

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan desain Penelitian

Jenis penelitian adalah eksperimen dan desain penelitian adalah Rancangan Acak Lengkap. Rancangan ini digunakan bila unit percobaan relatif homogen seperti percobaan didalam laboratorium. Ulangan yang dilakukan tidak menunjukkan keheterogenan atau perbedaan yang berarti. Ulangan bertujuan untuk meningkatkan ketelitian, menambah cakupan penarikan kesimpulan, dan dapat menduga ragam galat dari percobaan (galat : kesalahan antara nilai sebenarnya dengan nilai yang diperkirakan). Penelitian ini menggunakan model tetap dimana perlakuannya ditentukan secara langsung oleh peneliti, sehingga untuk hari pertama dilakukan perlakuan pemanasan 1x dengan 5x ulangan terhadap media PCA, kemudian diukur pH dan diamati jumlah koloni yang tumbuh setelah 2x24 jam begitu pula seterusnya hingga pemanasan 4x.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Tanjungkarang, yang dilakukan pada bulan Mei–Juni 2021.

C. Subyek Penelitian

Media PCA steril dipanaskan 1x, 2x, 3x, dan 4x dengan pengulangan sebanyak 5x, diukur pH setiap pemanasan. Suspensi bakteri *Salmonella thypimurium* yang setara dengan Standar Mac Farland 0,5 diinokulasi dan dihitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh setelah 2x24 jam pada setiap pemanasan dan pengulangan.

D. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

No.	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Variabel bebas Pemanasan	Pemanasan media PCA 1x, 2x, 3x, dan 4x	Pengamatan langsung	Panci berisi air mendidih	Pemanasan 1x 2x 3x 4x	Ordinal
2.	Variabel terikat pH	pH media PCA setelah dipanaskan 1x, 2x, 3x, dan 4x	Mencelupkan pH meter kedalam media PCA	pH meter	<6.8 7.0±0.2 >7.2	Ordinal
3.	Variabel terikat Jumlah koloni bakteri	Koloni yang tumbuh pada media PCA setelah dipanaskan 1x, 2x, 3x, dan 4x dari suspensi bakteri yang setara dengan Standar Mac Farland 0,5	Menghitung secara langsung koloni yang tumbuh pada media PCA	Colony Counter	Jumlah koloni bakteri pada media PCA setelah pemanasan 1x Jumlah koloni bakteri pada media PCA setelah pemanasan 2x Jumlah koloni bakteri pada media PCA setelah pemanasan 3x Jumlah koloni bakteri pada media PCA setelah pemanasan 4x	Ordinal

E. Alat dan Bahan

1) Alat

Erlenmeyer 250 mL, beaker glass 50 mL, pipet ukur 1 mL, cawan petri, lampu spritus, vacump pump, oven, coloni counter, inkubator, neraca elektronik, vortex, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pH meter, panci, dan kompor.

Alat- alat diatas disterilkan menggunakan oven selama 2 jam pada suhu 180^o C. Saat alat sudah dingin, alat siap digunakan (Soemarno,2000).

2) Bahan

Media *Plate Count Agar* (PCA), suspensi bakteri yang setara dengan Standar Mac Farland 0,5, NaCl 0,85%, dan Aquadest.

F. Prosedur Kerja

a. Pembuatan media *Plate Count Agar* (PCA)

- 1) Media PCA bubuk ditimbang sesuai etiket yaitu $23,5 : 1000 \times 225 = 5,2875$ yang dibulatkan menjadi 5,3 g.
- 2) Dimasukkan media kedalam erlenmeyer volume 250 mL dan dilarutkan kedalam 225 mL aquadest, kemudian dibuat sebanyak 5 erlenmeyer.
- 3) Disterilisasi media PCA tersebut dengan autoclave pada suhu 121°C , selama 15 menit, dan tekanan 1 atm.

b. Pembuatan suspensi bakteri *Salmonella thypimurium*

- 1) Diambil 1 mata ose koloni bakteri dari strain asli bakteri *Salmonella thypimurium*.
- 2) Dimasukkan kedalam 5 mL media nutrient broth, kemudian homgenkan.
- 3) Diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C .

c. Pembuatan Standar Mac Farland

- 1) Dibuat Standar Mac Farland 0,5 dengan cara membuat larutan Asam Sulfurik 1% (H_2SO_4) sebanyak 9,95 mL dan dicampur dengan larutan Barium Klorida 1% (BaCl_2) sebanyak 0,05 mL.
- 2) Dimasukkan kedalam satu tabung reaksi dan diberi label nama Standar Mac Farland 0,5.

d. Pembuatan Sampel

- 1) Diambil suspensi bakteri yang telah dibiakkan 24 jam dari nutrient broth kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 5 mL NaCl 0,85% steril, kemudian samakan kekeruhan secara visual antara suspensi bakteri dan Standar Mac Farland 0,5.
- 2) Sampel bakteri yang digunakan pada setiap perlakuan merupakan sampel yang baru dibuat atau baru disamakan kekeruhannya dengan standar Mac Farland 0,5 untuk menghindari penambahan jumlah bakteri.

