutan McFarland 0,5 menurut Nurhayati (2007) adalah sebagai berikut. Sebanyak 0,05 ml *Barium Clorida* (BaCl_2) 1% dalam akuades ditambahkan 9,95 ml *Asam Sulfat* (H_2SO_4) 1%. Kemudian disimpan di tempat yang terhindar dari cahaya matahari 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 x 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 dibiakkan lagi pada medium cair NB (*Nutrien Broth*) dan disimpan dalam inkubator selama 2 x 24 jam pada suhu 37°C. Setelah 2 hari dibiakkan, kekeruhan antara *Salmonella typhi* yang dikultur dalam medium cair dibandingkan dengan larutan standar McFarland 0,5. Berdasarkan Quelab (2005), 0,5 Mc Farland setara 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 (Fauzia 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 *autoclaf* 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 Uji Kepekaan Antibiotik

Tujuan dilakukannya uji kepekaan bakteri terhadap obat-obatan secara in vitro yaitu untuk mengetahui obat antimikroba yang dapat digunakan untuk mengatasi infeksi oleh mikroba. Uji kepekaan obat antimikroba dilakukan dengan metode difusi cakram, dengan meletakkan suatu cakram kertas yang telah diisi zat antimikroba dengan konsentrasi tertentu pada lempeng agar yang telah ditanami bakteri yang hendak diteliti. Kemudian diinkubasi selama 2 x 24 jam lalu diukur diameter zona hambat di sekitar cakram (jarak area jernih) serta perlakuan kontrol dibandingkan dengan tabel standart yang dibuat oleh NCCLS (*National Committee for Laboratory Standard*) (Nurhayati, 2007; Benson, 2001), sehingga dapat diketahui kriteria sensitif (S), intermediet (I), dan resisten (R). Diameter di sekeliling cakram yang menunjukkan kepekaan suatu mikroorganisme dapat dilihat pada tabel berikut:

Antibiotika	Kekuatan cakram	Diameter Zona Hambat (mm)		
		Resisten	Intermediet	Sensitif
Chloramphenicol	30 µg	≤ 12	13-17	≥ 18
Sefriakson	10 µg	≤ 14	15-17	≥ 18

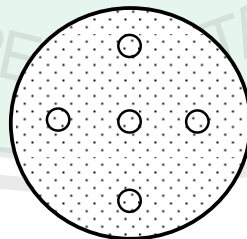
Tabel 3.2 Standar Sensitifitas Bakteri yang Dibuat oleh NCCLS (*National Committee for Laboratory Standard*) (Nurhayati, 2007; Benson, 2001)

3.6.8.1 Perendaman *Paper Disk*

Kertas cakram direndam dalam larutan tepung cacing tanah (TCT) selama 30 menit.

