

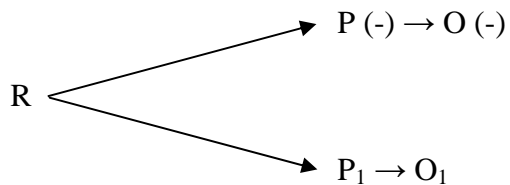
BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental, dengan tujuan untuk mengetahui perbandingan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* antara pemberian rebusan dengan tanpa pemberian rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*).

Desain penelitian adalah sebagai berikut :



(sumber; sudjana, 2005)

R : Randomisasi

P₍₋₎ : Media pertumbuhan *Escherichia coli* tanpa pemberian air rebusan daun Srikaya (*Annona squamosa*)

P₁ : Media pertumbuhan *Escherichia coli* dengan pemberian air rebusan daun Srikaya (*Annona squamosa*)

O₍₋₎ : Pertumbuhan *Escherichia coli* tanpa pemberian air daun Srikaya (*Annona squamosa*)

O₁ : Pertumbuhan *Escherichia coli* dengan pemberian air rebusan daun Srikaya (*Annona squamosa*)

Terdapat 2 kelompok media pertumbuhan yaitu media tanpa pemberian air rebusan daun Srikaya (*Annona squamosa*) dan media dengan pemberian air rebusan daun Srikaya (*Annona squamosa*).

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* dalam biakan media NAS (Nutrien Agar Salt)

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* dalam biakan media NAS (Nutrien Agar Salt)

Media pertumbuhan *Escherichia coli* yaitu media dengan pemberian air rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*) dan media tanpa pemberian air rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*). Setiap kelompok masing-masing digunakan sebanyak 16 sampel (ulangan), berdasar rumus :

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

$$(n-1)(2-1) \geq 15$$

$$n - 1 \geq 15$$

$$n \geq 16$$

Keterangan:

n : Jumlah sampel

k : Perlakuan

(sumber: Sudjana, 2005)

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1. Lokasi

Pemeriksaan laboratorium pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dilakukan dilaboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.3.2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Januari sampai dengan bulan Juli 2012. Sedangkan waktu pemeriksaan sampel dilaksanakan pada bulan Juni 2012.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel Bebas: pemberian dengan tanpa pemberian air rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*).

Variabel Terikat: pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

Variabel kontrol: sterilisasi, inkubasi, cara inokulasi, jumlah bakteri

3.4.2 Definisi Operasional

- a. Pemberian air rebusan daun Srikaya (*Annona squamosa*) dalam penelitian ini dikategorikan menjadi tanpa pemberian air rebusan daun Srikaya (*Annona squamosa*) dan pemberian air rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*).
- b. Pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* adalah ditetapkan berdasarkan kecurahan atau kejernihan air rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*) pada media Bouillon. Pertumbuhan dikategorikan menjadi positif(+) : ada pertumbuhan (keruh) bakteri *Escherichia coli*, jika pada media menjadi negatif (-): tidak ada pertumbuhan (jernih) bakteri *Escherichia coli*. Penetapan jernih dan keruh adalah dengan membandingkan media

tanpa pemberian rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*) dengan pembanding media Bouillon sedangkan dengan pemberian rebusan rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*) dengan pembanding media Bouillon di tambah rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*).

- c. Sterilisasi, inkubasi, cara inokulasi, jumlah bakteri pada penelitian ini dikategorikan sebagai perlakuan kontrol yang sama antara pemberian dengan tanpa pemberian rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*), sterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121⁰C selama 15 menit, inkubasi dilakukan pada suhu 37⁰C selama 24 jam, cara inokulasi menggunakan ose yang sudah distandarisasi, jumlah kuman yang digunakan dalam penelitian menggunakan standart Mac Farland 0,5 suspensi bakteri untuk 1 mata ose standart 1/300 ml akan mengandung bakteri 5x10⁵ bakteri/ml.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dikumpulkan dengan cara uji laboratorium.

3.5.1 Persiapan Air Rebusan Daun Srikaya (*Annona squamosa*)

1. Alat yang digunakan :

Beaker glass, kompor gas, pisau, kasa, pengaduk

2. Bahan :

Daun srikaya (*Annona squamosa*) yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, Aquadest steril

3. Prosedur :

- a. Daun srikaya (*Annona squamosa*) yang sudah dicuci 3 kali sampai bersih.
- b. Dipotong-potong secukupnya ditimbang 100 gram dan tambahkan 300 ml Aquadest panaskan pada suhu 90⁰C dan selama 15 menit.
- c. Lalu biarkan sampai dingin dan disaring karena hasil rebusan agak keruh maka rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*) dicentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*) jernih. rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*) yang didapatkan adalah rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*) dengan konsentrasi 100 %.
- d. Kemudian dilakukan uji sterilitas dengan mengambil 1 mata ose rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*) ditanam pada media NAP (Nutrient Agar Plate).
- e. Inkubasi 37⁰ C selama 24 jam
- f. Apabila tidak ada pertumbuhan kuman maka sampel daun srikaya (*Annona squamosa*) dinyatakan steril setelah itu bisa dilakukan untuk uji penelitian.

