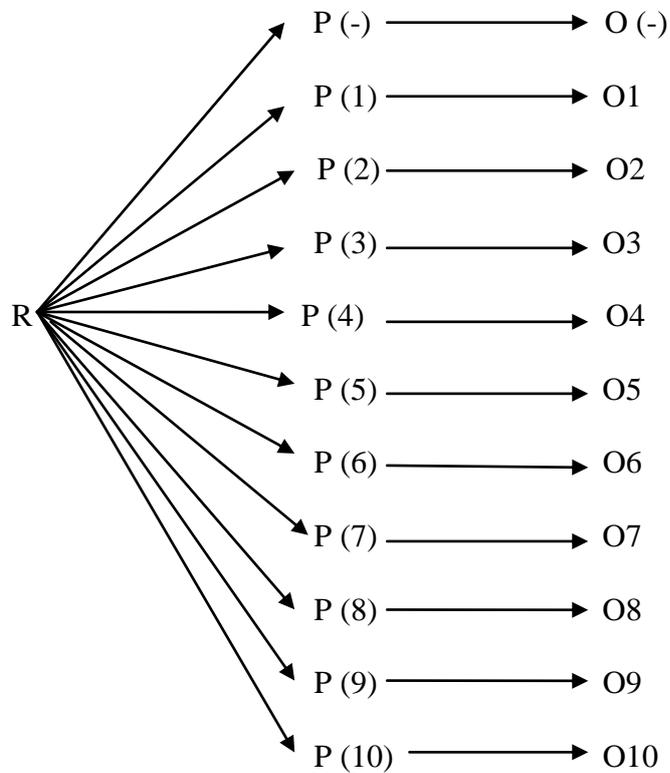


BAB 3
METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan tujuan untuk mengetahui konsentrasi terkecil pada rebusan air daun jambu biji yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

Rancangan Penelitian



Keterangan:

R : Random

P (-) : Perlakuan tanpa diberi air rebusan daun jambu biji

P (1) : Perlakuan dengan pemberian air rebusan konsentrasi 100%

- P (2) : Perlakuan dengan pemberian air rebusan konsentrasi 90%
- P (3) : Perlakuan dengan pemberian air rebusan konsentrasi 80%
- P (4) : Perlakuan dengan pemberian air rebusan konsentrasi 70%
- P (5) : Perlakuan dengan pemberian air rebusan konsentrasi 60%
- P (6) : Perlakuan dengan pemberian air rebusan konsentrasi 50%
- P (7) : Perlakuan dengan pemberian air rebusan konsentrasi 40%
- P (8) : Perlakuan dengan pemberian air rebusan konsentrasi 30%
- P (9) : Perlakuan dengan pemberian air rebusan konsentrasi 20%
- P (10) : Perlakuan dengan pemberian air rebusan konsentrasi 10%
- O (0) : Observasi pertumbuhan *E.coli* pada perlakuan tanpa pemberian air rebusan
- O (1) : Observasi pertumbuhan *E.coli* pada perlakuan pemberian air rebusan daun jambu biji konsentrasi 100%
- O (2) : Observasi pertumbuhan *E.coli* pada perlakuan pemberian air rebusan daun jambu biji konsentrasi 90%
- O (3) : Observasi pertumbuhan *E.coli* pada perlakuan pemberian air rebusan daun jambu biji konsentrasi 80%
- O (4) : Observasi pertumbuhan *E.coli* pada perlakuan pemberian air rebusan daun jambu biji konsentrasi 70%
- O (5) : Observasi pertumbuhan *E.coli* pada perlakuan pemberian air rebusan daun jambu biji konsentrasi 60%
- O (6) : Observasi pertumbuhan *E.coli* pada perlakuan pemberian air rebusan daun jambu biji konsentrasi 50%

- O (7) : Observasi pertumbuhan *E.coli* pada perlakuan pemberian air rebusan daun jambu biji konsentrasi 40%
- O (8) : Observasi pertumbuhan *E.coli* pada perlakuan pemberian air rebusan daun jambu biji konsentasi 30%
- O (9) : Observasi pertumbuhan *E.coli* pada perlakuan pemberian air rebusan daun jambu biji konsentrasi 20%
- O (10) : Observasi pertumbuhan *E.coli* pada perlakuan pemberian air rebusan daun jambu biji konsentrasi 10%

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi Penelitian

Dalam penelitian ini populasi yang diambil adalah daun jambu biji yang tumbuh hampir di setiap rumah.

