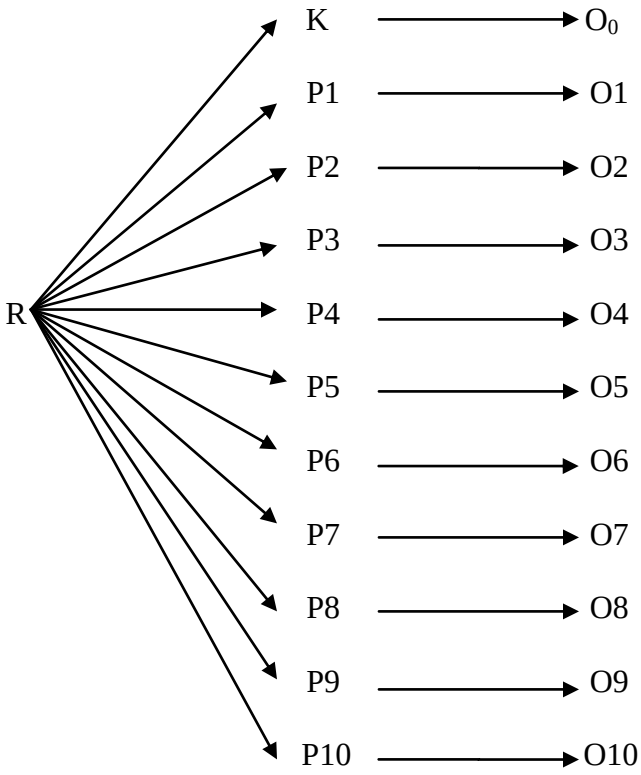
BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental yaitu dengan melakukan uji laboratorium konstentrasi perasan daun kemangi (*Ocimum basilicum* Linn) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* secara in-vitro. Sedangkan untuk rancangan penelitian adalah sebagai berikut :



(Zainuddin, 2003)

Gambar 3.1 Rancangan Penelitian

Keterangan:

R : Random (Pengambilan sampel secara acak)
K : Tanpa pemberian air perasan daun kemangi dan sebagai kontrol
P1 : Perlakuan dengan pemberian air perasan daun kemangi konsentrasi 100%
P2 : Perlakuan dengan pemberian air perasan daun kemangi konsentrasi 90%
P3 : Perlakuan dengan pemberian air perasan daun kemangi konsentrasi 80%
P4 : Perlakuan dengan pemberian air perasan daun kemangi konsentrasi 70%
P5 : Perlakuan dengan pemberian air perasan daun kemangi konsentrasi 60%
P6 : Perlakuan dengan pemberian air perasan daun kemangi konsentrasi 50%
P7 : Perlakuan dengan pemberian air perasan daun kemangi konsentrasi 40%
P8 : Perlakuan dengan pemberian air perasan daun kemangi konsentrasi 30%
P9 : Perlakuan dengan pemberian air perasan daun kemangi konsentrasi 20%
P10 : Perlakuan dengan pemberian air perasan daun kemangi konsentrasi 10%
O_0 : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* tanpa pemberian air perasan daun kemangi
O1 : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* dengan pemberian air perasan daun kemangi 100%
O2 : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* dengan pemberian air perasan daun kemangi 90%
O3 : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* dengan pemberian air perasan daun kemangi 80%
O4 : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* dengan pemberian air perasan daun kemangi 70%
O5 : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* dengan pemberian air perasan daun kemangi 60%
O6 : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* dengan pemberian air perasan daun kemangi 50%
O7 : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* dengan pemberian air perasan daun kemangi 40%
O8 : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* dengan pemberian air perasan daun kemangi 30%
O9 : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* dengan pemberian air perasan daun kemangi 20%
O10 : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* dengan pemberian air perasan daun kemangi 10%

3.2. Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1. Populasi Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* yang di tanam pada media pertumbuhan. *Escherichia coli* yang ditumbuhkan berasal dari biakan murni yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Klinik (BBLK).

