

## **BAB 3**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian**

##### **3.1.1 Jenis Penelitian**

Jenis metode penelitian yang diterapkan adalah penelitian Deskriptif, yang bertujuan untuk menggambarkan tingkat kehadiran bakteri Gram positif dan Gram negatif di sarang burung walet yang sedang dibudidayakan di Desa Bahaur Hilir.

##### **3.1.2 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan metode desain studi cross-sectional untuk mengevaluasi tingkat cemaran bakteri. Sampel sarang burung walet diambil dan dibawa langsung ke laboratorium untuk identifikasi bakteri.

#### **3.2 Populasi dan Sampel**

##### **3.2.1 Populasi**

Populasi yang diteliti terdiri dari sarang burung walet yang dipelihara, dengan total 2 bangunan yang memiliki 4 lantai.

##### **3.2.2 Sampel**

Penelitian ini melibatkan sarang burung walet yang ditemukan di gedung-gedung dengan tingkat yang bervariasi, dengan total delapan sampel sarang yang diamati.

#### **3.3 Variabel Penelitian**

##### **3.3.1 Variabel**

Variabel yang diteliti adalah tingkat kehadiran bakteri Gram positif dan Gram negatif dalam sarang burung walet di Desa Bahaur Hilir.

### 3.4 Definisi Operasional

14  
Tabel 3.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala	Hasil ukur
Cemaran bakteri	Ditemukannya bakteri pada media kultur dan dilakukan pengecatan Gram yang diamati secara mikroskopis.	Mikroskop	Nominal	1.Gram positif(+) 2.Gram negatif (-)

### 3.5 Instrumen

#### 3.5.1 Alat

Alat yang digunakan berupa, spatula, sarung tangan kain, cawan petri, label, timbangan digital, autoklaf, inkubator, ose, pipet, mikroskop, jas lab, sepatu lab, kaca objek, gelas ukur, *cool box*, tabung reaksi dan *hot plate*.

#### 3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu, sarang burung walet, *Natrium chloride* (NaCl) 0,9%, aquadest steril, alkohol 96%, oil imersi, *lugol*, *safranin*, *gentian violet*, *Mannitol Salt Agar* (MSA) dan media *Mac Conkey Agar* (MCA), plastik steril, masker, *handscoon*, *nurse cap*, kapas lidi dan korek api.

### 3.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Tempat pengambilan sampel swab sarang burung walet dilakukan di salah satu gedung burung walet yang berada di Desa Bahaur Hilir dan tahap pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Borneo Lestari, penelitian akan dilakukan pada bulan April 2024.

### **3.7 Prosedur Pengambilan Data**

#### 3.7.1 Izin penelitian

Pada penelitian ini izin penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Borneo Lestari dengan melengkapi berbagai berkas dan dilanjutkan dengan meminta surat ke pihak kampus untuk izin penelitian.

#### 3.7.2 Prosedur kerja

##### 1. Pengambilan sarang burung walet putih

Sebelum memasuki gedung burung walet memakai alat pelindung diri yaitu memakai masker, baju lengan panjang, celana panjang, sarung tangan kain, dan sepatu. Saat memasuki jangan membuat keributan agar burung di dalam tidak stres dan tidak merasa adanya ancaman yang masuk ke dalam gedung, pilih sarang yang berbentuk mangkok untuk diambil dan menggunakan spatula untuk mengambil sarang burung walet dengan mengikis bagian belakang sarang dengan perlahan agar sarang tidak rusak, setelah sarang didapatkan masukan ke dalam plastik steril lalu bawa keluar gedung dan segera masukan ke dalam ice box untuk menjaga kestabilan suhu. Membawa sarang menuju laboratorium secepat mungkin untuk diidentifikasi.

## 2. Sterilisasi alat dan bahan

Sterilisasi alat ada 2 cara kerja yaitu sterilisasi basah untuk bahan-bahan (autoclave) dan sterilisasi kering untuk alat (oven).

