

## **BAB IV METODE PENELITIAN**

### **A. Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan adalah deskriptif yakni suatu penelitian yang dilakukan untuk menggambarkan keadaan objek berdasarkan fakta-fakta sebagaimana adanya (Nasir, Muhith, dan Ideputri, 2011). Dalam penelitian ini dilakukan dengan pendekatan *cross sectional* yang artinya identifikasi bakteri asam laktat pada blondo VCO dilakukan dengan cara pendekatan, observasi atau pengumpulan data sekaligus pada waktu yang bersamaan (Notoadmojo, 2012).

### **B. Tempat dan Waktu Penelitian**

#### **1. Tempat penelitian**

Pengambilan sampel dilakukan di kelompok wanita tani, Desa Tengkadang, Kecamatan Penebel, Kabupaten Tabanan. Pemeriksaan laboratorium dilakukan di Laboratorium Bakteriologi, Jurusan Analis Kesehatan, Politeknik Kesehatan Denpasar.

#### **2. Waktu penelitian**

Penelitian ini dilakukan mulai dari bulan Maret sampai Juni 2018.

### **C. Populasi dan Sampel Penelitian**

#### **1. Populasi penelitian**

Populasi merupakan keseluruhan objek yang akan diteliti Sugiyono (2017). Pada penelitian ini yang menjadi populasi adalah blondo dari proses pembuatan VCO.

## **2. Unit Analisis**

Sampel pada penelitian ini adalah blondo yang dihasilkan oleh kelompok wanita tani, Desa Tengkidak, Kecamatan Penebel, Kabupaten Tabanan. Sampel blondo yang diambil memiliki ciri-ciri berwarna putih, berbentuk suspensi, berasal dari proses pembuatan VCO, serta berada pada bagian atas serta diantara lapisan VCO dan air setelah didiamkan selama 24 jam.

## **3. Teknik pengambilan sampel**

Dalam penelitian ini, teknik pengambilan sampel menggunakan *probability sampling* secara *simple random sampling* yaitu pengambilan sampel dilakukan secara acak pada kelompok wanita tani, Desa Tengkidak, Kecamatan Penebel, Kabupaten Tabanan yang aktif membuat VCO selama penelitian berlangsung.

## **D. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data**

### **1. Jenis data yang dikumpulkan**

Jenis data yang dikumpulkan adalah data primer meliputi data mengenai hasil pemeriksaan laboratorium bakteri asam laktat yang diisolasi dari blondo VCO dan aktivitas antimikroba yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat.

### **2. Teknik pengumpulan data**

Pengumpulan data dilakukan dengan cara pemeriksaan laboratorium melalui teknik kultur serta zona hambat yang terbentuk dari aktivitas antimikroba bakteri asam laktat yang diisolasi pada blondo VCO terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus*.

### **3. Instrumen pengumpulan data**

Instrumen yang digunakan dalam pengumpulan data diantaranya:

- a. Kamera untuk dokumentasi
- b. Alat tulis
- c. Alat untuk pemeriksaan laboratorium

### **E. Alat dan Bahan**

#### **1. Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya tempat sampel steril (7 buah), spatula (7 buah), kaca arloji (2 buah), neraca analitik (Radwag) (1 buah), gelas kimia (Duran) 500 mL (3 buah), gelas ukur (Iwaki-Pyrex®) 500 mL (1 buah), Erlenmeyer (Iwaki-Pyrex®) 250 mL (5 buah), *hotplate stirrer* (Jisico) (1 buah), autoklaf (TOMY SX-500) (1 buah), *petridish* steril (10 buah), tabung reaksi steril (10 buah), pipet ukur steril (Iwaki-Pyrex®) 10 mL (1 buah), oven (Wegtec) (1 buah), rak tabung reaksi (1 buah), *Biosafety Cabinet* (Biobase), Mc Farland densitometer (Biosan) (1 buah), standar Mc Farland (Prolab) (1 set), ose bulat (1 buah), mikropipet (Socorex) 2-20 µl dan 100-1000 µl (1 buah), pinset (1 buah), api bunsen (1 buah), inkubator (Esco) (1 buah), *ball pipet* (d & n ball pipet) (1 buah), mikroskop binokuler (Olympus) (1 buah), kaca objek (1 kotak), alat pembuat sumuran (1 buah), jangka sorong (1 buah), rak pengecatan (1 buah), dan tabung durham (10 buah).

