

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Metode Penelitian

Pertumbuhan Bakteri diamati dan dihitung dengan metode angka lempeng total (ALT). dan jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorium menggunakan bahan alternatif dari ubi putih dan ubi ungu yang ditanami dengan *Staphylococcus*.

3.2 Desain Penelitian

Peneliti menggunakan 2 jenis ubi yaitu ubi putih dan ubi ungu sebagai media alternatif pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, dan 3 jenis konsentrasi 5% ,7,5% dan 10% masing masing sampel dibuat 6 pengulangan. Pertumbuhan dengan menggunakan 2 jenis ubi dan media NA. Inokulasi bakteri menggunakan teknik metode pour plate, sedangkan untuk subjek penelitiannya yaitu *Staphylococcus aureus* dengan 6 kali pengulangan sehingga di peroleh jumlah 54 unit percobaan. Untuk menentukan desain penelitian, terlebih dahulu ditentukan jumlah pengulangan yang dihitung, berdasarkan rumus pengulangan gomez sebagai berikut :

t : Jumlah perlakuan

r : Jumlah pengulangan

15 : Derajat bebas

$t(r-1) < 15$

$3(r-1) > 15$

$$3r-3>15$$

$$3r>15+3$$

$$3r>19$$

$$r>19/3$$

$$r>6$$

maka, dilakukan pengulangan selama 6 kali.

3.3 ALT (Angka Lempeng Total)

Angka Lempeng Total (ALT) merupakan metode kuantitatif yang digunakan untuk mengetahui jumlah mikroorganisme dalam suatu sampel. ALT dihitung dengan menghitung jumlah koloni yang tumbuh pada media padat setelah diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Metode inokulasi yang digunakan adalah metode pour plate, dimana sampel dituangkan ke permukaan media. Koloni yang tumbuh di permukaan dihitung satuan penghitungan yang dipakai adalah CFU (Colony Forming Unit) dengan cara membuat seri pengenceran sampel dan menumbuhkan sampel pada media padat. (Suare Marcillo, 2012)

Prinsip metode ini adalah jika sel mikroba yang masih hidup ditumbuhkan pada medium agar, maka sel mikroba tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dengan mata tanpa menggunakan mikroskop. Sampel yang sudah dihomogenisasikan dan diinokulasi kedalam permukaan media agar. Setelah diinkubasi, koloni mikroba yang tumbuh dihitung sebagai jumlah mikoba. (Suare Marcillo, 2012)

Perhitungan jumlah koloni dilakukan dengan total bakteri (ALT) dengan ketentuan yaitu, satu koloni dihitung satu koloni, dua koloni yang bertumpuk dihitung satu koloni, dua koloni yang bertumpuk tetapi masih dapat dibedakan dihitung dua koloni, dan koloni yang besarnya lebih dari setengah luas petri tidak dihitung. (Arum & Wahyudi, 2022) Perhitungan ALT dilakukan dengan faktor pengenceran 10⁻⁶ menggunakan rumus sebagai berikut :

$$ALT = \frac{\text{Jumlah koloni} \times 10}{\text{faktor pengenceran}}$$

3.4 Populasi dan sampel

Ekstrak ubi jalar putih dan ubi ungu yang dijadikan tepung dan ditanam pada media pertumbuhan alternatif untuk pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

3.5 Alat Cawan dan Bahan

Tabel 3. 1 Alat

No	Nama Alat	Jumlah	Keterangan
1	petri	50	-
2	Autoklaf	1	-
3	Inkubator	1	-
4	Api bunsen	1	-
5	Ose	Secukupnya	-
6	Neraca Analitik	1	-
7	Tabung Erlenmeyer	3	-
8	Tabung Reaksi	Secukupnya	-
9	Kompor	1	-
10	Oven	1	-
11	Sendok	1	-

Tabel 3. 2 Bahan

No	Nama Bahan	Jumlah	Keterangan
1	Agar agar	250 g	Swallow Agar
2	Aquadest	Secukupnya	-
3	BaCl ₂	1 g	1%
4	H ₂ SO ₄	1 g	1%
5	Nutrien Agar	5 g	-
6	NaCl 0.9	1000ml	-
7	Suspensi Bakteri	Secukupnya	<i>S.aureus</i>
8	Tepung Ubi putih	250 g	-
9	Tepung ubi ungu	250 g	-

3.6 Tepung Ubi Jalar

Media ubi jalar dilakukan dengan pembuatan tepung pada ubi jalar, ubi diiris tipis lalu dikeringkan pada sinar matahari selama 12-18jam atau dikeringkan dengan menggunakan inkubator pada suhu 40°C selama 10jam selanjutnya di masukan kedalam grinder hingga menjadi tepung.

