

BAB IV  
METODE PENELITIAN

A. Bahan.

Bahan - bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Biji kelor yang sudah tua, asal desa Tembalang, Kecamatan Semarang Selatan.
2. Sampel air dari tandon air di desa Tembalang.
3. Aquadest dan aquadest steril.
4. Alkohol 70%.
5. Biakan murni *Eschericia coli*.
6. Biakan murni *Bacillus subtilis*.
7. Medium NA (*Nutrien Agar*).
8. Medium Pepton 1%
9. Medium laktosa cair (*Lactosa Broth*).
10. Medium BGLB (*Brilliant Green Lactose Bile Broth*).
11. Medium Endo Agar dan Basic fuchsin.
12. Medium MSA (*Mannitol Salt Agar*).

B. Alat.

Alat - alat yang digunakan :

1. Jerigen steril volume 5 liter.
2. Jerigen steril volume 25 liter.

3. Cawan petri dan jarum ose.
4. Tabung reaksi dan tabung Durham.
5. Gelas ukur 100 ml dan 500 ml.
6. Gelas Erlenmeyer 300 ml, 500 ml dan 1000 ml.
7. Pipet ukur 1 ml dan 5 ml.
8. Mikropipet 100 ml.
9. Lampu spriritus dan lampu steril.
10. Kertas pH dan pH-pen.
11. Timbangan listrik (Sartorius).
12. Timbangan manual.
13. Mikroskop dan gelas obyek.
14. Pewarnaan Gram.
15. Penghitung koloni.
16. Sterilisator dan inkubator.
17. Stirrer dan pemanas.

### C. Metodologi

Untuk mengetahui kualitas air sampel; secara bakteriologis; digunakan parameter :

1. Jumlah total bakteri, dengan menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*).
2. Populasi bakteri Koliform group dengan menggunakan metode MPN (*Most Probable Number*).

Untuk uji potensi, parameter diamati dengan mengukur diameter daerah hambat dan ekstrak biji kelor terhadap *Escherieia coli* dan *Bacillus subtilis*.

#### D. Cara Kerja Pengambilan Sampel

##### 1. Memilih dan mempersiapkan biji kelor.

Biji kelor diambil / dipetik dari pohon kelor yang sedang berbuah, didesa Tembalang. Dipilih biji dari buah yang sudah masak dan sudah tua di pohon. Buah yang masak, berwarna coklat dan kulit buah sudah ada yang mulai pecah.

Biji kelor yang telah dipersiapkan kemudian ditimbang untuk mencari berat rata-ratanya kemudian biji dikupas kulitnya dan isinya ditumbuk dengan mortor, hingga diperoleh biji yang halus. Untuk mendapatkan butiran serbuk yang relatif sama, disaring dengan saringan teh. Sebelum ditumbuk, biji kelor dibilas dahulu dengan alkohol 70% untuk menghindarkan kontaminasi. Caranya, biji-biji diletakkan pada cawan petri, kemudian dituangi alkohol 70% dan dibiarkan selama 20 menit.

Setelah itu diambil dengan pinset steril, kemudian ditumbuk pada mortar steril, lalu ditumbang dengan hati-hati sesuai dengan keperluan, yaitu 100 mg, 200 mg dan 300 mg.

## 2. Pengambilan Contoh Air (Sampel Air)

Titik pengambilan contoh air ditentukan secara acak, dengan lima titik sampling. Air diambil dengan jerigen dengan volume 5 liter yang telah disterilkan sebanyak lima buah, pengambilan sampel air dengan cara grab-sampling dengan tangan yaitu : Jerigen dipegang dengan tangan kanan pada pegangannya. Tutup jerigen dengan tangan kiri, kemudian jerigen dimasukkan dan ditekan dalam air dengan arah tegak lurus dengan permukaan air. Setelah penuh jerigen diangkat dan airnya dibuang sedikit.

### E. Cara Pemeriksaan di Laboratorium

Pemeriksaan yang dikerjakan untuk menentukan pengaruh biji kelor ialah uji bakteriologis, pH dan temperatur kemudian dilanjutkan dengan uji potensi.

