

## BAB 3

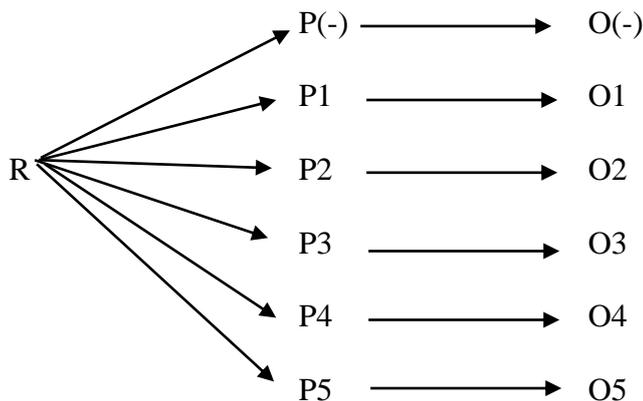
### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorium dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh rebusan daun duwet (*Syzygium cumini* Linn) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*.

#### 3.2 Rancangan Penelitian

Berdasarkan hasil uji pendahuluan pengaruh rebusan daun duwet (*Syzygium cumini* Linn) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* dengan konsentrasi 0%, 25%, 50%, 75%, 100% diperoleh hasil konsentrasi 0%, 25% terdapat pertumbuhan kuman dan konsentrasi 50%, 75%, 100% tidak terdapat pertumbuhan kuman maka diambil konsentrasi 45%, 40%, 35%, 30% sebagai lanjutan dari penelitian tentang pengaruh rebusan daun duwet (*Syzygium cumini* Linn) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* ini.



**Gambar 3.2.1 Desain Penelitian ( Zainuddin, 2003)**

Keterangan :

R : Random

P(-) : Perlakuan yang tidak diberi rebusan daun duwet (kontrol)

P1 : Perlakuan konsentrasi rebusan daun duwet 30%

P2 : Perlakuan konsentrasi rebusan daun duwet 35%

P3 : Perlakuan konsentrasi rebusan daun duwet 40%

P4 : Perlakuan konsentrasi rebusan daun duwet 45%

P5 : Perlakuan konsentrasi rebusan daun duwet 100%

O(-) : Observasi perlakuan kontrol

O1 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 30%

O2 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 35%

O3 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 40%

O4 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 45%

O5 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 100%

### **3.3 Populasi dan Sampel Penelitian**

#### **3.3.1 Populasi Penelitian**

Dalam penelitian ini populasinya adalah biakan kuman *Escherichia coli* yang didapat dari BBLK (Balai Besar Laboratorium Kesehatan) Surabaya

#### **3.3.2 Sampel Penelitian**

Dalam penelitian ini, sampelnya adalah suspensi kuman *Escherichia coli*.

Jumlah pengulangan sampel diperoleh dengan rumus sebagai berikut :

$$(t - 1) (r - 1) \leq 15$$

$$(t - 1) (6 - 1) \leq 15$$

$$(t - 1) (5) \leq 15$$

$$5t - 5 \leq 15$$

$$5t \geq 5 + 5$$

$$t \geq 20/5$$

$$t \geq 4 \text{ ( Soekidjo Notoatmodjo, 2005)}$$

Keterangan :

t : Banyak kelompok perlakuan

r : Replikasi

Jadi sampel penelitian ini dilakukan sebanyak 4 kali pengulangan untuk setiap perlakuan sehingga seluruh unit percobaan sebanyak 24 kali percobaan.

### **3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian**

#### **3.3.1 Lokasi Penelitian**

Lokasi penelitian dilakukan di Surabaya, sedangkan pemeriksaan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

#### **3.3.2 Waktu Penelitian**

Waktu penelitian dilakukan pada bulan November 2014 sampai Mei 2015, sedangkan waktu pemeriksaan dilakukan pada tanggal 4 Februari sampai 19 Februari 2015.