### A. Autoclave

- a. Diperiksa banyaknya air (aqua destilata) dalam autoclave agar berada pada batas yang ditentukan.
- b. Dimasukkan bahan media yang akan disterilisasi.
- c. Ditutup autoclave dengan rapat lalu kencangkan baut pengaman agar tidak ada uap yang keluar dari bibir autoclave.
- d. Dihubungkan stop kontak dengan sumber tenaga listrik.
- e. Dinyalakan tombol power ke posisi “ON” lalu putar pengaturnya ke kiri sampai pada angka 7 hingga mencapai 121°C dan pertahankan hingga 15 menit.
- f. Ditunggu sampai air mendidih dan uapnya terdesak keluar dari klep pengaman tutup kembali pastikan tanda panah searah dengan garis lalu putar putaran secara berlawanan, dan tutup katupnya.
- g. Diamati penanda tekanan, hitung waktu sterilisasi sejak tekanan mencapai 2 atm.
- h. Ditunggu kompartemen turun hingga sama dengan tekanan udara di lingkungan (jarum menunjuk ke angka nol).
- i. Dimatikan dan putar kembali kekanan sampai habis. Buka tutup perlahan-

lahan mengurangi panas yang ada, kemudian buka tutup dengan perlahan.

j. Dikeluarkan isi autoclave dengan hati-hati.

#### B. Oven

a. Dihubungkan oven dengan sumber listrik.

b. Ditekan tombol “ON” dan tunggu beberapa saat hingga display muncul.

c. Disesuaikan timer dengan kebutuhan dan tunggu hingga suhu menyala.

d. Dibungkus alat menggunakan kertas atau alumunium.

e. Diletakan alat di dalam oven

f. Ditunggu hingga proses pengovenan selesai.

### 3. Pembuatan media MSA (*Mannitol Salt Agar*) dan MCA (*Macconkey Agar*)

#### A. Media *Mannitol Salt Agar* (MSA)

a. Disiapkan alat dan bahan yang digunakan.

b. Diambil media *Mannitol Salt Agar*, kemudian timbang di neraca analitik menggunakan kaca arloji sebanyak 50 gr.

c. Dimasukan media ke dalam erlenmeyer lalu larutkan dengan aquades 450 ml.

d. Diaduk dengan menggunakan spatula lalu panaskan di *hot plate* sampai mendidih untuk melarutkan media.

e. Disterilkan dengan autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit.

f. Ditunggu suhu sampai hangat (45°C-50°C) lalu homogenkan.

g. Dituang ke dalam cawan petri steril sebanyak  $\pm 15$  ml.

#### B. Media *Macconkey Agar* (MCA)

a. Disiapkan semua alat dan bahan yang digunakan.

b. Diambil media *Macconkey Agar*, kemudian timbang di neraca analitik menggunakan kaca arloji sebanyak 22 gr.

c. Dimasukkan media ke dalam erlenmeyer lalu larutkan dengan aquades 450 ml.

d. Diaduk dengan spatula lalu panaskan di *hot plate* sampai mendidih untuk melarutkan media.

e. Disterilkan dengan autoclave dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit.

f. Ditunggu suhu sampai hangat ( $45^{\circ}\text{C}$ - $50^{\circ}\text{C}$ ) lalu homogenkan.

g. Dituangkan ke dalam cawan petri steril sebanyak  $\pm 15$  ml.

#### 4. Pemiakan

a. Disiapkan semua alat dan bahan yang akan digunakan.

b. Diambil sampel sarang burung walet dari tabung yang berisi NaCl yang telah di swab menggunakan swab steril menggunakan ose steril.

c. Dioleskan sampel menggunakan ose steril ke atas media MSA (*Mannitol Salt Agar*) dan media MCA (*Macconkey Agar*).

d. Diinkubasi media pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam.

#### 5. Interpretasi hasil

**Tabel 3.2 Interpretasi Hasil Bakteri Gram Positif Pada Media MSA**

No	Bakteri Gram Positif Terduga	Ciri Koloni
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	Berbentuk bundar, halus, dan berwarna kuning muda hingga emas
2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Berbentuk bulat cembung berwarna cream
3	<i>Streptococcus sp</i>	Berbentuk bulat tidak beraturan atau seperti bintik

