

BAB IV

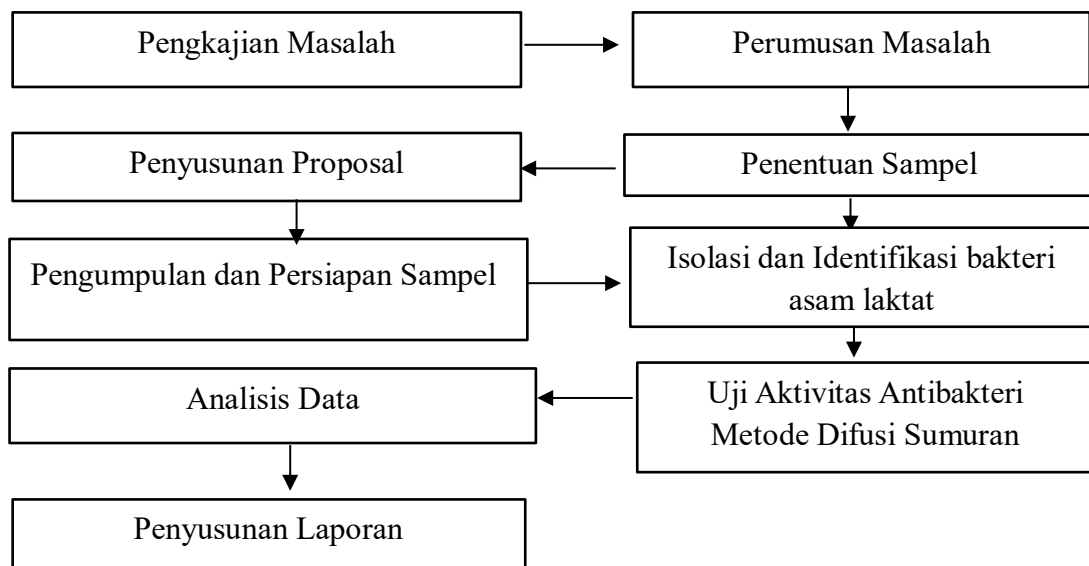
METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah deskriptif analitik. Penelitian deskriptif analitik merupakan jenis penelitian yang digunakan untuk mendeskripsikan atau memberi gambaran terhadap objek penelitian melalui data atau sampel yang telah terkumpul yang kemudian dilanjutkan dengan analisis (Sugiyono, 2023). Dalam penelitian ini akan dilakukan isolasi, identifikasi, dan uji aktivitas antibakteri bakteri asam laktat dari sampel limbah cair tahu yang diperoleh dari pabrik pembuatan tahu di daerah Kecamatan Klungkung, Kabupaten Klungkung.

B. Alur Penelitian

Alur penelitian ini disajikan dalam gambar berikut :



Gambar 5. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Pengambilan sampel dilakukan di Pabrik Tahu di Kecamatan Klungkung, Kabupaten Klungkung. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober 2024 hingga bulan April 2025.

D. Unit Analisis

Unit analisis dalam penelitian ini yaitu hasil isolasi dan hasil identifikasi serta kategori zona hambat yang ditimbulkan oleh isolat bakteri asam laktat dari limbah cair tahu terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Isolasi, identifikasi, dan uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan memilih limbah cair tahu menggunakan teknik *purposive sampling* yaitu teknik pemilihan sampel berdasarkan kriteria inklusi yaitu limbah cair sisa penggumpalan tahu dan berwarna putih kekuningan serta tampak keruh, sedangkan kriteria eksklusi yaitu sampel yang mengalami perubahan segi warna dan tekstur dari awal pengambilan. Proses isolasi akan menghasilkan koloni bakteri asam laktat yang kemudian diidentifikasi melalui uji katalase, uji tipe fermentasi, dan pewarnaan Gram. Isolat yang telah teridentifikasi bakteri asam laktat akan dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dengan metode sumuran. Kontrol positif menggunakan antibiotik gentamisin dan kontrol negatif menggunakan media MRSB steril. Pengukuran diameter zona hambat dilakukan dalam satuan

milimeter (mm) dengan menggunakan jangka sorong kemudian dikategorikan kekuatan daya antibakterinya sesuai penggolongan (Nurhamidin, Fatimawali dan Antasionasti, 2021).

Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini sebesar 20 sampel limbah cair tahu pada 4 pabrik yang diambil secara berulang sebanyak lima kali yang dapat ditentukan sebagai berikut :

$$\text{Jumlah Sampel Total (n)} = \text{Jumlah lokasi} \times \text{Jumlah sampel per Lokasi}$$

$$n = 4 \times 5 = 20 \text{ sampel}$$

Pada percobaan laboratorium, syarat minimal dari jumlah pengulangan yaitu tiga kali pengulangan (Hanafiah, 2016). Metode pengambilan sampel ini disesuaikan dengan desain penelitian deskriptif analitik, yang bertujuan untuk mengamati dan mendeskripsikan karakteristik sampel tanpa memberikan perlakuan terhadap variabel yang diteliti.

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari: wadah sampel steril, neraca analitik, spatula, Erlenmeyer 250 ml, gelas ukur 500 ml, hotplate stirrer, autoklaf, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas ukur 500 ml, cawan petri, pipet ukur, ball pipet, pipet tetes, *Biosafety Cabinet*, oven, *anaerobic jar*, ose bulat, api bunsen, kaca objek, rak pengecatan, tabung durham, vortex, McFarland densitometer, standar McFarland, mikropipet dan tip, inkubator, mikroskop binokuler, jangka sorong, dan alat tulis.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi : sampel limbah cair tahu, *De Man Rogosa and Sharpe* (MRS) *Broth*, *De Man Rogosa and Sharpe*

(MRS) *Agar*, akuades, isolat *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Mueller Hinton Agar* (MHA), pewarnaan Gram, minyak emersi, larutan hidrogen peroksida (H_2O_2), alkohol 70%, NaCl fisiologis steril, aluminium foil, antibiotik gentamisin, kapas berlemak, kertas label.

3. Prosedur penelitian

a. Pengambilan sampel

- 1) Siapkan wadah steril yang digunakan untuk pengambilan sampel.
- 2) Sampel limbah tahu diambil dan dimasukkan ke dalam wadah sampel steril secara aseptis.
- 3) Wadah sampel dipastikan tertutup rapat dan ditempatkan pada *coolbox* kemudian dibawa ke laboratorium untuk diuji lebih lanjut.

b. Pembuatan media

Pembuatan media dalam penelitian ini diadaptasi dari prosedur kerja yang telah dilakukan oleh Mansur dan Hidayat (2019). Prosedur tersebut kemudian dimodifikasi dan disesuaikan dengan penelitian ini. Prosedur kerja dari pembuatan media dijelaskan sebagai berikut (Mansur dan Hidayat, 2019) :

1) Media MRSB

- a) Siapkan alat neraca analitik, aluminium foil, kapas berlemak, kertas buram, hotplate stirrer, Erlenmeyer, tabung, dan media MRS Broth.
- b) Melakukan perhitungan penimbangan media sesuai dengan etiket pada wadah media. Pada etiket tertera 52,2 gram per 1000 mL, sehingga untuk membuat 500 mL media menggunakan 26,1 gram bubuk media MRSB.
- c) Menimbang bubuk media MRSB sebanyak 26,1 gram dengan menggunakan neraca analitik, kemudian dipindahkan ke Erlenmeyer.

- d) Bubuk media pada Erlenmeyer dilarutkan dengan 500 mL akuades.
- e) Media dipanaskan pada hot plate dan diaduk hingga homogen.
- f) Tutup erlenmeyer menggunakan kapas berlemak serta lapisan aluminum foil.
- g) Media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit terhitung dari suhu tersebut tercapai.
- h) Media yang telah melalui proses sterilisasi selanjutnya didinginkan sampai suhu media turun menjadi $\pm 40 - 50^{\circ}\text{C}$. Media dibagi rata ke dalam 55 tabung steril dengan volume 9 ml per tabung.