### 3.4 Variabel dan Definisi Operasional

#### 3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas	: Rebusan daun duwet ( <i>Syzygium cumini</i> Linn)
Variabel terikat	: Pertumbuhan <i>Escherichia coli</i>
Variabel Kontrol	: Lama inkubasi, suhu, jumlah suspensi kuman <i>Escherichia coli</i>

#### 3.4.2 Definisi Operasional Variabel

1. Rebusan daun duwet didapatkan dari 100 gr daun duwet (*Syzygium cumini* Linn) dengan 100 ml air, kemudian direbus dengan suhu 90° C selama 15 menit. Rebusan daun duwet (*Syzygium cumini* Linn) dikategorikan menjadi berbagai konsentrasi 0%, 30%, 35%, 40%, 45%, 100%.
2. Pertumbuhan *Escherichia coli* ditetapkan berdasarkan jumlah koloni kuman *Escherichia coli* yang tumbuh setelah inkubasi selama 24 jam 37°C pada media EMB (*Eosine Methyline Blue*) .

### 3.5 Metode Pengumpulan Data

Data pertumbuhan *Escherichia coli* diperoleh dengan cara observasi tidak langsung, yaitu dengan uji Laboratorium. Pemeriksaan daya hambat kuman *Escherichia coli* ini menggunakan metode Pengenceran. Langkah-langkah pemeriksaanya diantaranya sebagai berikut :

#### 3.5.1 Prinsip Pemeriksaan

Senyawa antibakteri diencerkan hingga diperoleh beberapa konsentrasi, kemudian masing-masing konsentrasi ditambahkan suspensi kuman uji dalam media cair. Perlakuan tersebut akan di inkubasi dan diamati ada atau tidaknya pertumbuhan kuman yang ditandai dengan terjadinya kekeruhan. Larutan uji

senyawa antibakteri ada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan bakteri uji, ditetapkan sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM) atau MIC (*Minimum inhibition concentration*) (Pratiwi, 2008)

### 3.5.2 Alat-alat

1. Timbangan
2. Tabung reaksi
3. Rak tabung reaksi
4. Ose standart
5. Pipet Ukur
6. Labu Erlenmeyer
7. Lampu bunsen
8. Petridish
9. Pushball
11. Beaker glass
12. Autoclave
13. Gelas arloji
14. Kaki tiga
15. Tabung centrifuge
16. Pengaduk
17. Incubator
18. Kasa
19. Kertas saring

### 3.5.3 Bahan-bahan

1. Rebusan daun duwet (*Syzygium cumini Linn*)
2. Suspensi *Escherichia coli* ATCC 25922
3. Aquadest steril
4. Pz steril
5. Media : NaCl Broth dan EMB

### 3.5.4 Reagen

1. NaOH 0,1 N
2. HCL 0,1 N
3. BaCl<sub>2</sub> 1%
4. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%

### **3.5.5 Prosedur Penelitian**

#### **3.5.5.1 Sterilisasi alat yang akan digunakan**

Semua alat yang akan digunakan dalam penelitian ini, sebelumnya disterilkan dengan autoclave. Sterilisasi dalam autoclave menggunakan suhu 121° C selama 15 menit dan tekanan 1,5 atm.

#### **3.5.5.2 Prosedur pembuatan suspensi kuman *Escherichia coli***

##### **3.5.5.2.1 Prosedur pembuatan standart Mc. Farland 1**

1. Menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan
2. Membuat perbandingan antara BaCl<sub>2</sub> 1% : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% sebesar 1 : 9
3. Memipet 0,1 ml BaCl<sub>2</sub> 1% dan 9,9 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%
4. Menghomogenkan keduanya dengan mengkocok pelan tabung

Standart Mc Farland 1 ini sama dengan tiap 1 ml nya mengandung 300 juta bakteri (Bonang Koeswardono,1982)

##### **3.5.5.2.2 Prosedur pembuatan suspensi kuman *Escherichia coli* menggunakan standart Mc Farland 1**

1. Mengisi tabung steril dengan pz ± 5 ml
2. Mengambil kuman dari biakan *Escherichia coli* murni yang mudah ditanam ditanam di NAS dengan lidi steril
3. Menyelupkan lidi kapas steril yang sudah ada bakterinya pada tabung yang berisi pz
4. Membandingkan warna suspensi kuman dengan standart Mc Farland
5. Jika warna kurang keruh tambahkan kuman dengan lidi kapas dan jika terlalu keruh tambahkan pz hingga warna sama dengan standart Mc Farland 1

