

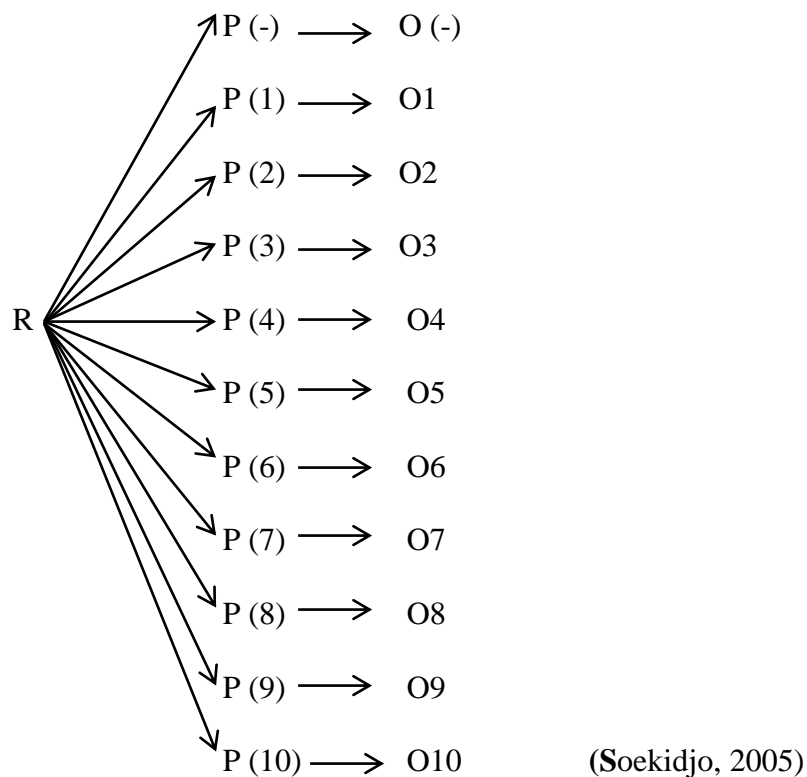
BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah termasuk jenis penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi pada rebusan air brokoli (*Brassica oleracea L. cv*) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara *invitro*.

3.2 Rancangan Penelitian



Keterangan :

R : Random

P(-) : Perlakuan tanpa diberi rebusan brokoli

- P1 : Perlakuan konsentrasi rebusan brokoli 10%
- P2 : Perlakuan konsentrasi rebusan brokoli 20%
- P3 : Perlakuan konsentrasi rebusan brokoli 30%
- P4 : Perlakuan konsentrasi rebusan brokoli 40%
- P5 : Perlakuan konsentrasi rebusan brokoli 50%
- P6 : Perlakuan konsentrasi rebusan brokoli 60%
- P7 : Perlakuan konsentrasi rebusan brokoli 70%
- P8 : Perlakuan konsentrasi rebusan brokoli 80%
- P9 : Perlakuan konsentrasi rebusan brokoli 90%
- P10 : Perlakuan konsentrasi rebusan brokoli 100%
- O(-) : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan tanpa pemberian rebusan brokoli
- O1 : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian rebusan brokoli konsentrasi 10%
- O2 : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian rebusan brokoli konsentrasi 20%
- O3 : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian rebusan brokoli konsentrasi 30%
- O4 : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian rebusan brokoli konsentrasi 40%
- O5 : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian rebusan brokoli konsentrasi 50%
- O6 : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian rebusan brokoli konsentrasi 60%

- O7 : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian rebusan brokoli konsentrasi 70%
- O8 : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian rebusan brokoli konsentrasi 80%
- O9 : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian rebusan brokoli konsentrasi 90%
- O10 : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian rebusan brokoli konsentrasi 100%

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* yang di dapatkan dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya.

3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* jumlah sampel adalah 30 juta kuman. Jumlah pengulangan sampel dalam penelitian ini adalah 3 yang ditemukan dengan rumus berikut :

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

$$(n-1)(10-1) \leq 15$$

$$10n-n-1n+1 \leq 15$$

$$9n-9 \leq 15$$

$$9n \geq 15 + 9$$

$$n \geq 24/9$$

$$n \geq 2,7 \approx 3 \text{ (Hidayat, 2010).}$$

Keterangan :

k : Perlakuan atau jumlah kelompok

n : Replikasi atau jumlah ulangan atau jumlah sampel

3.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya, sedangkan waktu penelitian dilakukan pada bulan Maret 2015 sampai Juli 2015 dan waktu pemeriksaan dilaksanakan pada bulan Juni 2015.

