

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

3.1.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian adalah *Quasi Experiment*. Penelitian ini menggambarkan mengenai angka kuman pada *infused water* buah limau kuit (*C.hystrix DC.*) dan jeruk nipis (*C.aurantifolia*) dengan *Total Plate Count* (TPC). Penelitian dilakukan untuk memahami pengaruh dari akibat adanya perlakuan, tetapi tidak bisa untuk mengontrol variabel lain yang memengaruhi eksperimen.

3.1.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian *One Group Pretest-Posttest Design*, melalui pengumpulan sampel yang diukur (*pretest*), kemudian perlakuan dan pengukuran (*posttest*). Dengan cara pertama dilakukan pengambilan sampel, pengukuran sampel sebelum disimpan untuk diperiksa (*pretest*). Setelah penyimpanan pada suhu ruang selama 6 jam, 12 jam, 24 jam, 36 jam, hingga 48 jam kemudian dilakukan pengukuran (*posttest*).

3.2 Bahan dan Jumlah Pengulangan

Bahan yang digunakan, yaitu *infused water* buah limau kuit dan jeruk nipis. Dengan suhu penyimpanan digunakan adalah suhu ruang. Perlakuan untuk *infused water* dikelompokkan menjadi 6 perlakuan yaitu sebelum dilakukan penyimpanan selama 0 jam, setelah dilakukan penyimpanan selama 6, 12, 24, 36 hingga 48 jam,

dengan kontrol (air mineral tanpa dimasukkan buah limau kuit dan jeruk nipis) untuk setiap perlakuan. Dengan melakukan 2 kali pengulangan setiap perlakuan.

3.3 Variabel dan Definisi Operasional

3.3.1 Variabel

a. Variabel Bebas (*Independent Variable*)

Lama penyimpanan *infused water* buah limau kuit dan jeruk nipis.

b. Variabel Terikat (*Dependent Variable*)

Jumlah angka kuman pada *infused water* buah limau kuit dan jeruk nipis.

3.3.2 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Skala Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur
1	Lama Penyimpanan	Waktu yang digunakan untuk penyimpanan minuman <i>infused water</i> limau kuit dan jeruk nipis selama 0, 12, 24, 36, hingga 48 jam dalam suhu ruang.	Rasio	Stopwatch	Jam
2	Jumlah Angka Kuman	Jumlah angka kuman pada <i>infused water</i> limau kuit dan jeruk nipis yang ditentukan menggunakan metode TPC	Rasio	Colony Counter	CFU/ml
3	Uji Metabolit Sekunder	Skrining fitokimia kandungan	Nominal	Visual	Positif (+)

metabolit sekunder pada limau kuit dan jeruk nipis	Negatif (-)
--	-------------

Tabel 3.1 Definisi Operasional

3.4 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan ialah: air mineral, limau kuit, jeruk nipis, aquadest, NaCl fisiologis 0,9%, media *Plate Count Agar* (PCA), dan spritus, reagen dragendroff, reagen wagner, reagen mayer, HCl, magnesium, FeCl₃ 1%, magnesium dan H₂SO₄.

3.5 Instrumen Penelitian

Alat dalam penelitian ini, yaitu inkubator, erlenmeyer, pipet ukur, bola hisap, klinipet, blue tip, tabung reaksi, rak tabung reaksi, neraca analitik, oven, autoklaf, gelas ukur, beaker glass, kaca arloji, *hot plate*, batang pengaduk, lampu spiritus, cawan petri dan *colony counter*.

3.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.6.1 Lokasi

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Klinik dan Kesehatan Universitas Borneo Lestari.

3.6.2 Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei 2024.

3.7 Prosedur Pengambilan Data

3.7.1 Izin Penelitian

Dimulai dari meminta surat izin penelitian di Kampus Universitas Borneo Lestari Fakultas Ilmu Kesehatan dan Sains Teknologi program studi Diploma III Analis Kesehatan, selanjutnya surat dilengkapi dengan meminta tanda tangan dosen pembimbing, kepala laboratorium, dan kepala depo Universitas Borneo Lestari, kemudian menyerahkan surat ke bagian depo, mahasiswa dinyatakan sudah terdaftar jika mendapatkan kartu merah dari depo dan telah menerima arahan dari petugas depo.