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jambu biji yang masih muda, Pengulangan sampel dalam penelitian ini adalah 3 yang ditentukan dengan rumus berikut :

$$(n-1) (k-1) \geq 15$$

$$(n-1) (11-1) \geq 15$$

$$11n-n-11+1 \geq 15$$

$$10n-10 \geq 15$$

$$10n \geq 25$$

$$n \geq 25/10$$

$$n \geq 2,5 \approx 3$$

Keterangan :

n : Jumlah ulangan atau jumlah sampel

k : Jumlah kelompok

(Zainuddin, 2003)

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

1. Lokasi Pengambilan Sampel

Lokasi pengambilan sampel dilakukan di rumah warga sekitar yang mempunyai tanaman jambu biji

2. Lokasi Pemeriksaan Sampel

Lokasi pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi D3 Analis Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3. Lokasi Pengolahan Data

Lokasi pengolahan data dilakukan di Universitas Muhammadiyah Surabaya dan sekitarnya.

3.3.2 Waktu Penelitian

1. Waktu Penelitian : Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai dengan Juli 2012.

2. Waktu Pemeriksaan : Pemeriksaan ini dilaksanakan pada bulan Mei 2012.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi air rebusan daun jambu biji

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *E.coli* patogen.

3.4.2 Definisi Operasional

1. Konsentrasi air rebusan daun jambu biji dikategorikan menjadi berbagai macam konsentrasi, yaitu: 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% dan 0% (kontrol). Yang masing-masing konsentrasi diencerkan dengan P.z steril.
2. Pertumbuhan bakteri *E.coli* adalah *E.coli* yang terdapat dimasing-masing konsentrasi air rebusan daun jambu biji dengan melihat ada tidaknya kekeruhan setelah di inkubasi selama 24 jam 37°C.

3.5 Metode Pengumpulan Data

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

3.5.1 Prinsip Pemeriksaan

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

terjadinya kekeruhan. Larutan uji senyawa antibakteri pada 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 dan bahan

1. Alat

- a. Plate
- b. Tabung reaksi
- c. Ose jarum
- d. Ose bulat
- e. Api spirtus
- f. Rak tabung
- g. Incubator
- h. Beaker glass
- i. Erlenmeyer
- j. Batang pengaduk
- k. Kasa asbes
- l. Kaki tiga

2. Bahan

- a. Daun jambu biji (air rubusan daun jambu biji dengan berbagai konsentrasi)
- b. Suspense kuman *E.coli*

3.5.3 Media

- a. NAS (Nutrient agar slant)

- b. NAP (Nutrient agar plate)
- c. EMB (Eosin Methiline blue)

3.5.4 Reagen Pemeriksaan

- a. BaCl_2 1%
- b. H_2SO_4 1%
- d. NaOH 0.1 N
- e. HCl 0.1 N
- f. P.z steril

3.5.5 Prosedur Pembuatan Media

1. NAS (Nutrient Agar Slant)

- a. Menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan
- b. Menimbang media menggunakan timbangan sesuai dengan perhitungan
- c. Melarutkan media yang sudah ditimbang dengan aquades sebanyak
- d. Memanaskan media yang sudah dilarutkan tersebut diatas api spiritus sampai larut sempurna
- e. Diamkan atau dinginkan sampai suam-suam kuku kira-kira suhunya 45°C
- f. Ukur pH sampai 7,5 dengan menambahkan NaOH 0,1 N atau HCl 0,1 N
- g. Media yang sudah diukur pH nya dituang kedalam tabung reaksi, tutup tabung dengan kapas berlemak dan mengikatnya dengan tali.
- h. Media disterilkan dengan Autoclave pada suhu 121 derajat celcius (121°C) selama 15 menit.