3.7 Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas yang akan digunakan dicuci sampai bersih lalu dikeringkan. Alat-alat dibungkus dengan kertas, kemudian dimasukan ke dalam oven pada suhu 180°C selama 1 jam atau dengan 160°C selama 2 jam.

3.8 Prosedur Pembuatan

3.8.1 Peremajaan biakan bakteri

Ditimbang media NA sebanyak 1.4g lalu dilarutkan dengan 50ml aquades dan dipanaskan hingga larut. Lalu dimasukkan kedalam cawan petri dan disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Diinokulasi sebanyak 1 ose dari bakteri biakan murni dan di goreskan diatas permukaan media. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Inokulasi bakteri adalah Kegiatan untuk menumbuhkan atau meremajakan bakteri dan mendapatkan populasi bakteri yang murni. atau disebut dengan memindahkan bakteri dari medium yang baru dengan Tingkat ketelitian yang sangat tinggi.

3.8.2 Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 1-2 ose biakan murni, bakteri uji kemudian disuspensikan kedalam larutan NaCl 0,9 % pada tabung reaksi steril dan dihomogenkan. Kekeruhan bakteri ditentukan hingga kekeruhan sama dengan standar 1 Mc Farland. (Siti Juariah, 2021a).

Pembuatan kekeruhan Mc Farland dilakukan dengan mencampur H₂SO₄ 1% Sebanyak 9,95 ml dengan BaCl₂.2H₂O 1% sebanyak 0,05 ml kedalam tabung reaksi dan kemudian di homogenkan (Anita et al.,2020) Larutan McFarland 0,5 biasa digunakan sebagai pembanding kekeruhan biakan bakteri dalam medium cair dengan kepadatan. Pembuatan larutan

McFarland 0,5 yaitu Barium Clorida (BaCl_2) 1% lalu disimpan ditempat yang terhindar dari Cahaya matahari langsung. (Aviany & Pujiyanto, 2020)

3.8.3 Pembuatan media alternatif tepung ubi putih dan ubi ungu

Media dari ubi putih dan ungu terdiri atas 3 konsentrasi tepung, serta menggunakan agar yang berbeda dan NaCl yang sama dengan cara pembuatan media ubi.

Tabel 3. 3 Pembuatan tepung Ubi

Konsentrasi	Tepung (gram)	Agar (gram)	Aquades (ml)
5%	2,5	3,8	500
7.5%	3,75	3,8	500
10%	5,0	3,8	500

Pelaksanaan penelitian diawali dengan proses streilisasi alat yang digunakan dalam penelitian, pembuatan media alternatif pada tepung ubi putih dan ubi ungu sebanyak 2,5 g, 3,75g dan 5,0 g, 500ml aquades, lalu menambahkan NaCl 2,5 g dan agar 3,8 g. Selanjutnya disterilkan dengan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C agar terbebas dari mikroba.

3.8.4 Pembuatan NA (Nutrien Agar)

Ditimbang media NA (Nutrien agar) 2,8 gram, dilarutkan dalam aquades 100 mL, diaduk larutan hingga homogen dengan menggunakan batang pengaduk, nyalakan hotplate dan atur suhunya, ditutup dengan alumunium foil, larutan media dipindahkan kedalam erlenmeyer jika sudah mendidih, ditutup menggunakan kapas, Setelah itu disetrilisasi

dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media dituang ke dalam cawan petri secara aseptis, lalu dibiarkan pada suhu ruang hingga media memadat.

3.9 Lokasi dan Waktu penelitian

Penelitian dilakukan dilaboratorium mikrobiologi kampus Analis Bakti Asih Bandung (STABA) dan dilaboratorium SMKS kesehatan Sabilurrahim bogor. Dan waktu penelitian dilakukan pada bulan Januari-Februari 2023.