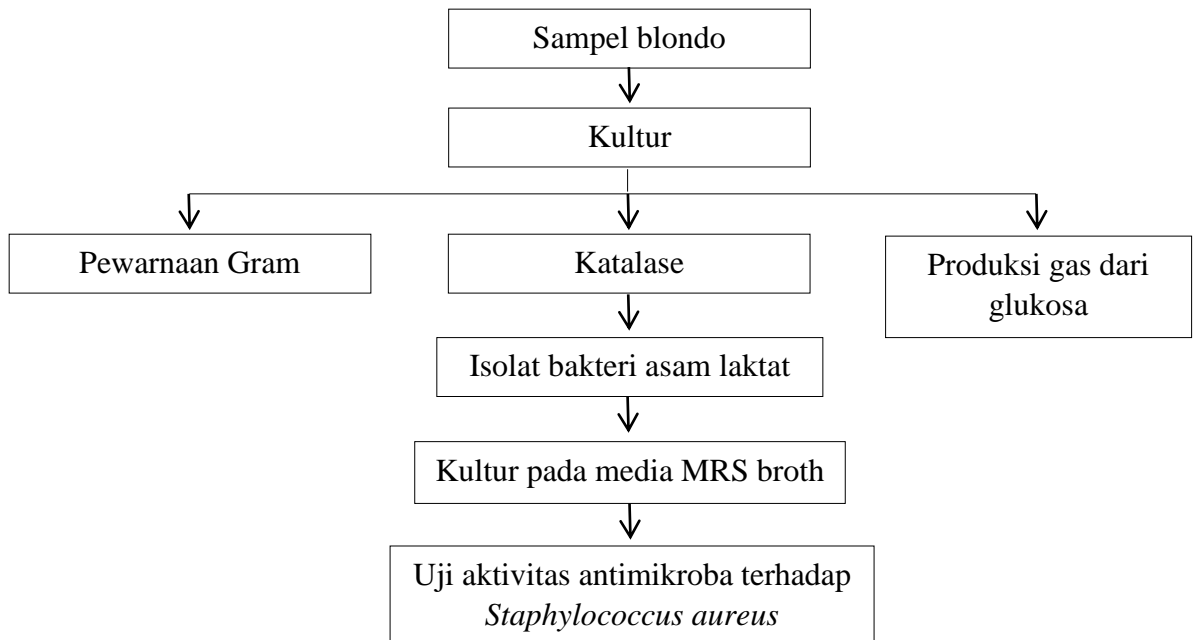
#### **2. Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya blondo, media MHA (Oxoid), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *MRS (De Man Rogosa and*

*Sharpe*) Agar (Oxoid), *MRS (De Man Rogosa and Sharpe) Broth* (Oxoid), pewarna Gram, minyak emersi, larutan hidrogen peroksida, alkohol 70%, NaCl fisiologis steril, *paper disk* kosong, *paper disk* antibiotik amoksisilin, aquades steril, swab kapas steril, aluminium foil, kapas berlemak, *blue tip*, *yellow tip*, kertas label, dan kertas buram.

## F. Kerangka Kerja dan Prosedur Kerja

### 1. Kerangka kerja



Gambar 3. Kerangka Kerja

### 2. Prosedur kerja

#### a. Pengambilan sampel

- 1) Dipersiapkan alat steril yang digunakan dalam pengambilan sampel
- 2) Diambil sampel blondo bagian atas serta bagian antara minyak dan air menggunakan spatula dan dimasukkan ke dalam wadah sampel steril
- 3) Dipastikan wadah sampel tertutup erat dan dimasukkan ke dalam *box* dengan suhu ruang

- 4) Sampel dapat dikirim ke laboratorium untuk diperiksa lebih lanjut
- b. Pembuatan NaCl 0,85% steril
- 1) Disiapkan alat dan bahan yang digunakan
  - 2) Ditimbang NaCl 0,85 gram dilarutkan dengan akuades sampai 100 mL
  - 3) Dihomogenkan dan ditutup dengan kapas berlemak, aluminium foil dan kertas buram
  - 4) Disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit
- c. Pembuatan MRS agar
- 1) Disiapkan alat dan bahan yang digunakan
  - 2) Ditimbang media MRS Agar 6,2 gram dilarutkan dalam 100 mL akuades
  - 3) Dihomogenkan dengan *hotplate stirrer*
  - 4) Ditutup dengan kapas berlemak, aluminium foil dan kertas buram
  - 5) Disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit
  - 6) Dituang 15 mL pada *petridish* yang telah disterilkan dengan oven pada suhu 160°C selama 1 jam, ditunggu sampai memadat, dibungkus dengan kertas buram dan disimpan pada lemari pendingin dengan suhu 4°C
- d. Pembuatan MRS broth
- 1) Disiapkan alat dan bahan yang digunakan
  - 2) Ditimbang media MRS broth 5,2 gram dilarutkan dalam 100 mL akuades
  - 3) Dihomogenkan dengan *hotplate stirrer*
  - 4) Dituang sebanyak 10 mL ke dalam tabung reaksi
  - 5) Ditutup dengan kapas berlemak, aluminium foil dan kertas buram
  - 6) Disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit

e. Pembuatan MHA

- 1) Disiapkan alat dan bahan yang digunakan
- 2) Ditimbang media MHA 3,8 gram dilarutkan dalam 100 mL akuades
- 3) Dihomogenkan dengan *hotplate stirrer*
- 4) Ditutup dengan kapas berlemak, aluminium foil dan kertas buram
- 5) Disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit
- 6) Dituang 15 mL pada *petridish* yang telah disterilkan dengan oven pada suhu 160°C selama 1 jam, ditunggu sampai memadat, dibungkus dengan kertas buram dan disimpan pada lemari pendingin dengan suhu 4°C