2) Media MRSA

- a) Siapkan alat neraca analitik, aluminium foil, kapas berlemak, kertas buram, hotplate stirrer, Erlenmeyer, cawan petri, dan media MRSA.
- b) Melakukan perhitungan penimbangan media sesuai dengan etiket pada wadah media. Pada etiket tertera 68,2 gram per 1000 mL, sehingga untuk membuat 500 mL media menggunakan 34,1 gram bubuk media MRSA.
- c) Menimbang bubuk media MRSA sebanyak 34,1 gram dengan menggunakan neraca analitik, kemudian dipindahkan ke Erlenmeyer.
- d) Bubuk media pada Erlenmeyer dilarutkan dengan 500 mL akuades.
- e) Media dipanaskan pada hot plate dan diaduk hingga homogen.
- f) Tutup erlenmeyer menggunakan kapas berlemak serta lapisan aluminum foil.
- g) Media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit terhitung dari suhu tersebut tercapai.
- h) Media yang telah melalui proses sterilisasi selanjutnya didinginkan sampai suhu media turun menjadi $\pm 40 - 50^{\circ}\text{C}$.

- i) Tuangkan media yang telah disterilisasi ke dalam cawan petri dengan volume ± 25 ml secara aseptik, kemudian diamkan hingga memadat.
- j) Media yang telah memadat pada cawan petri diletakkan dengan posisi terbalik. Jika media tidak segera digunakan, media pada cawan petri dapat dibungkus dengan kertas kemudian disimpan dalam refrigerator pada suhu $2-8^{\circ}\text{C}$.

3) Media MHA

- a) Siapkan alat neraca analitik, aluminium foil, kapas berlemak, kertas buram, hotplate stirrer, Erlenmeyer, cawan petri, dan media MHA.
- b) Melakukan perhitungan penimbangan media sesuai dengan etiket pada wadah media. Pada etiket tertera 38 gram per 1000 mL, sehingga untuk membuat 500 mL media menggunakan 19 gram bubuk media MHA.
- c) Menimbang bubuk media MHA sebanyak 19 gram dengan menggunakan neraca analitik, kemudian dipindahkan ke Erlenmeyer.
- d) Bubuk media pada Erlenmeyer dilarutkan dengan 500 mL akuades.
- e) Media dipanaskan pada hot plate dan diaduk hingga homogen.
- f) Tutup erlenmeyer menggunakan kapas berlemak serta lapisan aluminium foil.
- g) Media disterilkan dengan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit terhitung dari suhu tersebut tercapai.
- h) Media yang telah melalui proses sterilisasi selanjutnya didinginkan sampai suhu media turun menjadi $\pm 40 - 50^{\circ}\text{C}$.
- i) Tuangkan media yang telah disterilisasi ke dalam cawan petri dengan volume ± 25 ml secara aseptik, kemudian diamkan hingga memadat

- j) Media yang telah memadat pada cawan petri diletakkan dengan posisi terbalik. Jika media tidak segera digunakan, media pada cawan petri dapat dibungkus dengan kertas dan disimpan dalam refrigerator dengan suhu 2-8°C.

c. Isolasi bakteri asam laktat

Prosedur isolasi bakteri asam laktat pada penelitian ini diadaptasi dari prosedur kerja yang diterapkan sebelumnya oleh Dwijastuti (2023) kemudian dimodifikasi dan disesuaikan dengan penelitian ini. Adapun prosedur dari isolasi bakteri asam laktat pada penelitian ini, yaitu : (Dwijastuti, 2023)

- 1) Sebanyak 1 mL sampel limbah cair tahu dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 9 mL MRSB, kemudian diinkubasi secara anaerob pada suhu 37°C selama 48 jam.
- 2) Kultur hasil pengayaan sebanyak 1 mL diambil kemudian ditambahkan ke dalam tabung yang berisi 9 mL NaCl 0,9% dan dihomogenkan. Kemudian dibuat serial pengenceran dari 10^{-1} hingga 10^{-5} .
- 3) Diambil 0,1 ml larutan dari pengenceran terakhir kemudian diinokulasikan pada media MRSA dengan metode *streak plate*.
- 4) Inkubasi cawan petri dalam kondisi anaerob pada suhu 37°C dengan waktu 48 jam.
- 5) Koloni bakteri asam laktat yang tumbuh kemudian ditanam kembali dengan teknik *streak plate* ke media MRSA untuk memperoleh koloni murni, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- 6) Koloni yang tumbuh selanjutnya diidentifikasi dengan uji katalase, uji pewarnaan Gram, dan uji tipe fermentasi.