3.7.2 Prosedur Kerja

A. Sterilisasi Instrumen Penelitian

1. Dicuci terlebih dahulu instrumen yang akan disterilkan
2. Instrumen dibungkus menggunakan aluminium foil
3. Dimasukkan instrumen yang sudah dibungkus aluminium foil ke dalam oven
4. Instrumen disterilkan pada oven dengan suhu 180°C selama 1 jam
5. Instrumen dikeluarkan jika proses sterilisasi sudah selesai

B. Pembuatan Media *Plate Count Agar* (PCA)

1. Alat dan bahan disiapkan.
2. Media PCA sebanyak 22,5gram kemudian dilarutkan dengan aquadest 1liter dalam erlenmeyer

3. Media dipanaskan menggunakan *hotplate* lalu diaduk sampai homogen, tunggu hingga mendidih
4. Media disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dipertahankan selama 15 menit
5. Media dapat untuk digunakan

C. Persiapan Media Pengenceran

1. Menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan.
2. NaCl fisiologis 0,9% dipipet setakar 9 ml ke tabung reaksi
3. Tabung ditutup dengan kapas dan bungkus dengan
4. Sterilisasi NaCl fisiologis 0,9% memakai autoklaf bersuhu 121°C dipertahankan selama 15 menit
5. Media pengenceran dapat digunakan

D. Pembuatan *Infused Water*

1. Dipilih buah limau kuit dan jeruk nipis yang baik, yaitu yang masih segar dan berwarna hijau.
2. Kemudian buah limau kuit dan jeruk nipis dicuci menggunakan bahan aseptis yang digunakan untuk mencuci buah dan sayuran
3. Buah limau kuit dan jeruk nipis dibilas dengan air yang steril
4. Buah dikeringkan dengan tisu
5. Dipotong buah limau kuit dan jeruk nipis tanpa mengupas kulitnya
6. Ditimbang masing-masing sebanyak 100gram buah limau kuit dan jeruk nipis

7. Dimasukkan kedalam botol air mineral yang berisi air sebanyak 500 ml, ini dibuat masing-masing sebanyak 6 botol, sehingga total *infused* yang dibuat berjumlah 12 botol
8. Botol ditutup dengan rapat, label diberikan pada tiap-tiap perlakuan dan diletakkan sesuai kelompok perlakuan
9. Perlakuan ini dikelompokkan menjadi 6 kelompok masing-masing sesuai tabel di bawah:

Tabel 3.2 Pembuatan *Infused Water*

Limau kuit			Jeruk Nipis		
Lama simpan	Pengulangan		Lama simpan	Pengulangan	
0 Jam	I	II	0 Jam	I	II
6 Jam	I	II	6 Jam	I	II
12 Jam	I	II	12 Jam	I	II
24 Jam	I	II	24 Jam	I	II
36 Jam	I	II	36 Jam	I	II
48 Jam	I	II	48 Jam	I	II

10. Masing- masing perlakuan di simpan pada suhu ruang
11. Nilai suhu terakhir dicatat sesuai lama penyimpanan

E. Prosedur Pemeriksaan *Total Plate Count* (TPC)

1. Disiapkan alat dan bahan yang akan digunakan terlebih dahulu
2. Pengenceran sampel dilakukan sesuai perlakuan dengan NaCl fisiologis 0,9% steril, sesuai tabel 3.2

Tabel 3.3 Pengenceran *Total Plate Count* (TPC)

Pengenceran	Banyak sampel	NaCl 0,9%
10^{-1}	1 ml sampel	9 ml
10^{-2}	1 ml sampel dari 10^{-1}	9 ml
10^{-3}	1 ml sampel dari 10^{-2}	9 ml
10^{-4}	1 ml sampel dari 10^{-3}	9 ml

3. Dipipet masing-masing sebanyak 1 ml sampel sesuai dengan pengenceran kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri steril sebagai pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , dan 10^{-4}
4. Dituangkan media PCA sebanyak 15 ml ke cawan sampel, lalu digoyangkan membentuk angka 8 dengan hati-hati hingga homogen
5. Media didiamkan hingga memadat
6. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam
7. Koloni kuman yang tumbuh dihitung *colony counter*, perhitungan terhadap cawan petri dengan jumlah koloni bakteri antara 30 sampai 300 (Sundari dan Fadhliani, 2019).

