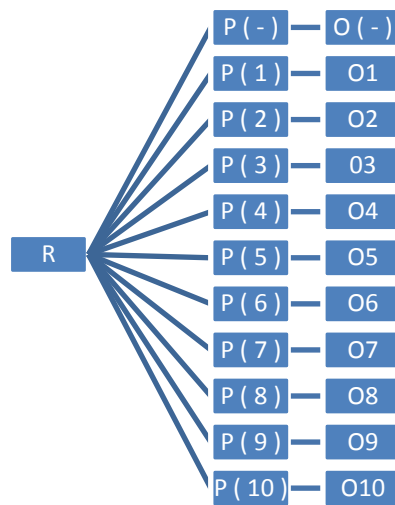


## BAB 3

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis dan Rancangan penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh perasan akar bayam merah (*Blitum rubrum*) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* dan untuk rancangan penelitiannya adalah sebagai berikut :



(Soekidjo, 2005).

Keterangan :

1. R : Random
2. P (-) : perlakuan tanpa diberi perasan akar bayam merah (*Blitum rubrum*)
3. P (1) : perlakuan dengan pemberian perasan akar bayam merah (*Blitum rubrum*) 100%
4. P (2) : perlakuan dengan pemberian perasan akar bayam merah (*Blitum rubrum*) 90%
5. P (3) : perlakuan dengan pemberian perasan akar bayam merah (*Blitum rubrum*) 80%

6. P (4) : perlakuan dengan pemberian perasan akar bayam merah (*Blitum rubrum*) 70%
7. P (5) : perlakuan dengan pemberian perasan akar bayam merah (*Blitum rubrum*) 60%
8. P (6) : perlakuan dengan pemberian perasan akar bayam merah (*Blitum rubrum*) 50%
9. P (7) : perlakuan dengan pemberian perasan akar bayam merah (*Blitum rubrum*) 40%
10. P (8) : perlakuan dengan pemberian perasan akar bayam merah (*Blitum rubrum*) 30%
11. P (9) : perlakuan dengan pemberian perasan akar bayam merah (*Blitum rubrum*) 20%
12. P (10) : perlakuan dengan pemberian perasan akar bayam merah (*Blitum rubrum*) 10%
13. O (-) : observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan tanpa pemberian perasan
14. O (1) : observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian perasan konsentrasi 100%
15. O (2) : observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian perasan konsentrasi 90%
16. O (3) : observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian perasan konsentrasi 80%
17. O (4) : observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian perasan konsentrasi 70%

18. O (5) : observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian perasan konsentrasi 60%
19. O (6) : observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian perasan konsentrasi 50%
20. O (7) : observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian perasan konsentrasi 40%
21. O (8) : observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian perasan konsentrasi 30%
22. O (9) : observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian perasan konsentrasi 20%
23. O (10) : observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian perasan konsentrasi 10%

## **3.2 Populasi dan Sampel Penelitian**

### **3.2.1 Populasi Penelitian**

Dalam penelitian ini populasinya adalah bakteri *Escherichia coli* yang didapatkan dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya (BBLK). Yang ditanam pada 30 plate media EMB.

### **3.2.2 Sampel Penelitian**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* pada masing – masing konsentrasi yang dilihat pertumbuhannya pada media EMB ( *Eosin Methyline Blue* ) setelah diinkubasi selama 24jam. Pengulangan sampel pada penelitian ini adalah 3 yang diperoleh dari :

$$(n - 1)(k - 1) > 15$$

$$(n - 1)(10 - 1) > 15$$

$$(n - 1)9 > 15$$

$$9n - 9 > 15$$

$$9n > 15 + 9$$

$$9n > 24$$

$$n > 24 : 9$$

$$n > 2,7$$

$$n > 3$$

(Hidayat, 2010).

keterangan :

n : Jumlah ulangan atau jumlah sampel

k : Jumlah kelompok

### **3.3 Lokasi dan Waktu penelitian**

#### **3.3.1 Lokasi Penelitian**

Pemeriksaan dilakukan dilaboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya

#### **3.3.2 Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai bulan Juni 2015 sedangkan waktu pemeriksaan dilaksanakan pada bulan Juni 2015.