3.2.2. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah bakteri *Escherichia coli* yang di tanam pada media pertumbuhan. *Escherichia coli* yang ditumbuhkan berasal dari biakan murni yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Klinik (BBLK). Besar sampel penelitian ini ada 11 sampel dan jumlah replikasi masing-masing kelompok adalah 3x yang ditentukan dengan rumus berikut (Hidayat, 2010) :

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

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

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

$(n-1) \geq {}^{15}/_{10}$

$(n-1) \geq 1{,}5 + 1$

$n \geq 2{,}5$

$n \sim 3$

Keterangan :

n : banyaknya pengulangan dari setiap perlakuan

k : jumlah dari setiap perlakuan

Sampel penelitian ini dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan untuk setiap perlakuan sehingga seluruh unit percobaan sebanyak 33 kali percobaan.

3.3. Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini di laksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya jalan Sutorejo No. 59 Surabaya.

3.3.2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian di lakukan pada bulan Desember 2014 sampai dengan bulan Juli 2015. Sedangkan waktu pemeriksaan di lakukan pada bulan Mei 2015.

3.4. Variable Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

3.4.1. Variabel Penelitian

Variabel Bebas : Konsentrasi perasan daun kemangi (*Ocimum basilicum* Linn)

Variabel Terikat : Pertumbuhan *Escherichia coli*

Variabel Kontrol : Suhu penyimpanan, lama inkubasi, volume suspensi kuman *Escherichia coli*

3.4.2. Definisi Operasional Variabel

a. Konsentrasi daun kemangi (*Ocimum basilicum* Linn) adalah air perasan daun kemangi (*Ocimum basilicum* Linn) yang dihaluskan, diperas, dan disaring yang di katakan sebagai perasan murni 100%. Untuk kategori selanjutnya di buat pengenceran dalam berbagai konsentrasi yaitu konsentrasi 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% dan 10%. Serta konsentrasi 0% (tanpa pemberian) sebagai kontrol.

b. Pertumbuhan *Escherichia coli* yang tumbuh pada media *Eosin Methyline Blue* (EMB) berasal dari masing-masing konsentrasi yang ditetapkan berdasarkan kekeruhan atau kejernihan perasan daun kemangi (*Ocimum basilicum* Linn) setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37ºC.

c. Suhu penyimpanan pada penelitian ini adalah suhu 37ºC. Sedangkan lama inkubasinya adalah 24 jam. Volume suspensi kuman yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan hasil tera dari ose yang digunakan.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Metode pengumpulan data pada penelitian ini diperoleh dengan cara observasi tidak langsung. Yaitu melalui uji laboratorium dengan metode pengenceran (Dilusi). Langkah-langkah pemeriksaannya diantaranya sebagai berikut :

3.5.1 Prinsip Pemeriksaan

Perasan daun kemangi diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi, kemudian masing-masing konsentrasi ditambahkan suspensi bakteri uji dalam media cair. Perlakuan tersebut akan di inkubasi dan diamati pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan terjadinya kekeruhan (Pratiwi, 2008). Untuk menegaskan bahwa bakteri *Escherichia coli* tumbuh atau tidak, dilakukan tes penegasan dengan cara : hasil dari tabung pada uji tersebut ditanam di media *Eosin Methyline Blue* (EMB). Lalu di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37º C dan diamati koloni yang tumbuh.

3.5.2 Alat-alat yang digunakan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, pipet ukur, tabung reaksi, gelas arloji, pengaduk, gelas ukur, pipet pasteur, rak tabung, mortar, api spiritus, erlenmeyer, auto clave, filler, plate, ose bulat, lidi kertas steril, tabung sentrifuge, sentrifuge dan thermometer.

3.5.3 Bahan Pemeriksaan

Bahan pemeriksaan dalam penelitian ini adalah perasan daun kemangi dan suspensi kuman *Escherichia coli*.

3.5.4 Reagen dan Media

Reagen dan media yang digunakan dalam penelitian ini adalah NaOH 0,1 N, Aquadest steril, HCI 0,1 N, *Nutrient Agar* (NA), $BaCl_2$ 1%, *Eosin Methyline Blue* (EMB), H_2SO_4 1%, Alkohol dan PZ Steril.

