

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan eksperimental. Penelitian dilakukan untuk menguji epektifitas cairan *eco enzyme* dari kulit jeruk nipis sebagai desinfektan alami terhadap suspensi bakteri *Eschericia coli* menggunakan metode Koefisien Fenol dengan optimasi pengenceran dan waktu kontak yang berbeda.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada Maret sampai dengan Mei 2021 di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Pipet ukur, mikro pipet, tabung reaksi, kapas, rak tabung, autoclave, inkubator, botol sampel, batang pengaduk, erlenmayer, jarum ose, Bunsen, LAF.

3.3.2 Bahan

Eco enzyme yang dibuat dari sisa kulit jeruk nipis, gula merah, dan air yang difermentasi selama 3 bulan, aquadest, fenol 5%, Nutrient Broth (NB), suspensi bakteri *E.coli*.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang terkait dalam penelitian ini adalah optimasi pengenceran larutan uji *eco enzyme* dalam lima pengenceran yaitu 1:40, 1:60, 1:80, 1:100, 1:120. Optimasi waktu kontak yaitu selama 5, 10, dan 15 menit.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Eschericia coli*.

3.5 Definisi Operasional Variabel

No.	Nama variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala pengukuran	Hasil
1.	Efektivitas <i>Eco Enzyme</i>	Kemampuan <i>eco enzyme</i> sebagai desinfektan dalam membunuh mikroorganisme.	Koefisien Fenol menggunakan standart fenol	5 seri pengenceran yaitu 1:40, 1:60, 1:80, 1:100, 1:120 dengan waktu kontak 5, 10, 15 menit.	Perbandingan desinfektan uji <i>eco enzyme</i> dengan standart fenol
2.	Pertumbuhan bakteri <i>E coli</i>	Cemaran yang akan diidentifikasi pada <i>eco enzyme</i> bewarna keruh pada nutrien broth yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri <i>Eschericia coli</i> .	Pengamatan dengan mata telanjang	Perubahan kekeruhan pada media	Warna keruh atau jernih

3.6 Metode Penelitian

Pada penelitian ini menguji efektifitas *eco enzyme* sebagai desinfektan alami dengan menggunakan metode koefisien fenol yang dibandingkan dengan standart fenol dalam membunuh bakteri. Mula-mula dibuat larutan *eco enzyme* dengan perbandingan 500ml air:50gram gula merah:150gram kulit jeruk nipis, lalu di fermentasi selama 3 bulan. Metode koefisien fenol dilakukan dengan cara memasukkan suspensi bakteri *Eschericia coli* sebanyak 0,2ml kedalam larutan *eco enzyme* dan standart fenol yang telah dibuat 5 seri pengenceran yaitu 1:40, 1:60, 1:80, 1:100, 1:120. Kemudian dilakukan pada optimasi waktu selama 5, 10, dan 15 menit, setiap pengenceran diambil dan ditanam pada media nutrient broth lalu di inkubasi selama 24 jam. Kemudian pengamatan hasil pertumbuhan bakteri dengan mengamati kekeruhannya dan dihitung nilai koefisien fenol.

3.6.1 Proses Pembuatan *Eco Enzyme*

Eco enzyme terbuat dari kulit jeruk nipis, air, gula (gula merah, molasses). Pembuatannya membutuhkan kontainer berupa wadah yang terbuat dari plastik, penggunaan bahan yang terbuat dari kaca sangat dihindari karena dapat menyebabkan wadah pecah akibat aktivitas mikroba fermentasi. Tambahkan 10 bagian air ke dalam kontainer (isi 60% dari isi kontainer). Kemudian tambahkan 1 bagian gula (10% dari jumlah air) dan masukkan 3 bagian dari sampah sayuran atau buah-buahan hingga mencapai 80% dari kontainer. Setelah itu tutup kontainer selama 3 bulan dan buka setiap hari untuk mengeluarkan gas selama 1 bulan pertama (Atika,2010).

3.6.2 Sterilisasi Alat

Seluruh alat yang digunakan disterilisasi kedalam oven dengan suhu 150°C selama 1,5-3 jam.

3.6.3 Peremajaan Bakteri

Diambil satu ose biakan bakteri uji *Escherichia coli* pada media Nutrien Agar miring, kemudian ditanam pada media Nutrien Broth dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam.