#### 1. Uji bakteriologis.

Untuk menguji kualitas air secara bakteriologis, air sampel yang ada dalam lima jerigen (volume 5 liter), dicampur menjadi satu, dalam sebuah jerigen besar yang bervolume 25 liter yang telah disterilkan. Kemudian digojog agar homogen. Setelah itu air sampel dibagi-bagi dalam

botol steril volume 1 liter sebanyak 24 botol. Sebelumnya PH dan temperatur air diukur lalu dalam setiap botol dibuat suspensi serbuk biji kelor dengan konsentrasi 100 mg/lt, 200 mg/lt dan 300 mg/lt, serta 0 mg/lt sebagai kontrol. Pemeriksaan bakteriologis dikerjakan dalam tiap selang waktu, yaitu : 0 jam (segera setelah air diberi biji kelor), 8 jam dan 16 jam. Tiap selang waktu tersebut juga dilakukan pemeriksaan pH dan temperatur.

Menghitung jumlah total bakteri, dengan metode TPC, langkah-langkahnya yaitu :

- a. Membuat suatu seri pengencer dengan kelipatan 10 pada setiap konsentrasi dari suspensi sebagai berikut :
  - a.1. Diambil 1 ml sampel air dimasukkan kedalam 9 ml/aquadest steril/larutan pepton (pengenceran  $10^{-1}$ ).
  - a.2. suspensi pengenceran  $10^{-1}$  diambil 1 ml air lagi, diinokulasi kedalam 9 ml larutan pepton (pengenceran  $10^{-2}$ ). Demikian seterusnya sampai pada pengenceran  $10^{-4}$ .
- b. Membuat medium NA (*Nutrien Agar*), medium diencerkan dan disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit dengan temperatur  $121^{\circ}\text{C}$  dan tekanan 15 lbs. Kemudian didinginkan.
- c. Dari suspensi pengenceran  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  dan  $10^{-3}$  masing-masing diambil 1 ml dengan pipet ukur

steril secara aseptik; dimasukkan kedalam cawan petri. Tiap pengenceran dengan dua cawan petri (duplo) kemudian cawan tersebut dituangi medium NA yang telah agak dingin lalu digoyang dengan hati-hati, agar suspensi bahan bercampur merata dengan medium.

- d. Diinkubasi pada suhu  $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$  selama 24 jam.
- e. Sebagai kontrol, dibuat medium NA dengan larutan pepton saja, yang telah disterilkan.
- f. Jumlah koloni yang tumbuh dari masing-masing pengenceran dihitung. Kemudian dengan rumus yang ada akan dapat jumlah sel bakteri total.

Untuk menentukan populasi bakteri koliform grup digunakan metode MPN; pada tiap konsentrasi dengan langkah-langkah sebagai berikut.

#### Tahap Uji perkiraan

- a. Diambil 3 tabung, masing-masing telah diisi dengan 10 ml laktosa cair kemudian masing-masing pula diberi 1 ml suspensi dari pengenceran  $10^{-1}$ , secara aseptik.
- b. Diambil lagi 3 tabung, masing-masing diisi dengan 10 ml laktosa cair, kemudian diberi 1 ml suspensi dari pengenceran  $10^{-2}$ , dari tiap konsentrasi.
- c. Tiga tabung, masing-masing diisi 10 ml laktosa cair kemudian diberi 1 ml suspensi dari pengenceran  $10^{-3}$  secara aseptik.

- d. Sebagai kontrol digunakan laktosa cair 10 ml dalam tabung reaksi.
- e. Semua tabung diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24-48 jam.
- f. Tabung-tabung yang menunjukkan adanya pembentukan gas, berarti positif, ada bakteri koliform group.

#### Tahap Uji penegasan

- g. Diambil 1 ose dari masing - masing tabung yang menunjukkan adanya pembentukan gas, kemudian ditanam pada medium BGLB 5 ml.
- h. Diinkubasi pada temperatur 37°C dan 44°C selama 24-48 jam. Dimana adanya gas pada suhu 37°C untuk menentukan bakteri "non fecal" dan suhu 44°C untuk menentukan bakteri "fecal".
- i. Adanya gas dalam tabung BGLB, berarti tes penegasan positif.
- j. Dari tabung-tabung yang positif kemudian dicocokkan dengan tabel MPN yang sesuai dengan kombinasi penanaman dalam tabung fermentasi.

#### Tahap Uji lengkap

- k. Dari tahap penegasan, diambil tabung yang positif, kemudian ditanam pada media Endo agar dengan indikator *basic fuchsin*. Penanaman dengan cara "*strike*" yaitu menggeserkan ujung ose yang mengandung suspensi secara zig-zag diatas permukaan medium.
- i. Diinkubasi pada temperatur 37° C selama 24 jam.

- j. Koloni yang tumbuh diamati kemudian dibuat pre-parat, dengan pengecatan gram. Kemudian diamati dengan mikroskop.