3.5.5 Prosedur Pembuatan Suspensi Kuman

Pembuatan suspensi kuman sesuai dengan metode Mc. Farlan I, yaitu :

1. Menyiapkan dua tabung steril. Satu untuk suspensi dan satu lagi untuk standart Mc.Farlan I.
2. Prosedur membuat standart Mc.Farlan I, yaitu :
    1) Membuat perbandingan antara $BaCl_2$ 1% : H_2So_4 1% sebesar 1 : 90
    2) Memipet 0,1 ml $BaCl_2$ 1% ditambah dengan 9,9 ml H_2SO_4 1%
    3) Menghomogenkan dengan cara kocok pelan tabung standart Mc.Farlan I. Kekeruhannya sama dengan tiap 1 ml dari suspensi kuman mengandung 300 juta kuman (Soemarno, 2005).

3. Prosedur membuat suspensi kuman, yaitu :
    1) Mengisi tabung steril dengan PZ steril $\pm$ 5 ml.
    2) Mengambil kuman dari biakan *Escherichia coli* murni umur 24 jam yang sudah ditanam di media *Nutrien Agar Slant* (NAS) dengan lidi kapas steril.
    3) Menyelupkan lidi kapas steril yang sudah ada kumannya pada tabung yang berisi PZ steril.
    4) Membandingkan kekeruhan suspensi kuman dengan standart Mc.Farlan I.
    5) Apabila suspensi kurang keruh, maka tambahkan kuman dengan lidi kapas steril dan apabila terlalu keruh tambahkan PZ steril hingga kekeruhannya sama dengan standart Mc.Farlan I. maka suspense siap untuk digunakan.
4. Menstandartkan ose yang akan digunakan dalam penelitian, caranya adalah sebagai berikut :
    1) Menyiapkan pipet 0,1 ml, filler serta tabung reaksi.
    2) Memipet aquadest 0,1 ml masukkan kedalam tabung reaksi.
    3) Menyalakan api spiritus.
    4) Mengambil 1 mata ose bulat aquadest yang telah dimasukkan kedalam tabung reaksi dan memanaskan ose bulat tersebut diatas api spiritus. Dilakukan berulang kali sampai aquadest steril yang ada didalam tabung reaksi tersebut habis.

5) Didapatkan 30 mata ose aquadest steril tersebut habis

$$\frac{0{,}1 \text{ ml}}{30} = \frac{1}{300} \text{ /ml}$$

Jumlah kuman setiap 1 mata ose :

$$= \frac{300.000.000}{300}$$

= 1.000.000 kuman
(bila suspensi kuman per milliliter 300 juta kuman)

Jumlah kuman setiap 1 mata ose :

$$= \frac{1.000.000}{300}$$

= 3,333 kuman
(bila suspensi kuman per mililiternya 1 juta kuman)

3.5.6 Prosedur Pembuatan *Nutrient Agar Plate* (NAP)

1. Melakukan perhitungan media *Nutrient Agar* (NA)

   Membuat NAP (6 plate @ plate $\pm$ 17 ml $\longrightarrow$ 102 ml)

   Komposisi NA 20 gram per 1 liter $\longrightarrow \frac{20\ gram}{1000\ ml}$ x 102 ml = 2,04 gram
2. Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan
3. Menimbang bahan yaitu media *Nutrient Agar* (NA) sesuai dengan perhitungan yaitu 2,04 gram menggunakan timbangan
4. Mengukur volume aquadest steril sebanyak 102 ml menggunakan gelas ukur
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest steril yang sudah di ukur volumenya ke dalam Erlenmeyer
6. Memanaskan larutan tersebut diatas api spiritus sampai larut sempurna jangan sampai mendidih

7. Mengangkat larutan yang sudah dipanaskan dan mendinginkan dengan air yang telah disiapkan dibaskom sampai benar-benar hangat kuku
8. Mengukur pH nya sampai 7,4. Jika terlalu asam ditambahkan NaOH 0,1 N. jika terlalu basa maka ditambahkan HCI 0,1 N sampai pH benar 7,4
9. Menutup Erlenmeyer dengan kapas berlemak dan menyeterilkannya dengan auto clave pada suhu 121° C selama 15 menit
10. Setelah mengeluarkan media dari autoclave maka menuangkannya kedalam plate steril hingga merata
11. Mendiamkannya sampai terlihat pada lalu menyimpannya ke dalam lemari pendingin