2. NAP (Nutrient Agar Plate)

- a. Menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan
- b. Menimbang media menggunakan timbangan sesuai dengan perhitungan
- c. Melarutkan media yang sudah ditimbang dengan aquades sebanyak
- d. Memanaskan media yang sudah dilarutkan tersebut diatas api spirtus sampai larut sempurna
- e. Diamkan atau dinginkan sampai suam-suam kuku kira-kira suhunya 45°C
- f. Ukur pH sampai 7,5 dengan menambahkan NaOH 0.1 N atau HCl 0.1 N
- g. Tutup mulut tabung Erlenmeyer dengan kapas berlemak dan bungkus dengan Koran
- h. Media di sterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit
- i. Setelah media turun dari autoclave tuang ke plate secara steril.

3. EMB (Eosin Methylen Blue)

- a. Menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan
- b. Menimbang media menggunakan timbangan sesuai dengan perhitungan
- c. Melarutkan media yang sudah ditimbang dengan aquades sebanyak
- d. Memanaskan media yang sudah dilarutkan tersebut diatas api spirtus sampai larut sempurna

- e. Diamkan atau dinginkan sampai suam-suam kuku kira-kira suhunya 45°C
- f. Cek pH 7,2
- g. Tutup mulut tabung Erlenmeyer dengan kapas berlemak dan bungkus dengan Koran
- h. Media di sterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit
- i. Setelah media turun dari autoclave tuang ke plate secara steril.

3.5.6 Prosedur Pembuatan Suspensi Kuman

Pembuatan suspensi kuman sesuai dengan metode Mc.Farlan:

1. Menyiapkan 2 tabung steril, 1 untuk suspensi dan yang 1 untuk standart Mc Farlan.
2. Cara membuat standart Mc Farlan, yaitu:
 - a. Membuat perbandingan antara BaCl 1% dengan H₂SO₄ 1 % dengan perbandingan 1 : 99
 - b. Memipet 0,1 ml BaCl 1 % + 9,9 ml H₂SO₄ 1 %
 - c. Menghomogenkan dengan cara kocok pelan tabung
3. Cara membuat suspensi kuman, yaitu:
 - a. Mengisi tabung steril dengan P.z ± 3 ml.
 - b. Mengambil kuman dari biakan *E.coli* murni dengan lidi kapas steril
 - c. Menyelupkan lidi kapas steril yang sudah ada kumannya pada tabung yang berisi P.z steril.
 - d. Membandingkan warna suspensi kuman dengan Mc Farlan

- e. Apabila warna kurang keruh, maka tambahkan kuman dengan lidi kapas dan apabila terlalu keruh tambahkan P.z steril hingga warnanya sama dengan standart Mc Farlan
- f. Jika sudah sama, maka telah di dapatkan kuman dengan jumlah 300.000.000 kuman / ml
- g. Suspensi kuman siap digunakan

3.5.7 Prosedur Pembuatan Konsentrasi air rebusan daun jambu biji

- a. Memetik daun jambu biji dari pohon jambu biji
- b. Mencuci daun sampai bersih, kemudian keringkan pada suhu ruang.
- c. Menimbang daun sebanyak 100 gram
- d. tambah aquadest 100ml kemudian rebus daun jambu biji selama 15 menit (15 menit di hitung ketika air rebusan mendidih)
- e. kemudian air rebusan disaring dengan kasa steril
- f. Membuat konsentrasi 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, dan 10% dengan P.z steril yaitu :
 - Konsentrasi 100% : Hasil dari rebusan pertama
 - Konsentrasi 90% : Pada tabung diisi 1 ml P.z steril dan ditambahkan air rebusan daun jambu biji dengan konsentrasi 100% sebanyak 9 ml, kemudian dihomogenkan.
 - Konsentrasi 80% : Pada tabung diisi 2ml P.z steril ditambahkan air rebusan daun jambu biji dengan konsentrasi 100% sebanyak 8ml, kemudian dihomogekan.