### **3.4. Variabel Penelitian dan Definisi Oprasional Variabel**

#### **3.4.1. Varibel Penelitian**

Variable bebas : Perasan akar bayam merah ( *Blitum rubrum* )

Variable terikat : Pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*

Variable control : Volume suspensi bakteri, lama inkubasi

### 3.4.2. Definisi oprasional Variabel

1. perasan akar bayam merah ( *Blitum rubrum* ), akar yang ditumbuk kemudian diencerkan, dikategorikan menjadi berbagai macam konsentrasi, yaitu : 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% dan 0% ( kontrol )
2. Pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* adalah *Escherichia coli* yang tumbuh pada media EMB ( *Eosin Methyline blue* ) pada masing – masing konsentrasi, dikategorikan menjadi hitung jumlah koloni pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

### 3.5 Metode pengumpulan data

Data pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* diperoleh dengan cara observasi tidak langsung, yaitu melalui uji laboratorium, pemeriksaan bakteri *Escherichia coli* ini menggunakan metode dilusi. Langkah – langkah pemeriksaannya diantaranya sebagai berikut :

#### 3.5.1 Prinsip pemeriksaan

Senyawa antibakteri yang ada pada perasan akar bayam merah ( *Blitum rubrum* ) diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi, kemudian masing – masing konsentrasi ditambahkan suspensi bakteri uji dalam media cair. Perlakuan tersebut akan diinkubasi dan diamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan terjadinya kekeruhan. Untuk menegaskan bahwa bakteri *Escherichia coli* tumbuh atau tidak, dilakukan tes penegasan dengan cara : hasil dari tabung pada uji tersebut ditanam dimedia EMB ( *Eosin Methyline Blue* ). Lalu diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam ( Cita, 2004 ).

### 3.5.3 Alat – alat

- |                      |                       |
|----------------------|-----------------------|
| 1. Timbangan         | 10. Gelas ukur        |
| 2. Tabung reaksi     | 11. Pengaduk          |
| 3. Pipet Pasteur     | 12. Blender           |
| 4. Erlenmeyer        | 13. Autoclave         |
| 5. Pipet ukur        | 14. Lidi kapas steril |
| 6. Tabung centrifuge | 15. Gelas arloji      |
| 7. Rak tabung        | 16. Api spirtus       |
| 8. Kaki tiga         | 17. Filler            |
| 9. Ose               | 18. Plate             |

### 3.5.3 Bahan pemeriksaan

1. Perasan akar bayam merah ( *Blitum rubrum* )
2. Suspensi kuman *Escherichia coli*

### 3.5.4 Reagen dan media pemeriksaan

- |                                      |                    |
|--------------------------------------|--------------------|
| 1. NaOH 0,1N                         | 5. BaCL 1%         |
| 2. HCL 0,1N                          | 6. Aquadest steril |
| 3. BaCL <sub>2</sub> 1%              | 7. Media NA        |
| 4. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1% | 8. Media EMB       |

### 3.5.5 Prosedur Pembuatan Suspensi

Pembuatan suspensi kuman sesuai dengan metode Mc.Farlan 1,yaitu :

1. Menyiapkan 2 tabung steril, 1 untuk suspensi kuman dan yang 1 untuk standart Mc.Farlan 1.
2. Prosedur membuat Mc.Farlan 1, yaitu :
  - 1) Membuat perbandingan antara BaCL<sub>2</sub> 1% : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% sebesar 1 : 90.

- 2) Memipet 0,1 ml  $\text{BaCl}_2$  1% + 9,9 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1%.
- 3) Menghomogenkan dengan cara dikocok pelan tabung.

Standart Mc.Farlan 1 ini kekeruhannya sama dengan 1 ml dari suspensi kuman mengandung 300 juta kuman.

3. Prosedur pembuatan suspensi kuman, yaitu :

- 1) Mengisi tabung steril dengan pz 4ml.
- 2) Mengambil kuman dari biakan *Escherichia coli* murni umur 24jam yang sudah ditanam di media NAS ( Nutrient Agar Slint ) dengan lidi kapas steril.
- 3) Menyelupakan lidi kapas steril yang sudah ada kumannya pada tabung yang berisi pz.
- 4) Membandingkan kekeruhan suspensi kuman dengan Mc.Farlan 1.
- 5) Apabila suspensi kurang keruh, maka tambahkan pz hingga kekeruhannya sama dengan standart Mc.Farlan 1.

Suspensi sudah siap digunakan

4. Membuat standart ose yang akan dipakai penelitian :

- 1) Menyiapkan pipet 0,1 ml dan filler serta tabung.
- 2) Memipet aquadest 0,1 ml, kemudian menuangnya kedalam tabung.
- 3) Menyalakan api spiritus.
- 4) Mengambil 1 mata ose aquadest yang sudah dituang kedalam tabung dan memanaskan ose tersebut diatas api spirtus, lakukan berulang – ulang sampai aquadest dalam tabung habis.
- 5) Didapatkan 30 mata ose aquadest tersebut habis.

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

1 mata ose = 1 juta kuman ( bila suspensi kuman per milliliter 300 juta kuman ) (Cita, 2004).