3.5.7 Prosedur Pembuatan Konsentrasi Perasan Daun Kemangi

1. Memetik daun kemangi dari pohonnya
2. Mencuci daun sampai bersih dan bilas dengan aquadest steril
3. Menimbang daun kemangi yang segar sebanyak 100 gram
4. Menghaluskan daun sampai halus. Sebelumnya mortal diusap dengan alkohol agar steril
5. Menyaring daun kemangi yang sudah dihaluskan tadi dengan kertas saring yang steril. Menyaring sampai benar-benar jernih.
6. Menyentrifuge kembali perasan tadi yang ada di dalam tabung sentrifuge yang steril sehingga didapatkan perasan yang benar-benar jernih

7. Mengambil satu mata ose bulat perasan yang telah benar-benar jernih tersebut secara steril, lalu menanamnya ke media *Nutrient Agar Plate* (NAP) dengan cara menggoreskannya dipermukaan media
8. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C
9. Mengamati hasilnya jika tidak terjadi pertumbuhan kuman berarti perasan daun kemangi tadi sudah benar-benar steril. Tetapi jika pada media *Nutrient Agar Plate* (NAP) terdapat pertumbuhan kuman berarti perlu dilakukan proses tindalisasi (pemanasan bertingkat), yaitu :
    1) Memanaskan perasan daun kemangi dengan waterbath pada suhu 90°C selama 15 menit
    2) Kemudian meletakkannya di incubator selama 24 kam pada suhu 37°C
    3) Mengulangi perlakuan tersebut sampai 3 kali
10. Menanam kembali perasan daun kemangi yang sudah melalui proses tindalisasi dimedia *NAP* (*Nutrient Agar Plate*) dan menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37°C
11. Membuat konsentrasi 100%, 80%, 90%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% dan 0% (sebagai kontrol), yaitu :
    a. Konsentrasi 100% : Pada tabung no. 1 hanya diisi persanan daun kemangi konsentrasi 100%
    b. Konsentrasi 90% : Pada tabung no. 2 diisi 0,1 ml PZ steril lalu ditambahkan perasan daun kemangi konsentrasi 100% sebanyak 0,9 ml lalu di homogenkan

c. Konsentrasi 80% : Pada tabung no. 3 diisi 0,2 ml PZ steril lalu ditambahkan perasan daun kemangi konsentrasi 100% sebanyak 0,8 ml lalu di homogenkan

d. Konsentrasi 70% : Pada tabung no. 4 diisi 0,3 ml PZ steril lalu ditambahkan perasan daun kemangi konsentrasi 100% sebanyak 0,7 ml lalu dihomogenkan

e. Konsentrasi 60% : Pada tabung no. 5 diisi 0,4 ml PZ steril lalu ditambahkan perasan daun kemangi konsentrasi 100% sebanyak 0,6 ml lalu homogenkan

f. Konsentrasi 50% : Pada tabung no. 6 diisi 0,5 ml PZ steril lalu ditambahkan perasan daun kemangi konsentrasi 100% sebanyak 0,5 ml lalu homogenkan

g. Konsentrasi 40% : Pada tabung no. 7 diisi 0,6 ml PZ steril lalu ditambahkan perasan daun kemangi konsentrasi 100% sebanyak 0,4 ml lalu homogenkan

h. Konsentrasi 30% : Pada tabung no. 8 diisi 0,7 ml PZ steril lalu ditambahkan perasan daun kemangi konsentrasi 100% sebanyak 0,3 ml lalu homogenkan

i. Konsentrasi 20% : Pada tabung no. 9 diisi 0,8 ml PZ steril lalu ditambahkan perasan daun kemangi konsentrasi 100% sebanyak 0,2 ml lalu homogenkan

j. Konsentrasi 10% : Pada tabung no. 10 diisi 0,9 ml PZ steril lalu ditambahkan perasan daun kemangi konsentrasi 100% sebanyak 0,1 ml lalu homogenkan

k. Konsentrasi 0% : Pada tabung no. 11 diisi 1 ml PZ steril tanpa diberi tambahan perasan daun kemangi