3.6.8.2 Penanaman Bakteri *Salmonella typhi* pada Media SSA

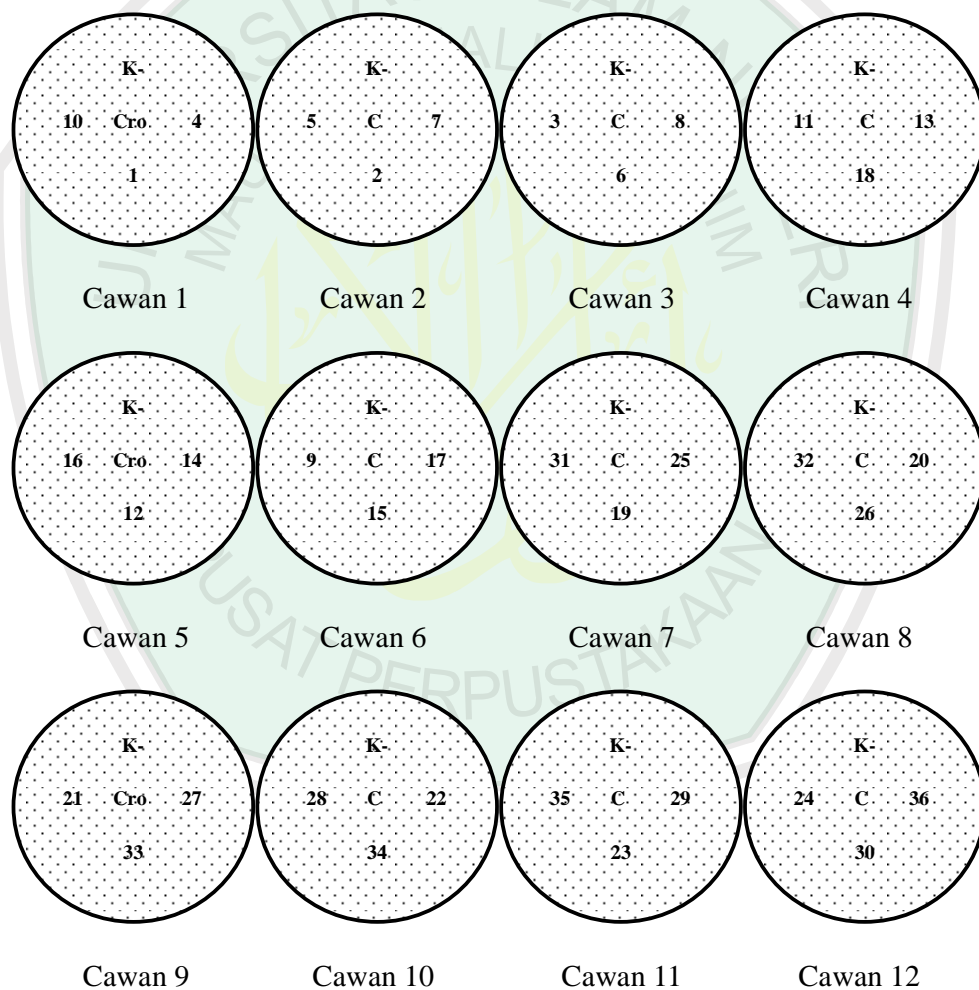
Penanaman bakteri dilakukan berdasarkan metode *spread plate* dalam Benson (2001). Medium SSA yang telah disterilkan, dipanaskan dan dituang dalam cawan petri. Masing-masing cawan sebanyak 10 ml SSA dan ditunggu hingga memadat. Kemudian sebanyak 100 μ l suspensi bakteri *Salmonella typhi* diambil dari tabung kultur menggunakan *micropipet* dan diteteskan di tengah permukaan agar yang telah padat. Suspensi 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 x 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 disk* diletakkan pada area-area dalam cawan petri secara acak tanpa adanya perlakuan yang sama dalam petri yang sama pula.



Gambar 3.2 Model Pengacakan *Paper Disk* pada Cawan Petri

Keterangan:

- L1 (nomor 1-6) : SS agar yang diinokulasi bakteri *Salmonella typhi* dan diberi TCT *L. rubellus* yang dibuat dengan suhu 50°C.
- L2 (nomor 7-12) : SS agar yang diinokulasi bakteri *Salmonella typhi* dan diberi TCT *L. rubellus* yang dibuat dengan suhu 60°C.
- L3 (nomor 13-18) : SS agar yang diinokulasi bakteri *Salmonella typhi* dan diberi TCT *L. rubellus* yang dibuat dengan suhu 70°C.
- P1 (nomor 19-24) : SS agar yang diinokulasi bakteri *Salmonella typhi* dan diberi TCT *P. aspergillum* yang dibuat dengan suhu 50°C.
- P2 (nomor 25-30) : SS agar yang diinokulasi bakteri *Salmonella typhi* dan diberi TCT *P. aspergillum* yang dibuat dengan suhu 60°C.
- P3 (nomor 31-36) : SS agar yang diinokulasi bakteri *Salmonella typhi* dan diberi TCT *P. aspergillum* yang dibuat dengan suhu 70°C.
- K+1 (Cro) : SS agar yang diinokulasi bakteri *Salmonella typhi* dan diberi antibiotik jenis chloramphenicol 30 µg (dalam bentuk *disk*).
- K+2 (C) : SS agar yang diinokulasi bakteri *Salmonella typhi* dan diberi antibiotik jenis seftriakson 10 µg (dalam bentuk *disk*).
- K- : SS agar yang diinokulasi bakteri *Salmonella typhi* dan diberi kontrol negatif berupa aquades steril dalam *paper disk*.