Untuk mendapatkan kuman tiap ml nya 300 juta, maka dilakukan pengenceran dengan cara :

1. Menyiapkan tabung steril
2. Memipet 5 ml pz dan 5 ml suspensi kuman Mc Farland 1 tadi
3. Menghomogenkan tabung dengan dikocok perlahan-lahan
4. Suspensi kuman dengan jumlah bakteri tiap ml nta 300 juta siap digunakan (Soemarno, 2000)

Menstandartkan ose yang akan dipakai dalam penelitian :

1. Menyiapkan pipet 0,1 ml dan filer serta tabung
2. Memipet aquadest 0,1 ml, kemudian menuanginya kedalam tabung
3. Menyalakan api spirtus
4. Mengambil 1 mata ose yang sudah kedalam tabung dan kemudian memanaskan ose tersebut diatas api spirtus, lakukan berulang-ulang sampai air dalam tabung habis.
5. Misal didapatkan 45 mata ose air tersebut habis

$$0,1 \text{ ml}/45 = 1/450$$

### 3.5.5.3 Prosedur pembuatan media NAP (*Nutrien Agar Plate*)

1. Melakukan perhitungan media NAP

$$\begin{aligned} \text{Komposisi gram NAP} &= \frac{20}{1000} \times \text{volume aquadest} \\ &= \frac{20}{1000} \times 85 \text{ ml} \\ &= 1,7 \text{ gram} \end{aligned}$$

2. Menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan
3. Menimbang bahan sesuai dengan perhitungan menggunakan timbangan

4. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest yang sudah diukur volumenya dengan gelas ukur dalam erlenmeyer
5. Memanaskan larutan diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih
6. Mengangkat larutan yang sudah dipanaskan dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam-suam kuku
7. Mengukur pH nya sampai 7,4 jika terlalu asam menambahkannya dengan NaOH 0,1 N, sedangkan jika terlalu basa menambahkannya dengan HCL 0,1 N sampai pH nya 7,4
8. Menutup erlenmeyer dengan kapas berlemak dan menyeterilkannya di autoclave pada suhu 121° C selama 15 menit
9. Setelah di autoclave, menuangkannya ke dalam *plate* yang steril sampai rata
10. Mendiampkannya sampai terlihat padat dan menyimpannya ke almari es (Soewarsono, 1993)

#### **3.5.5.4 Prosedur pembuatan media EMB (*Eosine Methylene Blue*)**

1. Melakukan perhitungan media EMB

$$\begin{aligned}
 \text{Komposisi gram EMB} &= \frac{36}{1000} \times \text{volume aquadest} \\
 &= \frac{36}{1000} \times 375 \text{ ml} \\
 &= 13,5 \text{ gram}
 \end{aligned}$$

2. Menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan
3. Menimbang bahan sesuai dengan perhitungan menggunakan timbangan
4. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest yang sudah diukur volumenya dengan gelas ukur dalam erlenmeyer

5. Memanaskan larutan diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih
6. Mengangkat larutan yang sudah dipanaskan dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam-suam kuku
7. Mengukur pH nya sampai 7,2 jika terlalu asam menambahkannya dengan NaOH 0,1 N, sedangkan jika terlalu basa menambahkannya dengan HCL 0,1 N sampai pH nya 7,2
8. Menutup erlenmeyer dengan kapas berlemak dan menyeterilkannya di autoclave pada suhu 121<sup>0</sup> C selama 15 menit
9. Setelah di autoclave, menuangkannya ke dalam *plate* yang steril sampai rata
10. Mendiampkannya sampai terlihat padat dan menyimpannya ke almari es (Soewarsono, 1993)

#### **3.5.5.5 Prosedur pembuatan konsentrasi air rebusan daun duwet (*Syzygium cumini* Linn)**

1. Mencuci daun duwet sampai bersih dan yang terakhir dengan aquadest steril
2. Menimbang daun sebanyak 100 gram dan ditambahkan aquadest steril sebanyak 100 ml
3. Merebus pada suhu 90<sup>0</sup> C selama 15 menit
4. Menyaring air rebusan daun duwet dengan menggunakan kertas saring steril
5. Menyentrifuge kembali air rebusan daun duwet di tabung sentrifuge yang steril sehingga didapatkan rebusan yang benar-benar jernih