(Susilowati, 2012)

3.5.8 Prosedur Pembuatan Media *Eosin Methyline Blue* (EMB)

1. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
2. Melakukan perhitungan terhadap jumlah bahan atau media *Eosin Methyline Blue* (EMB) yang dibutuhkan

   Membuat EMB (15 plate @ plate 17 ml ⟶ 255 ml

   Komposisi EMB 36 gram per 1 liter ⟶ $\frac{36\ gram}{1000\ ml}$ x 255 ml = 9,18 gram
3. Melakukan penimbangan bahan sebanyak 9,18 gram menggunakan timbangan
4. Mengukur volume aquadest yang dibutuhkan yaitu sebanyak 255 ml dengan gelas ukur
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang tadi dengan aquadest yang sudah diukur volumenya ke dalam Erlenmeyer
6. Memanaskannya diatas api spiritus sampai larut sempurna jangan sampai mendidih
7. Mengangkat larutan yang sudah larut sempurna dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai hangat-hangat kuku
8. Mengukur pH nya dengan cara menambahkan NaOH 0,1 N jika terlalu asam maka ditambahkan HCI 0,1 N jika terlalu basa sampai pH nya 7,2
9. Menutup larutan yang ada di Erlenmeyer dengan kapas berlemak dan koran serta mengikatnya dengan tali. Menyeterilisasi larutan tersebut bersama dengan plate yang dibutuhkan pada autoclave dengan suhu 121° C selama 15 menit

10. Setelah dikeluarkan dari autoclave, menuangkan larutan tadi kedalam plate. Masing-masing plate ±17 ml secara steril dekat dengan api
11. Mendiamkan media yang sudah dituang kedalam plate beberapa menit agar memadat. Jika sudah padat dimasukkan kedalam lemari pendingin

3.5.9 Prosedur Pemeriksaan Sampel

Hari pertama pemeriksaan :

1. Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan
2. Menyalakan api spiritus 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% (sebagai kontrol)
4. Mengambil suspensi kuman *Escherichia coli* sebanyak 1 mata ose bulat dengan ose bulat yang telah distandartkan. Dengan ketentuan 1 mata ose bulat sama dengan 1 juta kuman. Lalu menanamnya ke konsentrasi 100%. Masing-masing konsentrasi di perlakukan sama halnya seperti konsentrasi 100%. Semua perlakuan dilakukan secara steril dekat api
5. Menutup kembali tabung dengan kapas berlemak
6. Menginkubasi perasan yang sudah berisi kuman ke dalam incubator pada suhu 37° C selama 24 jam (Gustiani, 2013).

Hari kedua pemeriksaan :

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

Hari ketiga pemeriksaan :

1. Mengamati hasilnya pada media *Eosin Methyline Blue* (EMB) apakah terbentuk koloni yang mengidentifikasikan kuman tersebut adalah *Escherichia coli*.
2. Mencatat konsentrasi terkecil tadi sebagai daya hambat pertumbuhan kuman.
3. Mencatat hasil yang diamati sebagai data (Gustiani, 2013).

3.5.10 Tabulasi Data

Data yang diperoleh ditabulasikan sebagai berikut :

Tabel 3.1. Contoh tabulasi data hasil pemeriksaan

Kode Sampel	Jumlah pertumbuhan bakteri pada konsentrasi perasan daun kemangi										
	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%	K
Pengulangan 1											
Pengulangan 2											
Pengulangan 3											
Total											

Keterangan :

(+) : Perasan daun kemangi yang keruh dan adanya pertumbuhan bakteri

(-) : Perasan daun kemangi yang jernih dan tidak adanya pertumbuhan bakteri

3.6 Metode Analisis Data

Data yang diperoleh di analisis dengan menggunakan uji statistik Kruskal Wallis dengan tingkat kesalahan 5% ($\alpha = 0,05$)