d. Uji Katalase

Pengujian katalase pada penelitian ini diadaptasi dari prosedur kerja yang telah dilakukan oleh Dwijastuti (2023). Pengujian katalase dilakukan sebagai berikut : (Dwijastuti, 2023)

- 1) Prosedur dimulai dengan membersihkan kaca objek dengan alkohol 70%.
- 2) Ambil satu ose koloni dari media MRSA kemudian diletakkan pada kaca objek yang sudah disterilkan.
- 3) Isolat yang sudah diletakkan di kaca objek diberi 2 tetes larutan hidrogen peroksida (H_2O_2) 3%.
- 4) Ditunggu beberapa saat, kemudian diamati terbentuknya gelembung pada preparat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung, sementara hasil negatif jika tidak ada gelembung yang terbentuk.
- 5) Ciri-ciri dari bakteri asam laktat menunjukkan hasil negatif pada uji katalase.

e. Uji tipe fermentasi

Pengujian tipe fermentasi pada penelitian ini diadaptasi dari prosedur kerja yang telah dilakukan oleh Medaando, Rahmawati, dan Turnip (2024). Pengujian tipe fermentasi dilakukan sebagai berikut : (Medaando, Rahmawati dan Turnip, 2024)

- 1) Isolat bakteri asam laktat diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml media MRSB dan tabung durham.
- 2) Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- 3) Diamati terbentuknya gas pada tabung durham, bakteri yang menampung gas pada tabung durham merupakan heterofermentatif, sedangkan yang tidak menampung gas dinyatakan homofermentatif.

f. Pewarnaan Gram

Prosedur pewarnaan Gram diadaptasi dari prosedur kerja yang telah dilakukan Dwijastuti (2023) kemudian dimodifikasi dan disesuaikan dengan penelitian ini. Pada uji ini, bakteri asam laktat dengan hasil uji katalase negatif akan dilanjutkan dengan pewarnaan Gram. Adapun prosedur pewarnaan Gram, sebagai berikut : (Dwijastuti, 2023)

- 1) Kaca objek dibersihkan dengan alkohol 70%, selanjutnya disterilisasikan dengan cara dilewatkan di atas api Bunsen beberapa kali.
- 2) Teteskan NaCl 0,9% secukupnya pada kaca objek.
- 3) Isolat bakteri diambil dari media MRSA menggunakan diletakkan pada kaca objek dan dibuat hapusan.
- 4) Hapusan pada kaca objek difiksasi kembali pada api bunsen kemudian diletakkan pada rak pengecatan dengan bagian hapusan menghadap ke atas.
- 5) Kristal violet ditetaskan pada bagian hapusan hingga seluruh permukaan hapusan tergenang, kemudian didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas menggunakan akuades.
- 6) Lugol ditetaskan pada bagian hapusan hingga seluruh permukaan hapusan tergenang, kemudian didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas menggunakan akuades.
- 7) Alkohol 95% ditetaskan pada bagian hapusan hingga seluruh permukaan hapusan tergenang, kemudian didiamkan selama 30 detik, lalu dibilas menggunakan akuades.

- 8) Safranin ditetaskan pada bagian hapusan hingga seluruh permukaan tergenang, kemudian didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas menggunakan akuades.
- 9) Preparat dikeringkan dengan cara diangin-anginkan.
- 10) Preparat diberi minyak imersi kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100×. Jika sel bakteri terlihat berwarna ungu maka hasil dinyatakan positif, namun jika sel bakteri terlihat berwarna merah maka hasil dinyatakan negatif. Ciri-ciri dari bakteri asam laktat menunjukkan hasil positif.

g. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

Prosedur pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* diadaptasi dari prosedur kerja yang telah dilakukan oleh Tetik (2023) kemudian dimodifikasi dan disesuaikan dengan penelitian ini. Adapun prosedur pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu : (Tetik dkk., 2023)