6. Mengambil 1 mata ose air rebusan yang sudah jernih secara steril, kemudian menanamnya ke media NAP, dengan cara menggoreskannya dipermukaan media
7. Inkubasi di inkubator dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam
8. Mengamati hasilnya, tidak terjadi pertumbuhan bakteri berarti rebusan daun duwet sudah steril. Namun jika pada media NAP terdapat pertumbuhan bakteri berarti perlu dilakukan proses tindalisasi, yaitu:
  - 1) Memanaskan air rebusan daun duwet dengan waterbath pada suhu  $90^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit
  - 2) Kemudian meletakkannya di inkubator selama 24 jam suhu  $37^{\circ}\text{C}$
  - 3) Mengulangi perlakuan tersebut sampai 3 kali
9. Menanam kembali air rebusan daun duwet yang sudah melalui proses tindalisasi di media NAP dan menginkubasinya selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$
10. Membuat konsentrasi
  - Konsentrasi 0% : Tabung 1 diisi 1 ml Pz
  - Konsentrasi 30 % : Tabung 2 diisi 0,7 ml Pz dengan 0,3 ml air rebusan daun duwet.
  - Konsentrasi 35% : Tabung 3 diisi 0,65 ml Pz dengan 0,35 ml air rebusan daun duwet
  - Konsentrasi 40% : Tabung 4 diisi 0,6 ml Pz dengan 0,4 ml air rebusan daun duwet

- Konsentrasi 45% : Tabung 5 diisi 0,55 ml Pz dengan 0,45 ml air rebusan daun duwet
- Konsentrasi 100% : Tabung 6 diisi 1 ml air rebusan daun duwet awal, itu sebagai konsentrasi 100%

### **3.5.5.6 Prosedur pemeriksaan sampel**

#### **Hari Pertama**

1. Menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan
2. Menyalakan api spirtus dengan korek api
3. Memberi label pada masing-masing tabung sesuai dengan konsentrasinya, yaitu konsentrasi 0%, 30%, 35%, 40%, 45%, 100%.
4. Memanaskan ose bulat diatas nyala api spirtus, mengambil suspensi kuman *Escherichia coli* sebanyak 1 mata ose dan membiakkannya di tabung berlabel 0% dengan cara menggesekkan ose di dinding permukaan media cair sebanyak 3 kali.
5. Kemudian mengambil lagi 1 mata ose kuman *Escherichia coli* pada suspensi kuman dan membiakkannya pada masing-masing tabung berlabel 30%, 35%, 40%, 45% dan 100% dengan prosedur yang sama.
6. Semua perlakuan dilakukan secara steril dekat dengan api
7. Menutup kembali tabung dengan kapas berlemak
8. Menginkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam.