3.5 Variabel dan Definisi Operasional

3.5.1 Variabel

Variabel bebas : konsentrasi rebusan brokoli (*Brassica oleracea L. cv*)

Variabel terikat : pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*

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

3.5.2 Definisi Operasional

- 1) Konsentrasi rebusan brokoli adalah rebusan brokoli yang diencerkan dengan PZ steril menjadi konsentrasi bertingkat 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%.
- 2) Pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* adalah bakteri yang tumbuh pada media EMB (Eosin Methyline Blue) dengan menghitung jumlah koloni bakteri *Escherichia coli* pada masing-masing konsentrasi.

3.6 Teknik Pengumpulan data

Data pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* diperoleh dengan cara observasi langsung, yaitu dengan melalui uji laboratorium. Pemeriksaan daya hambat bakteri *Escherichia coli* ini menggunakan metode dilusi. Langkah-langkah pemeriksaanya diantaranya sebagai berikut :

3.6.1 Prinsip Pemeriksaan

Senyawa antibakteri yang ada pada rebusan brokoli diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi, kemudian masing-masing konsentrasi ditambahkan suspensi bakteri dalam media cair. Perlakuan tersebut 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 (KIM) atau MIC (*Minimum inhibition concentration*) (Pratiwi, 2008). Untuk menegaskan bahwa bakteri *Escherichia coli* tumbuh atau tidak, dilakukan tes penegasan dengan cara : hasil dari tabung pada test uji tersebut ditanam dimedia EMB (Eosin Methyline Blue). Lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.6.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, pengaduk, pipet pasteur, erlenmeyer, gelas arloji, gelas ukur, rak tabung reaksi, api spirtus, kaki tiga, filler, ose jarum/bulat, plate, inkubator, pipet ukur, tisu, timbangan, spatel permanen, autoclave, kapas berlemak. Bahan yang digunakan adalah rebusan brokoli dan bakteri *Escherichia coli*. Sedangkan media dan reagen yang

dibutuhkan dalam penelitian ini adalah EMB, NA, H₂SO₄ 1%, BaCl₂ 1%, PZ steril, NaOH 0,1 N, HCl 0,1 N.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 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 dengan tekanan 1,5 atm.

3.7.2 Prosedur Pembuatan Suspensi Kuman

3.7.2.1 Cara pembuatan standart Mc Farland

- 1) Menyediakan tabung reaksi yang steril.
- 2) Prosedur membuat standart Mc Farland:
 - a. Membuat perbandingan antara BaCl₂ 1% : H₂SO₄ 1% sebesar 1:90
 - b. Memipet 0,1 ml BaCl₂ 1% + 9,9 H₂SO₄ 1%
 - c. Menghomogenkan dengan cara mengocok pelan tabung

Standart *Mc Farland I* ini kekeruhannya sama dengan tiap 1 ml dari suspensi kuman mengandung 300 juta kuman (Cita, 2014).

3.7.2.2 Cara Pembuatan suspensi kuman

- 1) Mengisi tabung steril dengan PZ ± 4 ml.
- 2) Mengambil kuman dari biakan *E.coli* murni umur 24 jam yang sudah ditanam di media NAS (Nutrien Agar Slint) dengan lidi kapas steril.
- 3) Menyelupkan lidi kapas steril yang sudah ada kumannya pada tabung yang berisi PZ.
- 4) Membandingkan kekeruhan suspensi kuman dengan *Mc Farland I*

- 5) Apabila suspensi kurang keruh, maka tambahkan kuman dengan lidi kapas dan apabila terlalu keruh tambahkan PZ hingga kekeruhannya sama dengan standart *Mc Farland I*.
- 6) Suspensi sudah siap digunakan (Cita, 2014).