### 3.5.6 Prosedur pembuatan Media Nutrient Agar Plate (NAP)

#### 1. Melakukan perhitungan media Nutrient Agar (NAP)

Membuat NAP 5 plate @plate 17 ml

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

2. Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan.
3. Menimbang bahan ( media NA ) sesuai dengan perhitungan yaitu 1,7 gr menggunakan timbangan.
4. Mengukur volume aquadest sebanyak 74ml menggunakan gelas ukur.
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest yang sudah diukur volumenya dengan Erlenmeyer.
6. Memanaskan larutan diatas api spiritus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih.
7. Mengangkat larutan yang sudah dipanaskan dan dinginkan dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam – suam kuku.
8. Mengukur pH nya sampa 7,4 jika terlalu asam menambahkannya dengan NaOH 0.1N, sedangkan jika terlalu basa menambahkannya dengan HCL 0,1N sampai pHnya 7,4.
9. Menutup Erlenmeyer dengan kapas berlemak dan menyeterilkannya dengan autoclave pada suhu 121° C selama 15 menit.
10. Setelah turun dari autoclave, menuangkannya kedalam plate yang steril sampai rata.



11. Mendingkannya sampai terlihat padat dan kemudian menyimpannya ke almari es ( Cita,2004 ).

### **3.5.7 Prosedur pembuatan perasan akar bayam merah ( *Blitum rubrum* )**

1. Memetik akar bayam merah ( *Blitum rubrum* ).
2. Mencuci akar bayam merah ( *Blitum rubrum* ) dan yang terakhir dicuci dengan aquadest steril.
3. Menghaluskan akar bayam merah ( *Blitum rubrum* ) samai halus. Sebelumnya mortir diusap dengan alcohol agar steril.
4. Menyaring akar bayam merah ( *Blitum rubrum* ) yang sudah dihaluskan tadi dengan kasa berlapis yang steril. Menyaring sampai benar – benar jernih.
5. Menyentrifuge kembali perasan tadi ditabung centrifuge yang steril sehingga didapatkan perasan yang benar – benar jernih.
6. Mengambil satu mata ose perasan yang sudah jernih secara steril, kemudian menanamnya pada media NAP ( *Nutrient Agar Plate* ), dengan cara menggoreskannya dipermukaan media.
7. Inkubasi selama 24 jam 37° C.
8. Mengamati hasilnya, jika tidak terjadi pertumbuhan kuman berarti perasan akar bayam merah ( *Blitum rubrum* ) tadi sudah benar – benar steril. Namun jika pada media NAP terdapat pertumbuhan kuman berarti perlu dilakukan proses tindalisasi, yaitu :
  - 1) Memanaskan perasan akar bayam merah ( *Blitum rubrum* ) dengan waterbath pada suhu 90° C selama 15 menit.
  - 2) Kemudian meletakkannya diinkubator selama 24jam pada suhu 37° C.
  - 3) Mengulangi perlakuan tersebut sampai 3 kali.

9. Menanam kembali perasan akar bayam merah ( *Blitum rubrum* ) yang sudah melalui proses tindalisasi di media NAP dan menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37° C.
10. Membuat konsentrasi 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40% 30%, 20%, dan 10% pz steril, yaitu :
  - 1) Konsentrasi 100 % : tabung 1 di isi 1 ml perasan awal, itu sebagai konsentrasi 100%.
  - 2) Konsentrasi 90 % : tabung 2 di isi 0,1 ml aquadest steril ditambahkan perasan akar bayam merah ( *Blitum rubrum* ) konsentrasi 100 % sebanyak 0,9 ml, dihomogenkan.
  - 3) Konsentrasi 80 % : tabung 3 di isi 0,2 ml aquadest steril ditambahkan perasan akar bayam merah ( *Blitum rubrum* ) konsentrasi 100 % sebanyak 0,8 ml, dihomogenkan.
  - 4) Konsentrasi 70 % : tabung 4 di isi 0,3 ml aquadest steril ditambahkan perasan akar bayam merah ( *Blitum rubrum* ) konsentrasi 100 % sebanyak 0,7 ml, dihomogenkan.
  - 5) Konsentrasi 60 % : tabung 5 di isi 0,4 ml aquadest steril ditambahkan perasan akar bayam merah ( *Blitum rubrum* ) konsentrasi 100 % sebanyak 0,6 ml, dihomogenkan.
  - 6) Konsentrasi 50 % : tabung 6 di isi 0,5 ml aquadest steril ditambahkan perasan akar bayam merah ( *Blitum rubrum* ) konsentrasi 100 % sebanyak 0,5 ml, dihomogenkan.