**Tabel 3.3 Interpretasi Hasil Bakteri Gram Negatif Pada Media MCA**

No	Bakteri Gram Negatif Terduga	Ciri Koloni
1	<i>Escherichia coli</i>	Koloni berwarna merah, keruh, halus, sedang sampai besar, dan cembung
2	<i>Klebsiella sp</i>	Koloni berwarna merah muda, mukoid, cembung, tepian rata, bulat, dan koloni besar
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Koloni berwarna transparan atau kuning pucat, cembung rendah, mukoid, dan halus
4	<i>Proteus sp</i>	Koloni berwarna merah muda, sedang sampai besar, dan kasar menjalar

6. Identifikasi bakteri pewarnaan Gram metode Gram Stain.
  - a. Disiapkan semua alat dan bahan.
  - b. Dinyalakan api bunsen kemudian mensterilkan biakan bakteri dengan cara memutar cawan petri diatas api bunsen.
  - c. Disterilkan ose dengan memanaskannya sampai merah.

- d. Diambil biakan bakteri menggunakan ujung ose secukupnya.
  - e. Diletakkan pada preparat dengan cara melingkar, usahakan tidak menumpuk dan terlihat merata.
  - f. Dikeringkan preparat pada api bunsen dengan cara melewatkan, tunggu sampai mengering.
  - g. Dimatikan api bunsen dengan menutupnya kembali.
  - h. Diteteskan pewarnaan gentian violet sampai menutupi permukaan preparat menggunakan pipet tetes diamkan selama 3 menit.
  - i. Diteteskan preparat dengan aquadest, kemudian meneteskan lugol sampai menutupi permukaan preparat menggunakan pipet tetes lalu diamkan selama 1 menit.
  - j. Dibilas preparat dengan aquadest, lalu mengalirkan alkohol 96% sampai zat warna luntur kemudian dicuci dengan aquadest.
  - k. Diteteskan safranin sampai menutupi permukaan preparat menggunakan pipet tetes diamkan selama 2 menit, kemudian preparat dicuci dengan aquadest dan keringkan.
  - l. Diamati preparat diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x menggunakan oil imersi.
7. Interpretasi hasil

**Tabel 3.4 Interpretasi Hasil Bakteri Gram Positif Dibawah Mikroskop**

NO	Bakteri Gram Positif Terduga	Ciri Mikroskopis Sel Bakteri
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	Berbentuk bulat, struktur seperti buah anggur dengan diameter 0,7-1,2 mikrometer
2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Berbentuk bulat, struktur bulat berkelompok tidak teratur dengan ukuran diameter 0,5 – 1,5 mikrometer
3	<i>Streptococcus sp</i>	Berbentuk bulat dan biasanya tersusun dalam rantai, diameter selnya berkisar antara 0,5 hingga 1,0 mikrometer

**Tabel 3.5 Interpretasi Hasil Bakteri Gram Negatif Dibawah Mikroskop**

NO	Bakteri Gram Negatif Terduga	Ciri Bakteri
1	<i>Escherichia coli</i>	<u>Memiliki bentuk batang (bacillus), struktur batang pendek tidak teratur dan biasanya berukuran sekitar 2-6 mikrometer</u>
2	<i>Klebsiella sp</i>	Merupakan bakteri berbentuk batang, struktur batang yang berkapsul, memiliki ukuran sebesar 0,5-0,5 x 1,2 mikrometer
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Struktur batang tunggal dan kadang dalam rantai pendek mempunyai ukuran sedang (0,5-1 $\mu\text{m}$ $\times$ 1,5-5 $\mu\text{m}$ )
4	<i>Proteus sp</i>	Berbentuk batang, struktur membentuk rantai atau berpasangan berukuran 0,4-0,8 x 1.0- 0,3 mikrometer

### 3.8 Cara Pengelolaan dan Analisa Data

#### 3.8.1 Pengelolaan Data

Data yang dihasilkan dari penelitian ini dikumpulkan dan diproses dengan menggunakan metode pengolahan data, baik dalam format tabel maupun narasi.

### 3.8.2 Analisa Data

Analisa data yang dilakukan dalam penelitian ini adalah dengan mendeskripsikan cemaran bakteri yang ditemukan pada sarang burung walet dengan rumus yaitu

$$\text{Persentase (\%)} = \frac{\text{Jumlah positif}}{16} \times 100\%$$