3.7.2.3 Menstandartkan ose yang akan dipakai dalam penelitian :

- 1) Menyiapkan pipet 0,1 ml dan filter serta tabung.
- 2) Memipet aquadest 0,1 ml, kemudian menuangannya kedalam tabung.
- 3) Menyalakan api spirtus
- 4) Mengambil 1 mata ose air yang sudah diuang kedalam tabung dan kemudian memanaskan ose tersebut diatas api spirtus, lakukan berulang-ulang sampai air dalam tabung habis.

- 5) Didapatkan 30 mata ose air tersebut habis,

$$0,1 \text{ ml} = 0,003$$

1 mata ose = 1 juta kuman (bila suspensi kuman per mililiter 300 juta /kuman) (Cita, 2014).

3.7.3 Prosedur pembuatan media NAP (Nutrient Agar Plate)

- 1) Melakukan perhitungan media NA (Nutrient Agar)

Membuat NAP 5 plate, @plate ± 17 ml

$$\text{Komposisi NA 20gr per 1 liter} \longrightarrow \frac{20 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}} \times 85 \text{ ml} = 1,7 \text{ gr}$$

- 2) Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan
- 3) Menimbang media (pada NA) sesuai dengan perhitungan yaitu 1,7 gram menggunakan timbangan.
- 4) Mengukur volume aquadest sebanyak 85 ml menggunakan gelas ukur.

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

3.7.4 Pembuatan rebusan brokoli

Brokoli dicuci sebanyak 3 kali dengan menggunakan aquadest steril. Selanjutnya ditimbang sebanyak 100 gram dan ditambah aquadest steril sebanyak 100 ml direbus pada suhu 90°C selama 3 menit. Rebusan brokoli yang didapatkan adalah rebusan brokoli dengan konsentrasi 100%. Kemudian dilakukan uji sterilitas dengan ditanam pada media NAP lalu inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Apabila tidak terdapat pertumbuhan kuman maka sampel brokoli dinyatakan telah steril, setelah itu dilakukan pengenceran. Namun jika pada media

NAP terdapat pertumbuhan kuman berarti perlu dilakukan proses tindalisasi, yaitu:

- 1) Memanaskan rebusan brokoli dengan waterbath pada suhu 90⁰C selama 15 menit.
- 2) Kemudian meletakkannya di inkubator selama 24 jam pada suhu 37⁰C.
- 3) Mengulangi perlakuan tersebut sampai 3x.

Menanam kembali rebusan brokoli yang sudah melalui proses tindalisasi di media NAP dan menginkubasinya selama 24 jam duhu 37⁰C (Cita, 2014)

3.7.5 Proses pengenceran brokoli

Air dari rebusan brokoli 100% dibuat pengenceran dengan menggunakan PZ steril menjadi konsentrasi bertingkat 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% dan 10%. Menyiapkan 12 tabung reaksi steril, letakkan di rak tabung. Tabung 1 untuk konsentrasi 100%, tabung 2 untuk konsentrasi 90% dan seterusnya sampai dengan tabung 10. Sedangkan pada tabung 11 dan 12 digunakan sebagai kontrol. Adapun ketentuan konsentrasi pengenceran sebagai berikut :

- 1) Tabung 1 (konsentasi 10%) dipipet 0,1 ml rebusan brokoli 100% lalu tambahkan 0,9 ml PZ steril.
- 2) Tabung 2 (konsentasi 20%) dipipet 0,2 ml rebusan brokoli 100% lalu tambahkan 0,8 ml PZ steril.
- 3) Tabung 3 (konsentasi 30%) dipipet 0,3 ml rebusan brokoli 100% lalu tambahkan 0,7 ml PZ steril.
- 4) Tabung 4 (konsentasi 40%) dipipet 0,4 ml rebusan brokoli 100% lalu tambahkan 0,6 ml PZ steril.