- 7) Konsentrasi 40 % : tabung 7 di isi 0,6 ml aquadest steril ditambahkan perasan akar bayam merah ( *Blitum rubrum* ) konsentrasi 100 % sebanyak 0,4 ml, dihomogenkan.
- 8) Konsentrasi 30 % : tabung 8 di isi 0,7 ml aquadest steril ditambahkan perasan akar bayam merah ( *Blitum rubrum* ) konsentrasi 100 % sebanyak 0,3 ml, dihomogenkan.
- 9) Konsentrasi 20 % : tabung 9 di isi 0,8 ml aquadest steril ditambahkan perasan akar bayam merah ( *Blitum rubrum* ) konsentrasi 100 % sebanyak 0,2 ml, dihomogenkan.
- 10) Konsentrasi 10 % : tabung 10 di isi 0,9 ml aquadest steril ditambahkan perasan akar bayam merah ( *Blitum rubrum* ) konsentrasi 100 % sebanyak 0,1 ml, dihomogenkan.
- 11) Konsentrasi 0 % : tabung 11 di isi 1 ml aquadest steril tanpa diberi tambahan perasan akar bayam merah ( *Blitum rubrum* )  
( Cita,2004 ).

### 3.5.8 Prosedur pembuatan media *Eosin methylen blue* (EMB)

1. Menyiapkan alat dan bahan
2. Melakukan perhitungan terhadap jumlah bahan media EMB ( *Eosin methylen blue* ) yang dibutuhkan  
  
Membuat EMB 15plate, @plate 17 ml  
  
Komposisi EMB 36 gr per 1 liter →  $36 \text{ gr} / 1000 \text{ ml} \times 255 \text{ ml} = 9,18 \text{ gr}$
3. Melakukan penimbangan bahan sebanyak 9,18 gr 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 kedalam Erlenmeyer.
6. Memanaskan diatas api spirtus sampai larut sempurna jangan samapai mendidih.
7. Mengangkat larutan yang sudah larut sempurna dan mendingkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam – suam kuku.
8. Mengukur ph nya dengan cara menambahkan NaOH 0,1N jika terlalu asam dan menambahkan HCL 0,1N jika terlalu basa sampai ph 7,2.
9. Menutup larutan yang ada dierlenmeyer dengan kasa berlemak dan Koran serta mengikatnya dengan tali. Menyeterilisasi larutan tersebut bersama dengan plate yang dibutuhkan pada autoclave dengan suhu.
10. Setelah turun dari autoclave, tuang larutan kedalam plate masing – masing plate 17ml secara steril dekat dengan gas.
11. Mendingkan media yang sudah dituang kedalam plate beberapa menit agar memadat, kemudian jika sudah padat taruh di almari es (Cita,2004).

### **3.5.9 Prosedur Pemeriksaan Sampel**

#### **1. Hari pertama pemeriksaan :**

- 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 satu mata ose sama dengan

1 juta kuman. Kemudian menanamnya kekonsentrasi 100%. Masing – masing konsentrasi diperlakukan sama halnya seperti konsentrasi 100%. Semua perlakuan dilakukan secara steril dekat dengan api

- 5) Menutup kembali tabung dengan kapas berlemak
- 6) Inkubasi pada suhu 37° C selama 24jam ( Cita,2004 ).

## **2. Hari kedua**

- 1) Mengamati masing – masing tabung, apakah terjadi kekeruhan atau tidak
- 2) Mengambil konsentrasi terkecil yang mulai terlihat keruh, dan menguji kembali ke media EMB dengan tujuan memastikan apakah kuman tersebut adalah *Escherichia coli*
- 3) Memanaskan ose bulat diatas nyala api spirtus, mengambil 1 mata ose kuman yang ada pada konsentrasi terkecil
- 4) Menanamnya dimedia EMB dengan cara menggoreskannya di media. Inkubasi kembali pada suhu 37° C selama 24 jam ( Cita,2004 )

## **3. Hari ketiga**

- 1) Mengamati hasilnya pada media EMB apakah terbentuk 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,2004 ).

### **3.5.10 Tabulasi data**

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

Tabel 3.1. Contoh tabulasi data

No	Kode Sampel	Pertumbuhan <i>Escherichia coli</i> di media EMB pada masing – masing konsentrasi										
		100 %	90 %	80 %	70 %	60 %	50 %	40%	30%	20%	10%	0%
1	A											
2	B											
3	C											
Jumlah												

### 3.5.11 Metode analisa data

Setelah diperoleh hasil dalam bentuk table, data kemudian dianalisis dengan anova untuk mengetahui pengaruh perasan akar bayam merah (*Blitum rubrum*) dengan tingkat kesalahan 0,05.