Demikian, pemeriksaan TPC dan NPN dilakukan untuk tiap - tiap konsentrasi dari perlakuan.

Untuk mengidentifikasi bakteri patogen dilakukan terhadap adanya bakteri *Staphylococcus sp*, dengan cara :

- a. Diambil satu ose suspensi dari air suspensi dalam botol; pada tiap konsentrasi; dan ditanam pada medium MSA yang telah disiapkan. Penanaman dilakukan dengan cara "strike".
- b. Diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24 jam.
- c. Koloni yang timbul dan dicurigai sebagai koloni *Staphylococcus sp*, diambil dengan ose, kemudian dibuat preparat dengan pewarnaan gram.
- d. Diamati dengan mikroskop.

## 2. Uji Potensi (Kerentanan).

Biji kelor yang telah tua ditumbuk halus kemudian diayak dengan saringan teh yang telah disterilkan. Kemudian ditimbang masing - masing 50 mg, 100 mg dan 150 mg, sebagai pembanding digunakan alkohol 70 %.

Disiapkan aquades steril dalam erlenmeyer steril, masing - masing dalam volume 500 ml,



kemudian serbuk biji kelor dimasukkan, sehingga terbentuk suspensi dengan konsentrasi 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml dan 0,3 mg/ml. Digojog selama 15 menit. Kemudian dilakukan pengujian, dengan metode difusi, yaitu :

- a. Dibuat medium nutrisi agar dalam tabung erlenmeyer, kemudian disterilkan, setelah itu medium dituang pada cawan petri.
- b. Diambil 1 ml kultur murni bakteri; *Escherichia coli* dan yang telah diencerkan dan berumur 24 jam, kemudian ditanam dalam cawan petri yang berisi medium NA, secara taburan.
- c. Untuk tiap cawan petri dibagi 4 zona; bagi tiap konsentrasi. Kemudian pada tiap zona diletakkan silinder dengan diameter 1 cm.
- d. Dengan menggunakan mikropipet ukuran 100  $\mu$ l, pada tiap - tiap tengah silinder diisi dengan cairan suspensi ( ekstrak ) dari biji kelor tersebut.
- e. Diinkubasi pada suhu 24°C selama 24 jam dan kemudian diamati dan diukur daerah hambatnya. Pengamatan dan pengukuran dilakukan tiga kali, yaitu tepat setelah 24 jam dari inkubasi; lalu setelah 8 jam dan 16 jam dari inkubasi.
- f. Semua cara diatas diulangi dengan menggunakan bakteri uji *Bacillus subtilis*.
- g. Untuk memperoleh hasil yang meyakinkan, dilakukan ulangan sebanyak 3 kali.

Kemudian dibuat pula ekstrak biji kelor dengan konsentrasi 10 mg/ml, 5 mg/ml dan 2,5 mg/ml, masing - masing digojog selama 15 menit, kemudian didiamkan selama 24 jam dalam suhu ruang. Setelah itu dilakukan pengujian dengan metode difusi seperti diatas.

#### F. Rancangan Percobaan dan Metode Analisis

Dalam penelitian ini digunakan rancangan acak kelompok faktorial ( RAKF ). Pengelompokan dilakukan pada setiap ulangan perlakuan. Karena pada setiap pemeriksaan perlakuan dari tiap sampel memerlukan waktu, sehingga memungkinkan perbedaan yang sangat nyata pada setiap ulangan perlakuan, sebab umumnya bakteri berkembang cepat pada waktu singkat. Jadi RAKF ini digunakan untuk memperkecil kesalahan pada setiap pemeriksaan ; pada setiap perlakuan; karena perbedaan waktu yang menyolok. Rancangan ini dapat digambarkan sebagai berikut :

Kelompok I				Kelompok II			
K0t0	K1t0	K2t0	K3t0	K0t0	K1t0	K2t0	K3t0
K0t8	K1t8	K2t8	K3t8	K0t8	K1t8	K2t8	K3t8
K0t16	K1t16	K2t16	K3t16	K0t16	K1t16	K2t16	K3t16

dimana :