3.5.2 Persiapan Media Pertumbuhan

1. Alat :

Tabung reaksi, erlenmeyer, pengaduk, autoclave, gelas arloji, timbangan, bunsen.

2. Bahan :

Media Bouillon

3.5.3. Pemeriksaan Pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*

1. Prinsip pemeriksaan:

Pengamatan tabung yang positif dapat dilihat dengan mengamati timbulnya kekeruhan.

2. Alat :

Autoclave, incubator, pipet 1 ml, api spiritus, tabung reaksi, rak tabung, erlenmeyer, labu ukur, petridish, ose, kapas, kertas pembungkus.

3. Bahan :

- Rebusan Daun srikaya (*Annona squamosa*)
- Bakteri *Escherichia coli* ATCC 29522
- Media bouillon
- Reagen H₂SO₄ 1 % , BaCl₂ 1 % , PZ steril, Aquades steril

4. Prosedur :

a. Cara pembuatan standart Mac Farland 0,5

1. Disediakan tabung reaksi yang bersih dan baru
2. Pipet dan masukkan 0,05 ml Barium Klorida (BaCl₂) 1% kedalam tabung reaksi tersebut.
3. Tambahkan 9,95 ml Asam Sulfat (H₂SO₄) 1% kedalam tabung yang telah berisi 0,05 ml Barium Klorida (BaCl₂) 1%.
4. Dicampur kedua larutan dalam tabung tersebut sehingga didapatkan standart Mac Farland 0,5 dan sama dengan jumlah bakteri $1,5 \times 10^8$ ml

b. Cara Pembuatan suspensi bakteri *Escherichia coli* menggunakan standart Mac Farland 0,5 = $1,5 \times 10^8$ bakteri / ml :

Dalam biakan murni bakteri *Escherichia coli* diambil dengan ose bulat, kemudian pindahkan kedalam tabung reaksi berisi PZ (NaCl 0,85 % – 0,9 %) yang steril, homogenkan dan bandingkan dengan standart Mac Farland 0,5. Bila didapatkan kekeruhan suspensi bakteri *Escherichia coli* yang melebihi standart Mac Farland 0,5 maka tambahkan PZ (NaCl 0,85% - 0,9%) steril, dan apabila kekeruhan yang diperoleh masih kurang dari standart Mac Farland 0,5 maka tambahkan dengan kultur murni bakteri *Escherichia coli*, lakukan hal tersebut sampai didapatkan suspensi bakteri *Escherichia coli* yang sesuai dengan standart Mac Farland 0,5. Suspensi bakteri ini untuk 1 mata ose standar 1/300 ml akan mengandung bakteri 5×10^5 bakteri/ml.

Hari Pertama

1. Siapkan air rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*) dan suspensi bakteri *Escherichia coli* yang sudah dilakukan berdasarkan standart Mc. Farland 0,5.
2. Kemudian disiapkan tabung steril sebanyak 34 buah.
3. Kelompok pertama 16 tabung dengan label tanpa pemberian rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*) diisi masing-masing 1 ml media Bouillon ditambah 1 mata ose suspensi kuman *Escherichia coli* dan 1 tabung diberi

label pembanding tanpa pemberian rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*) yang berisi 1 ml media Bouillon

4. Kelompok kedua 16 tabung diberi label dengan pemberian rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*) diisi masing-masing 1 ml media Bouillon di tambah 1 ml rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*) di tambah 1 mata ose suspensi kuman *Escherichia coli* dan 1 tabung diberi label pembanding dengan pemberian rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*) dengan diisi 1 ml media Bouillon di tambah 1 ml rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*) .
5. Inkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam.

Hari Kedua

1. Dilihat adanya kekeruhan pada tabung yang berlabel tanpa pemberian rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*) dengan pembandingnya (media Bouillon). Dilihat adanya kekeruhan yang berlabel dengan pemberian rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*) dengan pembandingnya (media Bouillon + rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*))
2. Karena kelompok yang diberi air rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*) agak keruh maka ada kesulitan untuk membedakan antara pembandingnya sehingga untuk membuktikan ada tidaknya pertumbuhan bakteri dilanjutkan dengan mengambil 1 mata ose ditanam pada media EMB (*Eosine Methylen Blue*)
3. Inkubasi 37⁰C selama 24 jam

Hari Ketiga

Dilihat pada media EMB kalau ada koloni warna methalic sheen berarti ada pertumbuhan kuman *Escherichia coli* akan tetapi jika jernih berarti tidak ada pertumbuhan kuman *Escherichia coli*.

Setelah data terkumpul, selanjutnya ditabulasikan seperti contoh berikut:

Tabel 3.1 Hasil pengamatan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*

Kode sampel	Pertumbuhan	
	Tanpa diberi air rebusan daun Srikaya (<i>Annona squamosa</i>)	Diberi air rebusan daun Srikaya (<i>Annona squamosa</i>)
1		
Dst		
16		
Σ		

3.6 Metode Analisis Data

Setelah diperoleh hasil dalam bentuk tabel dianalisa dengan Uji Chi-Square untuk mengetahui perbandingan antara pemberian dengan tanpa pemberian air rebusan daun srikaya (*Annona squamosa*) pada $\alpha = 5\%$.