3.7 Pengumpulan Data

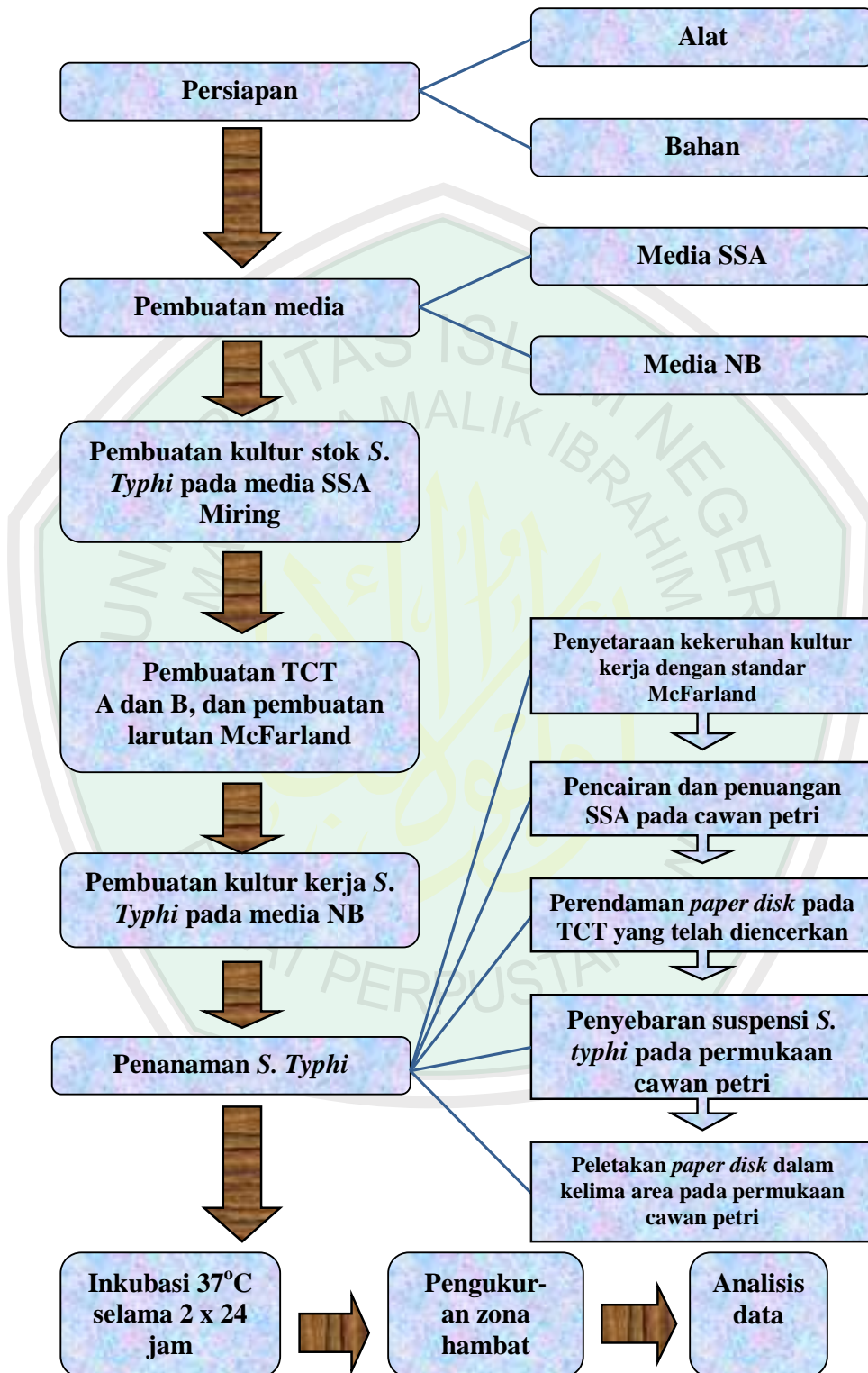
Data diperoleh dengan cara mengukur zona hambat yang terbentuk menggunakan jangka sorong.

3.8 Teknik Analisis Data

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

3.9 Diagram Alir Pelaksanaan Penelitian

Langkah kerja penelitian ini dapat dilihat pada diagram alir berikut:



Gambar 3.3 Diagram Alir Pelaksanaan Penelitian