- 5) Tabung 5 (konsentrasi 50%) dipipet 0,5 ml rebusan brokoli 100% lalu tambahkan 0,5 ml PZ steril.
- 6) Tabung 6 (konsentrasi 60%) dipipet 0,6 ml rebusan brokoli 100% lalu tambahkan 0,4 ml PZ steril.
- 7) Tabung 7 (konsentrasi 70%) dipipet 0,7 ml rebusan brokoli 100% lalu tambahkan 0,3 ml PZ steril.
- 8) Tabung 8 (konsentrasi 80%) dipipet 0,8 ml rebusan brokoli 100% lalu tambahkan 0,2 ml PZ steril.
- 9) Tabung 9 (konsentrasi 90%) dipipet 0,9 ml rebusan brokoli 100% lalu tambahkan 0,1 ml PZ steril.
- 10) Tabung 10 (konsentrasi 100%) dipipet 1 ml rebusan brokoli 100% tanpa penambahan PZ steril.
- 11) Tabung 11 (kontrol positif) : dipipet 1 ml PZ ditambahkan 1 mata ose suspensi kuman
- 12) Tabung 12 (kontrol negatif) : dipipet 1 ml rebusan brokoli 100% (Cita, 2014)

3.7.6 Prosedur pembuatan media EMB

1. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
2. Melakukan perhitungan media EMB

Membuat EMB 32 plate, @plate ± 17 ml

Komposisi EMB 36 gr per 1 liter → $\frac{36 \text{ gr}}{1000} \times 544 \text{ ml} = 19,58 \text{ gr}$

1000

3. Menimbang media EMB sesuai dengan perhitungan yaitu 19,58 gram menggunakan timbangan.

4. Mengukur volume aquadest sebanyak 544 ml menggunakan gelas ukur.
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest yang sudah diukur volumenya dalam erlenmeyer.
6. Memanaskan larutan diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih.
7. Mengangkat larutan yang sudah dipanaskan dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam-suam kuku.
8. Mengukur pH nya sampai 7,4, jika terlalu asam menambahkannya dengan NaOH 0,1 N, sedangkan jika terlalu asam menambahkannya dengan HCL 0,1 N sampai pH nya 7,4
9. Menutup erlenmyer dengan kapas berlemak dan mensterilkan dengan autoclave pada suhu 121⁰C selama 15 menit.
10. Setelah turun dari autoclave, menuangkannya ke dalam plate yabng steril sampai rata.
11. Mendinginkan sampai terlihat padat dan kemudian menyimpannya ke almari es (Soewarsono, 1993)

3.7.7 Prosedur Pemeriksaan Sampel

Hari pertama :

- 1) Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
- 2) Menyalakan api spirtus dengan korek api.
- 3) Masing-masing tabung diberi label sesuai dengan konsentrasinya, yaitu konsentrasi 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% dan 0% atau C (Control).

- 4) Mengambil suspensi kuman *Escherichia coli* sebanyak 1 mata ose , dengan ose yang sudah distandartkan. Dengan ketentuan 1 mata ose sama dengan 1 juta kuman. Kemudian menanamnya ke konsentrasi 100%. Masing-masing konsentrasi diperlakukan sama halnya seperti konsentrasi 100%. Semua perlakuan dilakukan secara steril dekat dengan api. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Cita, 2014).

Hari kedua :

1. Mengamati masing-masing tabung, apakah terjadi kekeruhan atau tidak.
2. Mengambil konsentrasi terkecil yang sudah mulai terlihat keruh, dan menguji kembali ke media EMB dengan tujuan memastikan apakah kuman tersebut adalah *Escherichia coli*.
3. Memanaskan ose bulat di atas nyala api spirtus, mengambil 1 mata ose kuman yang ada pada konsentrasi terkecil tadi.
4. Menanamnya di media EMB dengan cara menggoreskannya dipermukaan media. Inkubasi kembali pada suhu 37°C selama 24 jam (Cita, 2014).

Hari ketiga:

- 1) Mengamati hasilnya pada media EMB apakah berbentuk 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 (Cita, 2014).

3.7.8 Tabulasi Data

Setelah diketahui pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada EMB, maka data yang diperoleh ditabulasikan sebagai berikut :

Tabel 3.1. Contoh tabulasi data

Konsentrasi	Jumlah Koloni Pada Media EMB			Jumlah	Rata - Rata
	P1	P2	P3		
10%					
20%					
30%					
40%					
50%					
60%					
70%					
80%					
90%					
100%					
Kontrol					

3.8 Metode Analisis Data

Setelah diperoleh hasil dalam bentuk tabel, data kemudian dianalisis dengan uji ANOVA untuk mengetahui pengaruh rebusan brokoli terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* dengan tingkat kesalahan 0,05.