f. Isolasi bakteri asam laktat

- 1) Sampel blondo diencerkan dengan cara memipet 1 mL sampel dan dihomogenkan dengan menambahkan 9 mL garam fisiologis (NaCl 0,85% steril)
- 2) Hasil pengenceran kemudian diinokulasi di MRS agar dengan menggunakan metode streak plate empat kuadran yang kemudian diinkubasi 37°C selama 48 jam
- 3) Koloni bakteri yang tumbuh selanjutnya diidentifikasi (Ibrahim, Fridayanti, dan Delvia, 2015)

g. Pewarnaan Gram

- 1) Kaca objek dibersihkan dengan menggunakan alkohol 70% dan dilewatkan beberapa kali di atas api bunsen
- 2) Ditetaskan secukupnya NaCl 0,85% pada kaca objek
- 3) Diambil isolat bakteri dengan ose secara aseptik dan dibuat hapusan dengan cara dioleskan pada kaca objek yang telah berisi NaCl 0,85%

- 4) Kaca objek yang telah dibuat hapusan difiksasi kembali pada api bunsen
  - 5) Hapusan yang telah jadi diletakkan pada rak pengecatan dengan bagian hapusan menghadap ke atas
  - 6) Diteteskan kristal violet pada hapusan sampai seluruh bagian hapusan tergenang
  - 7) Dibiarkan selama 1 menit, selanjutnya dicuci dengan air mengalir
  - 8) Diteteskan dengan larutan iodine sampai seluruh bagian hapusan tergenang dan dibiarkan selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir
  - 9) Selanjutnya isolat bakteri ditetesi alkohol 96% selama 30 detik, kemudian dibilas dengan air mengalir
  - 10) Diteteskan safranin selama 45 detik dan dicuci dengan air mengalir
  - 11) Preparat dikeringkan dengan cara diangin-anginkan kemudian preparat diamati di bawah mikroskop (Vandepitte, dkk., 2011)
- h. Uji katalase
- 1) Kaca objek dibersihkan menggunakan alkohol 70%
  - 2) Diteteskan larutan hidrogen peroksida pada kaca objek
  - 3) Diambil koloni tunggal menggunakan ose secara aseptis dan dicampurkan koloni dengan hidrogen peroksida pada kaca objek
  - 4) Diamati terbentuknya gelembung gas pada preparat (Aritonang et al, 2017).
- i. Produksi gas dari glukosa
- 1) Diambil koloni tunggal pada MRS agar dengan menggunakan ose secara aseptik dan dimasukkan ke dalam MRS broth yang telah berisi tabung durham
  - 2) Diinkubasi 37°C selama 24 jam
  - 3) Diamati terbentuknya gas pada tabung durham (Aritonang et al, 2017).

Koloni bakteri yang telah teridentifikasi sebagai bakteri asam laktat kemudian dikumpulkan dengan cara subkultur pada media MRS agar dan dapat diuji potensi antimikrobanya.

j. Persiapan uji potensi antimikroba

1) Dikultur kembali masing-masing isolat bakteri asam laktat pada media MRS broth dan diinkubasi 37°C selama 24 jam. Selama diinkubasi dilakukan penggojogan pada tabung yang dikultur.

k. Uji potensi antimikroba pada media MHA

1) Koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dari biakan murni diambil beberapa ose kemudian disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl fisiologis steril sebanyak 5 mL

2) Kekeruhan suspensi dibandingkan dengan standar kekeruhan Mc Farland 0,5% yang setara dengan  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL pada alat Mc Farland densitometer

3) Swab kapas steril disiapkan dan dicelupkan ke dalam suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

4) Swab kapas yang telah dicelupkan digores-goreskan pada permukaan media MHA secara merata sampai seluruh permukaan tertutup rapat dengan goresan-goresan

5) Media MHA didiamkan selama 5-15 menit agar suspensi dapat meresap ke dalam media

6) Dibuat sumuran pada media MHA dengan menggunakan alat pembuat sumur dengan ukuran sumuran sama dengan diameter cakram

7) Masing-masing sumuran kemudian ditambahkan pada 20 µl isolat bakteri hasil inkubasi



- 8) Sebagai kontrol negatif digunakan media MRS broth steril yang ditanam pada sumuran
- 9) Sedangkan kontrol positif digunakan cakram antibiotik *amoksisilin* yang ditempelkan pada media MHA
- 10) Media MHA tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dengan posisi terbalik

## **G. Teknik Pengolahan Data dan Analisis Data**

### **1. Teknik pengolahan data**

Data berupa karakteristik isolat bakteri asam laktat dan zona hambat terhadap *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi sumuran, diolah serta data disajikan dalam bentuk tabel dan diberi narasi.

### **2. Analisis data**

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis deskriptif dengan membandingkan kenyataan di lapangan yaitu hasil pemeriksaan karakteristik bakteri asam laktat serta aktivitas antimikroba yang dihasilkan dengan teori dan jurnal hasil penelitian.