Kntm = Konsentrasi sebanyak-n dan waktu kontak ke-m

## Keterangan :

K0t0 = Konsentrasi 0 dan waktu kontak 0 jam(kontrol)  
K1t0 = Konsentrasi 100 mg/lt dan waktu kontak 0 jam  
K2t0 = Konsentrasi 200 mg/lt dan waktu kontak 0 jam  
K3t0 = Konsentrasi 300 mg/lt dan waktu kontak 0 jam  
K1t8 = Konsentrasi 100 mg/lt dan waktu kontak 8 jam  
K2t8 = Konsentrasi 200 mg/lt dan waktu kontak 8 jam  
K3t8 = Konsentrasi 300 mg/lt dan waktu kontak 8 jam  
K1t16= Konsentrasi 100 mg/lt dan waktu kontak 16 jam  
K2t16= Konsentrasi 200 mg/lt dan waktu kontak 16 jam  
K3t16= Konsentrasi 300 mg/lt dan waktu kontak 16 jam



Kemudian data hasil percobaan, dapat disajikan dalam 2 bentuk, yaitu :

- Menurut kelompok x perlakuan.
- Menurut kombinasi faktor A dan faktor B.

Tabel a. Menurut kelompok x perlakuan.

Perlakuan		Kelompok		$\Sigma AB$	YAB
Faktor A	Faktor B	1	2		
$A_0$	$B_0$	$Y_{100}$	$Y_{200}$	$\Sigma A_0 B_0$	$Y A_0 B_0$
	$B_1$	$Y_{101}$	$Y_{201}$	$\Sigma A_0 B_1$	$Y A_0 B_1$
	$B_2$	$Y_{102}$	$Y_{202}$	$\Sigma A_0 B_2$	$Y A_0 B_2$
$A_1$	$B_0$	$Y_{110}$	$Y_{210}$	$\Sigma A_1 B_0$	$Y A_1 B_0$
	$B_1$	$Y_{111}$	$Y_{211}$	$\Sigma A_1 B_1$	$Y A_1 B_1$
	$B_2$	$Y_{112}$	$Y_{212}$	$\Sigma A_1 B_2$	$Y A_1 B_2$
$A_2$	$B_0$	$Y_{120}$	$Y_{220}$	$\Sigma A_2 B_0$	$Y A_2 B_0$
	$B_1$	$Y_{121}$	$Y_{221}$	$\Sigma A_2 B_1$	$Y A_2 B_1$
	$B_2$	$Y_{122}$	$Y_{222}$	$\Sigma A_2 B_2$	$Y A_2 B_2$
$A_3$	$B_0$	$Y_{130}$	$Y_{230}$	$\Sigma A_3 B_0$	$Y A_3 B_0$
	$B_1$	$Y_{131}$	$Y_{231}$	$\Sigma A_3 B_1$	$Y A_3 B_1$
	$B_2$	$Y_{132}$	$Y_{232}$	$\Sigma A_3 B_2$	$Y A_3 B_2$
$\Sigma$ Kelompok		$\Sigma K_1$	$\Sigma K_2$	$\Sigma T_{ijk}$	$\Sigma Y_{ijk}$

Tabel b. Menurut Kombinasi faktor AB.

Faktor B	Faktor A				$\Sigma B$	YB
	$A_0$	$A_1$	$A_2$	$A_3$		
$B_0$	$A^0 B^0$	$A^1 B^0$	$A^2 B^0$	$A^3 B^0$	$\Sigma A^i B^0$	$Y A^i B^0$
$B_1$	$A^0 B^1$	$A^1 B^1$	$A^2 B^1$	$A^3 B^1$	$\Sigma A^i B^1$	$Y A^i B^1$
$B_2$	$A^0 B^2$	$A^1 B^2$	$A^2 B^2$	$A^3 B^2$	$\Sigma A^i B^2$	$Y A^i B^2$
$\Sigma A$	$\Sigma A^0 B^i$	$\Sigma A^1 B^i$	$\Sigma A^2 B^i$	$\Sigma A^3 B^i$	$\Sigma A^{ij} B^{ij}$	
YA	$Y A^0 B^i$	$Y A^1 B^i$	$Y A^2 B^i$	$Y A^3 B^i$	$(T^{ijk})$	

Tabel Anova.

SK	db	KT	Fhit
Kelompok	$r - 1$	$JKK / (r - 1)$	$KTK / E$
Kombinasi	$kp - 1$	$JKK \text{ Kom} / (kp - 1)$	$KT \text{ Kom} / E$
- Faktor A	$m - 1$	$JKA / (m - 1)$	$KTA / E$
- Faktor B	$n - 1$	$JKB / (n - 1)$	$KTB / E$
- Interaksi	$(m - r)(n - 1)$	$JKIn / (m - 1)(n - 1)$	$KTI / E$
Galat	$v = Vr - (r - 1) - (kp - 1)$	$JKG / V$	
TOTAL	=		