- 1) Ambil satu ose koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dari biakan murni kemudian diremajakan kembali menggunakan media *Nutrient Agar*.
- 2) Inkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C untuk mendapatkan umur koloni 1×24 jam. Hal ini dilakukan agar bakteri yang diujikan mampu tumbuh secara optimal.
- 3) Mengambil beberapa ose koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yang berumur 1×24 jam, kemudian disuspensikan ke pada tabung steril dengan NaCl 0,9% sebanyak 5 ml dan diulangi hingga mendapatkan konsentrasi 0,5 McFarland.
- 4) Kekeruhan suspensi bakteri dibaca pada McFarland densitometer sehingga mendapatkan kekeruhan 0,5 McFarland.

h. Uji aktivitas antibakteri

Proses pengujian aktivitas antibakteri melalui metode difusi sumuran diadaptasi dari prosedur kerja yang telah dilakukan oleh Rasyid (2021) dan Nurhayati (2020) kemudian dimodifikasi dan disesuaikan dengan penelitian ini. Adapun prosedur uji aktivitas antibakteri, yaitu sebagai berikut : (Rasyid dkk., 2021); (Nurhayati, Yahdiyani dan Hidayatulloh, 2020)

- 1) Ambil 2-3 ose kultur bakteri asam laktat kemudian dikultur pada media MRSB selama 24 jam.
- 2) Disiapkan swab kapas steril dan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*.
- 3) Swab kapas steril dicelupkan kedalam suspensi *Staphylococcus aureus* kemudian digoreskan secara merata pada permukaan media MHA. Ditunggu selama 5-15 menit agar suspensi bakteri patogen meresap ke dalam media.
- 4) Pembuatan sumuran dilakukan menggunakan alat pembuat sumuran dengan diameter yang sebanding dengan diameter cakram pada media MHA.
- 5) Tambahkan 40 µl isolat bakteri asam laktat yang telah dikultur pada media MRSB selama 24 jam pada masing-masing sumuran.
- 6) Inkubasi pada suhu 37 °C dengan waktu 24 jam.
- 7) Zona hambat yang terbentuk diamati kemudian diukur menggunakan jangka sorong.
- 8) Antibiotik gentamisin digunakan sebagai kontrol positif dan media MRSB steril digunakan sebagai kontrol negatif.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Pada penelitian ini menggunakan dua jenis data yaitu data primer dan data sekunder.

a. Data primer

Data primer pada penelitian ini diperoleh melalui uji laboratorium yang meliputi isolasi bakteri asam laktat, uji katalase, uji tipe fermentasi, uji pewarnaan Gram, dan uji aktivitas antibakteri isolat bakteri asam laktat.

b. Data sekunder

Data sekunder pada penelitian ini diperoleh dari sejumlah referensi yang berkaitan dengan penelitian ini.

2. Cara pengumpulan data

Pengumpulan data dalam penelitian ini dilakukan melalui observasi dan penelitian laboratorium dengan metode difusi sumuran.

3. Instrumen pengumpulan data

Instrumen yang digunakan dalam pengumpulan data pada penelitian ini, yaitu :

- a. Alat pelindung diri (APD)
- b. Alat tulis
- c. Alat dokumentasi (kamera)
- d. Alat pengambilan dan pemeriksaan sampel

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

Data identifikasi bakteri asam laktat dan diameter zona hambat diperoleh dari pengujian aktivitas antibakteri isolat bakteri asam laktat dari limbah cair tahu terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Hasil pengukuran diameter zona hambat dinyatakan dalam satuan mm (milimeter) dan diolah menggunakan teknik pengolahan data secara tabulating data yaitu penyajian data dalam bentuk tabel naratif.

2. Analisis data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis deskriptif yang memiliki tujuan untuk menjelaskan karakteristik dari setiap variabel penelitian. Data zona hambat diolah menggunakan perangkat lunak *Microsoft Excel* dengan hasil berupa nilai rata-rata dan standar deviasi diameter zona hambat yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat terhadap *Staphylococcus aureus*.

G. Etika Penelitian

Kode etik berfungsi sebagai panduan untuk mengembangkan dan menyampaikan berbagai prinsip yang harus diterapkan oleh lembaga penelitian atau profesional. Penelitian ini menerapkan prinsip *beneficence* yang merupakan prinsip kebaikan dengan tujuan memberikan manfaat dan mengurangi kerugian serta prinsip *non-maleficence* yaitu prinsip untuk tidak merugikan dan melindungi subjek penelitian dari tindakan penyalahgunaan (Masturoh dan Nauri, 2018).