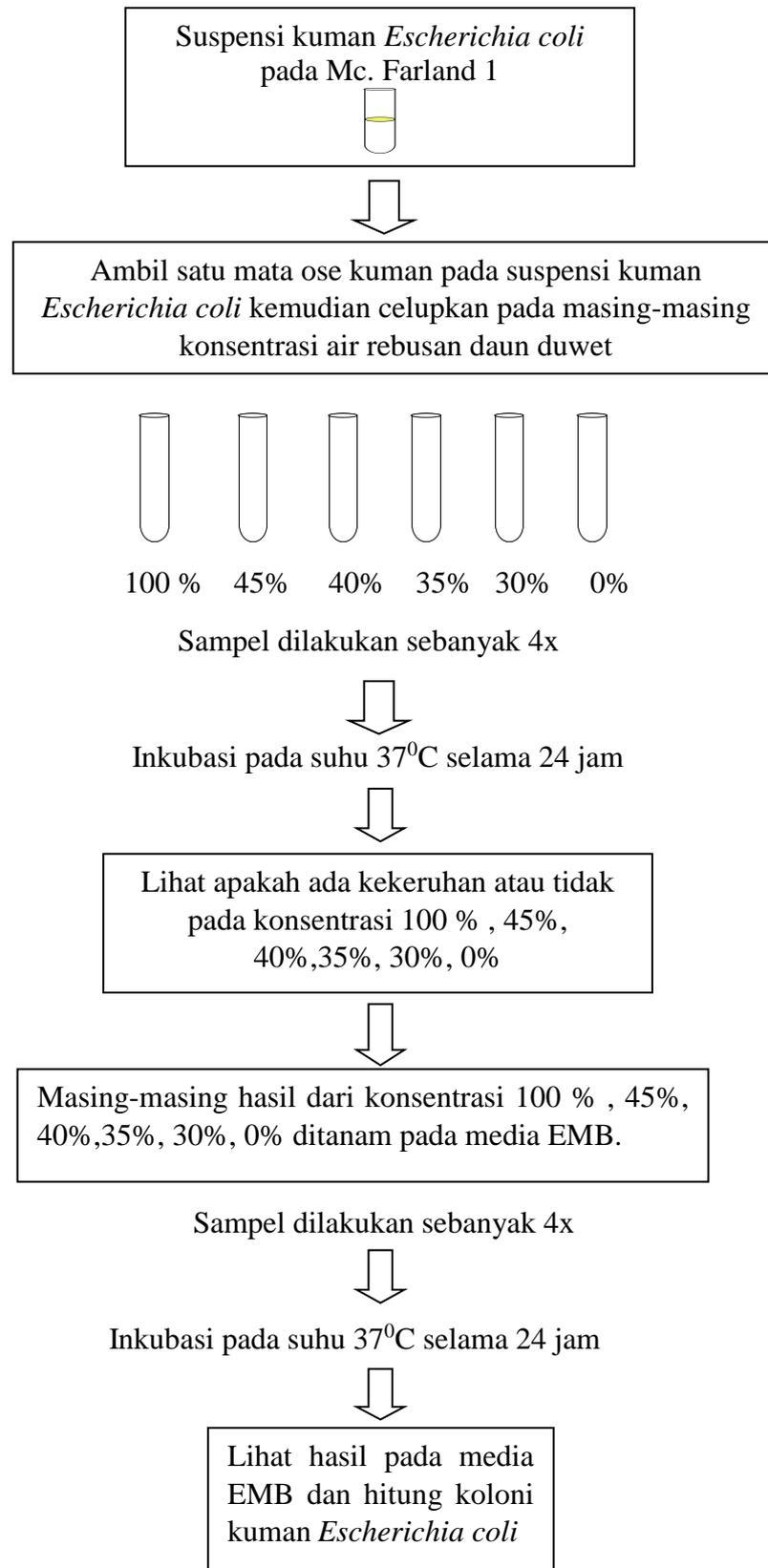
**Hari Kedua**

1. Mengambil masing-masing tabung, terjadi kekeruhan atau tidak
2. Mengambil konsentrasi terkecil yang mulai terlihat keruh, dan menguji kembali ke media padat (EMB) dengan tujuan memastikan kuman tersebut *Escherichia coli*
3. Memanaskan ose bulat diatas nyala api spirtus, mengambil 1 mata ose kuman yang ada pada konsentrasi terkecil tadi
4. Menanamnya di media padat dengan cara menggoreskannya dipermukaan media
5. Inkubasi kembali pada suhu 37° C selama 24 jam

**Hari Ketiga**

1. Mengamati hasilnya pada media padat koloni yang mengidentifikasi kuman tersebut adalah *Escherichia coli*
2. Mencatat konsentrasi terkecil tadi sebagai daya hambat pertumbuhan kuman
3. Mencatat hasil yang diamati sebagai data.

### 3.5.5.7 Kerangka Kerja



### 3.5.6 Tabulasi Data

Data yang diperoleh di tabulasikan sebagai berikut :

#### 3.1 Contoh tabulasi data

No	Kode Sampel	Jumlah Koloni <i>Escherichia coli</i> dari rebusan daun duwet ( <i>Syzygium cumini</i> Linn) yang tumbuh pada media EMB					
		100%	45%	40%	35%	30%	0%
1	1						
2	2						
3	3						
4	4						

#### 3.6 Metode Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan uji anova dengan taraf 5 % (0,05).