3.6.4 Pembuatan Media Nutrient Broth (NB)

Sebanyak 2,5 gram Nutrient Broth dilarutkan ke dalam 190ml aquades, kemudian dipanaskan hingga larut. Nutrient broth yang telah di panaskan dimasukkan dalam 46 tabung reaksi , masing-masing dengan volume 5ml. Kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 212°C dan tekanan sebesar 1 atm selama 15 menit.

3.6.5 Uji Koefisien Fenol

Dibuat larutan uji *eco enzyme* dengan konsentrasi 5%. Dilakukan optimasi pengenceran larutan uji *eco enzyme* dan standart fenol dalam lima seri pembanding yaitu 1:40, 1:60, 1:80, 1:100, 1:120, dan diberi label yang sesuai. Siapkan media NB steril sebagai optimasi waktu kontak pada *eco enzyme* dan fenol. Digunakan waktu kontak yaitu selama 5, 10, dan, 15 menit. Pindahkan suspensi bakteri *Escherichia coli* sebanyak 0,2 ml masing-masing kedalam seri fenol pembanding

dan seri eco enzyme pembanding. Lakukan secara aseptis dan sesuai dengan waktu yang ditentukan secara bersamaan dari 5 seri tabung ke dalam media NB, dimulai dari waktu kontak 5 menit. Lakukan hal serupa untuk waktu kontak 10 dan 15 menit. Kemudian inkubasi selama 24 jam. Hasil yang diperoleh dibandingkan dengan blanko, dan diamati pertumbuhan bakteri. Nilai Koefisien fenol dihitung dengan cara membagi hasil uji pengenceran tertinggi zat desinfektan yang tidak ada pertumbuhan bakterinya pada waktu tercepat dan terlama dengan hasil uji pengenceran fenol yang tidak ada pertumbuhan bakterinya pada waktu yang tercepat dan terlama. Nilai koefisien fenol yang kurang dari 1 menunjukkan bahwa efektifitas senyawa tersebut lebih kecil dari fenol. Sedangkan jika nilai koefisien fenolnya lebih dari 1 maka senyawa tersebut lebih efektif dibanding fenol.

3.7 Pengolahan, Penyajian, dan Analisis Data

3.7.1 Pengolahan Data

- a. Pengenceran *Eco Enzyme* 5% (1/20)

5ml sampel *eco enzyme* + 95ml aquades = *eco enzyme* 5%

No	Konsentrasi	Eco enzyme	aquades	Volume total	Volume dibuang	Volume akhir
1	1:40	4ml	4ml	8ml	3ml	5ml
2	1:60	2ml	4ml	6ml	1ml	5ml
3	1:80	2ml	6ml	8ml	3ml	5ml
4	1:100	2ml	8ml	10ml	5ml	5ml
5	1:120	2ml	10ml	12ml	7ml	5ml

- b. Pengenceran Fenol 5% (1/20)

5ml fenol+95ml aquades= fenol 5%

No	Konsentrasi	Fenol (ml)	Aquades	Volume total	Volume dibuang	Volume akhir
1	1:40	4ml	4ml	8ml	3ml	5ml
2	1:60	2ml	4ml	6ml	1ml	5ml
3	1:80	2ml	6ml	8ml	3ml	5ml
4	1:100	2ml	8ml	10ml	5ml	5ml
5	1:120	2ml	10ml	12ml	7ml	5ml

3.7.2 Penyajian Data

Pembacaan Hasil Kekeruhan Tabung Uji:

Bahan	Pengenceran	Kontrol Negatif Media NB	Pengamatan Pertumbuhan Mikroorganisme Setelah Waktu Kontak (menit)		
			5	10	15
Standar Fenol/Sampel	1:40				
	1:60				
	1:80				
	1:100				
	1:120				

Keterangan:

+: Pertumbuhan bakteri (keruh)

-: Tidak ada pertumbuhan bakteri

Data yang diperoleh akan dianalisa uji koefisien fenol sesuai SNI 1842:2019. Hasil diamati kekeruhan yang menandakan positif tercemar bakteri *Escherichia coli* pada sampel dan dibandingkan dengan fenol. Dihitung koefisiensi fenol minimal 1.

Rumus :

$$Pc = \frac{\{(Cat: Cbt) + (Cat': Cbt')\}}{2}$$

Pc = Koefisien fenol

Cat = Konsentrasi desinfektan tercepat membunuh

Cbt = Konsentrasi fenol tercepat membunuh

Cat' = Konsentrasi desinfektan terlama membunuh

Cbt' = Konsentrasi fenol terlama membunuh