Dengan rumus perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Nilai TPC (CFU/ml)} = \frac{(\sum \text{koloni kuman-kontrol}) \times \text{pengenceran}}{\sum \text{cawan petri yang di hitung}}$$

F. Uji Kandungan Metabolit Sekunder

1. Uji Alkaloid

Dipipet sebanyak 5 ml masing-masing sampel ke dalam 3 tabung reaksi. Tabung 1 ditetaskan 1-5 tetes reagen dragendroff. lalu tabung 2 ditetaskan 1-5 tetes reagen mayer. terakhir tabung 3 ditetaskan reagen wagner. Positif alkaloid bila reagen dragendroff

dengan hasil endapan dengan warna jingga, reagen mayer putih, dan reagen wagner coklat.

2. Uji Flavonoid

Sampel dipipet sebanyak 2 ml lalu dimasukkan dalam tabung reaksi. lalu tambah 0,1 gr magnesium dan 5 tetes HCl. Positif flavonoid bila warna berubah menjadi merah/kuning/jingga.

3. Uji Saponin

Sampel dipipet sebanyak 5 ml lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi. Tambahkan 5 ml aquades, kemudian kocok kuat 5 menit. Positif saponin jika buih tetap bertahan hingga 5 menit.

4. Uji Tanin

Dipipet sebanyak 5 ml sampel lalu ke tabung reaksi. Kemudian tambahkan FeCl_3 1% akan Positif mengandung tanin bila warna berubah kebiruan atau hijau.

5. Uji Terpenoid

Dipipet sebanyak 5 ml sampel lalu masukkan ke tabung reaksi. Ditambah 2 ml kloroform dan 3ml H_2SO_4 . Positif mengandung terpenoid bila warna merah kecoklatan pada batas antara dua fase.

G. Uji Fisik

1. Bau

Dituangkan *infused water* ke dalam tabung reaksi, lalu bau yang ada dibandingkan dengan standar. Pengujian dilakukan ke seluruh

sampel yang telah disimpan sesuai jam yang digunakan. Hasil dicatat sesuai lama penyimpanan.

2. Rasa

Dituangkan *infused water* yang telah dilakukan perlakuan ke dalam gelas, dilakukan penilaian rasa dan dicatat hasilnya.

3. Tingkat Kekeruhan

Amati kekeruhan *infused water* lalu bandingkan dengan standar. Pengujian ini dilakukan pada seluruh sampel yang telah disimpan sesuai jam yang digunakan. Hasil dicatat sesuai perlakuan.

3.8 Pengumpulan Data

3.8.1 Data Primer

Primer merupakan data yang didapatkan dari hasil pemeriksaan jumlah angka kuman pada *infused water* limau kuit dan jeruk nipis sebelum dan sesudah dilakukan penyimpanan pada suhu ruang.

3.9 Cara Pengolahan dan Analisa Data

3.9.1 Cara pengolahan Data

Dari hasil hitung angka kuman dikumpulkan, lalu dilakukan pengelolaan data menurut perlakuan yang digunakan, kemudian melakukan tabulasi data, dengan menyusun data dalam bentuk tabel dan diagram untuk memudahkan dalam penjumlahan data hasil.

3.9.2 Analisa Data

Analisa data menggunakan *Microsoft excel* dan *software IBM SPSS*. Untuk melihat perbandingan lama penyimpanan *infused water* terhadap jumlah angka kuman, dilakukan uji normalitas data. Berdasarkan jumlah data pada penelitian ini data <50 , maka uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* demi memahami, apakah distribusi data normal. Dasar pengambilan keputusan adalah jika nilai signifikansi (Sig.) $>0,05$ data tersebut berdistribusi normal dan nilai signifikansi (Sig.) $<0,05$ data tersebut tidak berdistribusi normal.

Selain uji normalitas juga dilakukan uji homogenitas data. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui apakah sama atau tidaknya beberapa variasi. Uji kesamaan dua varian yang menguji apakah sebaran data tersebut homogen atau tidak. Data dikatakan homogen bila nilai signifikansi (p) $>0,05$, apabila data $<0,05$ maka distribusi data dinyatakan tidak homogen

Uji *Kruskall Wallis* merupakan uji nonparametrik, uji ini dilakukan untuk menentukan apakah ada pengaruh lama penyimpanan terhadap angka kuman. Uji *Kruskall Wallis* dapat dilakukan jika sebaran data tidak berdistribusi normal. Dasar keputusan yaitu, bila nilai signifikansi $<0,05$ maka terdapat pengaruh lama penyimpanan terhadap angka kuman, dan bila signifikansi $>0,05$ dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat pengaruh lama penyimpanan terhadap angka kuman.