

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Design Penelitian

Jenis penelitian adalah kuantitatif dengan desain penelitian *true experimental*. Variabel dependen yaitu susu kambing Etawa dan variabel independen yaitu air rebusan kulit Kayu Manis dengan volume 2,5 ml.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei-Juni 2023 dengan pengambilan sampel susu di peternakan kambing Etawa di Sungai Langka Kabupaten Pesawaran dan di peternakan kota Metro dan diperiksa di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.

C. Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah Air rebusan kulit kayu manis dengan volume 2,5 ml yang berdasarkan penelitian Huda (2022) Penurunan angka kuman yang dilakukan dengan penambahan bahan alami didapatkan penurunan tertinggi dengan penambahan 2,5 ml air rebusan bahan alami, dan pada volume 2,5 ml merupakan batas penambahan bahan alami yang tidak merubah rasa, warna dan aroma pada susu.

D. Variable dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 variabel dan definisi operasional

Variabel Penelitian	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Variabel terikat					
Angka kuman Susu Kambing Segar Peranakan Etawa dari Sungai Langka dan kota Metro	Jumlah angka kuman yang terkandung pada susu segar kambing Etawa yang dilakukan sampling pada desa Sungai Langka dan kota Metro	Metode <i>Total Plate Count</i> (TPC)	<i>Coloni Counter</i>	CFU (<i>colony forming unit</i>)	Nominal
Variabel bebas					
Air rebusan Kulit kayu manis	Air rebusan kulit kayu manis yang didapatkan dengan merebus 100ml air dan 100 gr kulit kayu manis	Volumetrik	Gelas ukur	Ukuran 2,5 ml dalam 100ml susu segar kambing Etawa	Nominal

E. Teknik Pengumpulan Data

Data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data primer. Data primer diperoleh dengan melakukan eksperimen pemberian air rebusan kulit kayu manis terhadap susu segar kambing Etawa dengan volume 2,5ml.

Data diperoleh dengan cara dan prosedur:

- 1) Penelusuran pustaka untuk memperoleh perspektif ilmiah dari penelitian.
- 2) Dilakukan penelitian uji pengaruh pemberian air rebusan kulit kayu manis terhadap mikrobiologis susu kambing Etawa.
- 3) Didapatkan jumlah koloni yang terdapat pada tiap-tiap sampel susu kambing Etawa.
- 4) Dilakukan pengolahan dan menyajikan data yang telah diperoleh, dengan langkah sebagai berikut :

a. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan adalah cawan petri, tabung reaksi, pipet volumetrik, erlenmeyer, penghitungan koloni (coloni counter), gunting, pinset, jarum inokulasi (ose), pembakaran bunsen, korek, tisu, label, timbangan, pengocok tabung (vortex), inkubator, penangas air, autoclave, lemari steril, lemari pendingin dan freezer.

2. Bahan pemeriksaan

Media Plate Count Agar Oxoid CM 325, Aquades pH ± 7 (netral), pH stick, Aluminium foil, dan Benang.

b. Sterilisasi Alat

Semua alat gelas yang dipakai (cawan petri, tabung reaksi, pipet volumetrik, dan erlenmeyer) dicuci dan dikeringkan, kemudian dibungkus menggunakan kertas kopi untuk tabung ditutup terlebih dahulu menggunakan kapas lalu dibungkus menggunakan kertas kopi dan disterilkan dalam oven pada 160°C selama 1 jam (Soemarno, 2000:11)

c. Pembuatan Media *Total Plate Count* (TPC)

- 1) Disiapkan alat dan bahan,
- 2) Dihitung berapa banyak Media Plate Count Agar Oxoid 3325 yang harus ditimbang dengan menggunakan perhitungan:
$$\frac{23,5 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}} \times 120 \text{ ml} = 2,82 \text{ gr}$$
 dalam 1 erlenmeyer,
- 3) Media Plate Count Agar Oxoid 3325 ditimbang sebanyak 2,82 gr kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer,
- 4) Dilarutkan media PCA dengan 120ml aquadest kemudian dihomogenkan,
- 5) Ditutup erlenmeyer menggunakan kapas yang dilapisi alumunium foil dan larutkan media PCA diatas hot plate hingga media larut sempurna dengan ciri larutan media jernih dan tidak terdapat butir-butir media pada dinding erlenmeyer,
- 6) Media disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 ATM.
- 7) Media yang telah steril didinginkan hingga suhu mencapai 45°C.
- 8) Media siap digunakan.

d. Pembuatan larutan NaCl 0,85%

- 1) Disiapkan alat dan bahan,
- 2) Dihitung berapa banyak NaCl yang harus dilarutkan dengan perhitungan: $\text{NaCl } 0,85\% = \frac{\text{gr}}{1500 \text{ ml}} \times 100\% = 12,75 \text{ gr NaCl}$
- 3) Ditimbang NaCl sebanyak 13,5 gr dimasukkan kedalam erlenmeyer,
- 4) Ditambahkan aquadest sebanyak 1500ml kedalam erlenmeyer kemudian dihomogenkan.

e. Pembuatan Buffer stock

- 1) Disiapkan alat dan bahan,
- 2) KH_2PO_4 ditimbang sebanyak 0,5gr kemudian dimasukkan kedalam beaker glass,
- 3) Ditambahkan aquadest sebanyak 15ml kedalam beaker glass kemudian dihomogenkan,

- 4) Ditambahkan NaOH 1N sedikit demi sedikit hingga pH \pm 7 (netral).