e. Kalibrasi pH meter

- 1) Masukkan bubuk buffer pH 4.00 ke dalam beaker glass, tambahkan 250 mL aquades. Aduk hingga larut menggunakan batang pengaduk.
- 2) Masukkan buffer bubuk pH 7.00 ke dalam beaker glass, tambahkan 250 mL aquades. Aduk hingga larut menggunakan batang pengaduk.
- 3) Masukkan buffer bubuk pH 10.00 ke dalam beaker glass, tambahkan 250 mL aquades. Aduk hingga larut menggunakan batang pengaduk.
- 4) Diambil 250 mL aquades kedalam beaker glass.
- 5) Hidupkan pH meter dengan cara menggeser tombol di bagian atas pH meter.
- 6) Celupkan elektroda pH meter ke dalam aquades, diamkan beberapa saat sampai menunjukkan nilai pH meter yang stabil.
- 7) Celupkan elektroda pH meter ke dalam larutan buffer pH 4.00, aduk secara perlahan hingga pH meter menunjukkan nilai pH 4.00. Bilas kembali elektroda ke dalam aquades.
- 8) Celupkan elektroda pH meter ke dalam larutan buffer pH 7.00, aduk secara perlahan hingga pH meter menunjukkan nilai pH 7.00. Bilas kembali elektroda ke dalam aquades.
- 9) Celupkan elektroda pH meter ke dalam larutan buffer pH 10.00, aduk secara perlahan hingga pH meter menunjukkan nilai pH 10.00. Bilas kembali elektroda ke dalam aquades.

f. Pengukuran pH

- 1) Pemanasan dilakukan sebanyak 4 kali dengan 5 kali pengulangan. Pemanasan 1x dihitung saat media PCA yang telah steril disimpan dalam lemari pendingin selama 1x24 jam, kemudian dipanaskan kembali sebelum digunakan. Pemanasan dilakukan dengan cara memanaskan media diatas panci yang berisi air mendidih. Media PCA disimpan kembali dalam lemari pendingin setelah digunakan. Pemanasan berulang akan dilakukan dengan cara yang sama.
- 2) pH meter yang telah dikalibrasi, dibilas terlebih dahulu ke dalam aquades. Usap perlahan elektroda pH meter menggunakan tissue.

- 3) Dichelupkan elektroda pH meter kedalam 20 mL media PCA yang telah dipanaskan 1x di dalam beaker glass, aduk secara perlahan hingga pH meter menunjukkan nilai pH yang stabil. Catat nilai pH, dan bilas kembali elektroda ke dalam aquades.
 - 4) Dilakukan pengukuran pH dengan cara yang sama untuk pemanasan 2x, 3x, dan 4x.
- g. Hitung jumlah koloni bakteri
- 1) Dipipet 1 ml sampel bakteri *Salmonella thypimurium* yang setara dengan standar Mac Farland 0,5, dimasukkan kedalam cawan petri.
 - 2) Dituang sebanyak 20 ml media PCA yang telah dipanaskan 1x kedalam cawan petri.
 - 3) Dihomogenkan dengan menggerakkan media membentuk angka 8.
 - 4) Dilakukan cara kerja yang sama untuk 5 kali pengulangan.
 - 5) Media yang telah ditanam kemudian diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu 37°C didalam inkubator. Media PCA disimpan kembali kedalam lemari pendingin.
 - 6) Dihitung jumlah koloni kuman yang tumbuh setelah 2x24 jam pada 5 cawan petri media PCA pemanasan 1x.
 - 7) Dipipet 1mL sampel bakteri *Salmonella thypimurium* yang setara dengan standar Mac Farland 0,5 kedalam cawan petri, kemudian dituang 20 mL media PCA yang telah dipanaskan 2x kedalam cawan petri.
 - 8) Dihomogenkan dengan menggerakkan media membentuk angka 8. Dilakukan cara kerja yang sama untuk 5 kali pengulangan.
 - 9) Media yang telah ditanam kemudian diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu 37°C didalam inkubator. Media PCA disimpan kembali kedalam lemari pendingin.
 - 10) Dihitung jumlah koloni kuman yang tumbuh setelah 2x24 jam pada 5 cawan petri media PCA pemanasan 2x.
 - 11) Dilakukan penanaman sampel bakteri dengan cara yang sama untuk pemanasan 3x dan 4x.

G. Pengumpulan Data

Data diperoleh dari pengamatan langsung nilai pH media PCA setelah dipanaskan 1x, 2x, 3x, dan 4x dan jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media PCA setelah dipanaskan 1x, 2x, 3x, dan 4x.

H. Pengolahan dan Analisa Data

1. Pengolahan Data

Data yang diolah adalah nilai pH dan jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media PCA yang telah dipanaskan 1x, 2x, 3x, dan 4x. Data tersebut kemudian dicari rata-ratanya dan dimasukkan ke dalam tabel.

2. Analisis Data

Data dianalisis menggunakan ANOVA. Tingkat kepercayaan 95% dengan tingkat kesalahan atau yang disebut α adalah 5% atau 0,05. Nilai Fhitung dibandingkan dengan nilai Ftabel. Jika Fhitung < Ftabel, artinya pemanasan berulang tidak memberikan pengaruh nyata terhadap pH dan jumlah koloni bakteri pada media PCA. Sehingga analisis data tidak dilanjutkan ke Uji Beda Nyata Terkecil, tetapi jika Fhitung > Ftabel, artinya pemanasan 1x, 2x, 3x, dan 4x memberikan pengaruh yang nyata terhadap pH dan jumlah bakteri yang tumbuh kemudian dilanjutkan dengan mencari nilai Beda Nyata Terkecil (BNT).

Uji Beda Nyata Terkecil merupakan prosedur pengujian perbedaan diantara pemanasan media PCA 1x, 2x, 3x, dan 4x terhadap pH dan jumlah bakteri yang tumbuh. Kriteria pengambilan keputusan Uji Beda Nyata Terkecil adalah jika beda dari dua perlakuan lebih besar dari BNT, maka kedua perlakuan tersebut berbeda signifikan. Jika beda dari dua perlakuan lebih kecil atau sama dengan BNT, maka kedua perlakuan tersebut tidak berbeda signifikan.