- Konsentrasi 70% : Pada tabung diisi 3ml P.z steril ditambahkan air rebusan daun jambu biji dengan konsentrasi 100% sebanyak 7ml, kemudian dihomogekan.
- Konsentrasi 60% : Pada tabung diisi 4ml P.z steril ditambahkan air rebusan daun jambu biji dengan konsentrasi 100% sebanyak 6ml, kemudian dihomogekan
- Konsentrasi 50% : Pada tabung diisi 5 ml P.z steril dan ditambahkan air rebusan daun jambu biji dengan konsentrasi 100% sebanyak 5 ml, kemudian dihomogenkan.
- Konsentrasi 40% : Pada tabung diisi 6 ml P.z steril ditambahkan air rebusan daun jambu biji dengan konsentrasi 100% sebanyak 4 ml, kemudian dihomogekan.
- Konsentrasi 30% : Pada tabung diisi 7 ml P.z steril ditambahkan air rebusan daun jambu biji dengan konsentrasi 100% sebanyak 3 ml, kemudian dihomogekan.
- Konsentrasi 20% : Pada tabung diisi 8 ml P.z steril ditambahkan air rebusan daun jambu biji dengan konsentrasi 100% sebanyak 2 ml, kemudian dihomogekan
- Konsentrasi 10% : Pada tabung diisi 9 ml P.z steril ditambahkan air rebusan daun jambu biji dengan konsentrasi 100% sebanyak 1 ml, kemudian dihomogekan

3.5.8 Prosedur Pemeriksaan Sampel

1. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
2. Menyalakan api spirtus dengan korek api.
3. Melabeli masing-masing tabung sesuai dengan konsentrasinya, yaitu konsentrasi 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 20%, 10% dan C (Control).
4. Mengisi masing-masing tabung dengan air rebusan dan jambu biji sesuai dengan konsentrasi yang ada pada label sebanyak 1 ml, dilakukan secara steril dekat dengan api.
5. Memanaskan ose bulat diatas nyala api spirtus, mengambil suspensi kuman *E.coli* sebanyak 1 mata ose dan membiakkannya di tabung berlabel 100% dengan cara menggesekkan ose didinding permukaan media cair. Kemudian berlanjut ke-tabung berlabel selanjutnya, perlakuan sama seperti pada tabung 100%, begitu seterusnya sampai pada tabung C (control). Semua perlakuan dilakukan secara steril dekat dengan api.
7. Menutup kembali tabung dengan kapas berlemak
8. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
9. Mengamati masing-masing tabung, apakah terjadi kekeruhan atau tidak.
10. Kemudian menguji kembali dari konsentrasi 10% hingga 100% ke media padat (EMB) dengan tujuan memastikan apakah kuman tersebut adalah *E.coli*
11. Memanaskan ose bulat diatas nyala api spirtus, mengambil 1 mata ose kuman yang ada pada konsentrasi terkecil tadi.
12. Menanamnya di media padat dengan cara menggoreskannya dipermukaan media.

13. Inkubasi kembali pada suhu 37°C selama 24 jam.
14. Mengamati hasilnya pada media padat apakah terbentuk koloni yang mengidentifikasi kuman tersebut adalah *E.coli*.

3.5.9 Tabulasi data

No	Pengulangan	Konsentrasi air rebusan daun jambu biji									
		100%	90%	80	70%	60%	50%	40%	30%	20%	10%
1.	1										
2.	2										
3.	3										

3.6 Metode Analisis Data

Setelah diperoleh hasil dalam tabel di analisa dengan chi square dengan kesalahan 5%