f. Pembuatan Buffer Phosphat

- 1) Disiapkan alat dan bahan,
- 2) Ditambahkan larutan KH_2PO_4 sebanyak 13,25ml kedalam larutan NaCl 0,85% sebanyak 1500 ml lalu dihomogenkan.
- 3) Larutan buffer dimasukkan kedalam erlenmeyer sebanyak 225ml dan dimasukkan pada tabung sebanyak 1 ml.
- 4) Erlenmeyer ditutup menggunakan kapas yang dilapisi aluminium foil dan tabung reaksi ditutup menggunakan kapas steril.
- 5) Larutan Buffer Phosphat dilakukan sterilisasi dengan Autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit tekanan 1 ATM.
- 6) Larutan Buffer phoshat yang telah steril didinginkan hingga suhu 45°C .
- 7) Larutan buffer phospat siap digunakan.

g. Pembuatan Larutan uji

- 1) Disiapkan alat dan bahan,
- 2) Dimasukkan 100gr kulit kayu manis pada beakerglass,
- 3) Ditambahkan 100ml aquadest pada beakerglass lalu ditutup dengan aluminium foil,
- 4) Direbus kulit kayu manis diatas hotplate hingga mendidih,
- 5) Dinginkan air rebusan kulit kayu manis,
- 6) diambil air rebusan kulit kayu manis sebanyak 2,5 ml yang akan dimasukkan kedalam 100 ml susu kambing Etawa dengan perhitungan : $\frac{2,5 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 2,5\%$.

h. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel dilakukan pada pagi hari setelah pemerasan susu. Produk susu disimpan pada ice box pada suhu $\pm 4^\circ\text{C}$. waktu pengambilan sampel dari desa Sungai Langka sampai ke laboratorium Bakteriologi selama 30 menit, dan waktu pengambilan sampel dari kota Metro sampai ke laboratorium bakteriologi selama 2 jam. Menurut Nababan (2014) suhu penyimpanan susu pada suhu ruang

dapat bertahan selama 4 jam, dan menurut Putri (2016) suhu penyimpanan susu pada suhu rendah dapat bertahan selama 6 jam.

i. Pengujian *Total Plate Count (TPC)*

Urutan perlakuan:

1) Sebelum pemberian air rebusan kulit kayu manis

- a) Disiapkan alat dan bahan,
- b) Ditambahkan 25ml sampel susu kambing Etawa sebelum penambahan rebusan kulit kayu manis kedalam 225ml larutan Buffer Phosphat steril kemudian dihomogenkan, ini merupakan larutan dengan pengenceran 10^{-1} .
- c) dipindahkan 1 ml suspensi pengenceran 10^{-1} tersebut dengan pipet steril kedalam larutan 9 ml Buffer Phosphat untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} ,
- d) dilakukan hal yang sama hingga didapatkan pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , dan 10^{-6}
- e) diambil masing-masing 1 ml dari larutan pengencer tersebut kedalam cawan petri,
- f) ditambahkan 15ml PCA dan setelah beku inkubasikan pada suhu $\pm 36^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam,
- g) dihitung koloni yang tumbuh pada media TPC dengan menggunakan coloni counter.

2) Setelah pemberian kulit kayu manis

- a) Disiapkan alat dan bahan,
- b) Diambil 100ml susu kambing Etawa kedalam erlenmeyer steril,
- c) Ditambahkan air rebusan kulit kayu manis sebanyak 2,5ml, lalu dihomogenkan,
- d) Ditambahkan 25ml sampel susu kambing Etawa yang telah ditambahkan air rebusan kulit kayu manis kedalam 225ml Buffer Phosphat steril kemudian dihomogenkan, ini merupakan larutan dengan pengenceran 10^{-1}

- e) dipindahkan 1 ml suspensi pengenceran 10^{-1} tersebut dengan pipet steril kedalam larutan 9 ml Buffer Phosphat untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} ,
- f) dilakukan hal yang sama hingga didapatkan pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , dan 10^{-6}
- g) diambil masing-masing 1 ml dari larutan pengencer tersebut kedalam cawan petri,
- h) ditambahkan 15ml PCA dan setelah beku inkubasikan pada suhu $\pm 36^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam,
- i) dihitung koloni yang tumbuh pada media TPC dengan menggunakan coloni counter.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

Data yang digunakan dalam penelitian ini merupakan data hasil pemeriksaan jumlah koloni pada plate dengan pemberian air rebusan kulit kayu manis terhadap susu segar kambing peranakan Etawa di Sungai Langka Pesawaran dengan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC).

2. Analisa Data

Analisa data yang digunakan adalah analisa univariat dan bivariat. Analisa ini digunakan untuk menghitung rata-rata angka kuman dan menghitung persentase sampel susu segar kambing peranakan Etawa di Sungai Langka Pesawaran dan kota Metro. Data disajikan dalam bentuk tabel. Rancangan penelitian Rancangan Acak Lengkap, uji *wilcoxon* untuk membandingkan penurunan jumlah bakteri sebelum dan setelah pemberian air rebusan kulit kayu manis. Sampel adalah susu segar kambing peranakan Etawa sebelum dan setelah pemberian air rebusan kulit kayu manis dengan volume 2,5ml.

G. Ethical Clearance

Penelitian ini telah dinyatakan layak etik berdasarkan pernyataan Komite Etik Penelitian Kesehatan Poltekkes Tanjungkarang No.136/KEPK-TJK/II/2023, 21 Februari 2023. Penelitian ini dilakukan dengan melakukan pembunuhan limbah bakteri dari hasil penelitian, dengan dilakukan perebusan media pembenihan dan dibuang ke saluran pembuangan. Pembuangan sisa susu dibuang ke saluran pembuangan karena tidak berbahaya bagi lingkungan.