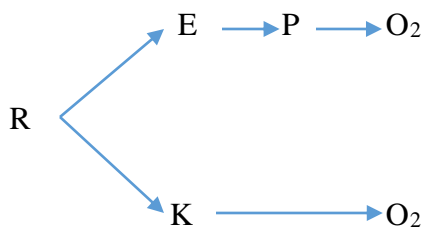


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah jenis penelitian eksperimental, karena mempunyai 3 variabel. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh rendaman kulit pisang kepok (*Musa balbisiana*) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Dengan menggunakan rancangan seperti dibawah ini.



Keterangan :

R : Random

K : Kontrol

E : Eksperimental

P : Perlakuan

O₂: Hasil observasi setelah diberi perlakuan

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah biakan murni bakteri *Escherichia coli* dari biakan murni Departement Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.2.2 Sampel Penelitian

Pada penelitian ini sampel diulang sebanyak 4 kali pada setiap perlakuan yg dilakukan. Dari rumus $(t-1)(r-1) \geq 15$, maka perhitungan yang dilakukan sebagai berikut :

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

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

$$1(r-1) \geq 15$$

$$r-1 \geq 15$$

$$r \geq 16 \quad (\text{Federer, 2010})$$

Maka jumlah replikasi adalah 16 pada setiap kelompok perlakuan

Keterangan :

t : Jumlah kelompok

r : Jumlah pengulangan

3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

3.3.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2019 sampai dengan Juni 2019, adapun waktu pemeriksaan dilakukan sampai dengan Juni 2019.

3.3.2 Lokasi Penelitian

Sampel yang digunakan adalah kulit pisang kepok (*Musa balbisiana*) dibeli dari pasar Kapas Krampung, Surabaya. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium

Mikrobiologi Program Studi D3 Teknologi Laboratorium Medis Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya, Jalan Sutorejo 59 Surabaya.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

Variabel bebas : Rendaman kulit pisang kepok (*Musa balbisiana*).

Variabel terikat : Pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

Variabel Kontrol : Waktu inkubasi, suhu, tingkat kekeruhan kuman / OD(Optical Density), konsentrasi sampel, metode pemeriksaan, tingkat kematangan pisang, media pertumbuhan, jenis bakteri.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

1. Rendaman adalah menaruh suatu bahan didalam air dengan waktu beberapa lama. Rendaman kulit pisang kepok adalah dengan menaruh kulit pisang yang telah dipotong beberapa bagian lalu dimasukkan ke dalam aquades. Dengan waktu dua jam kemudian disaring.
2. Tingkat kematangan pisang kepok yang digunakan adalah pisang yang dibeli lalu disimpan dengan waktu 3 hari hingga matang dengan kulit yang berwarna kekuningan, hingga timbul corak hitam di kulit pisang.
3. Bakteri *Escherichia coli* dikatakan tumbuh adalah dengan munculnya koloni berwarna hijau metalik pada media EMB (*Eosin Methylene Blue Agar*) yang telah diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.

4. Suhu adalah temperatur yang digunakan bakteri aerob mesofil untuk berkembang biak dengan baik yaitu suhu 37°C.
5. Waktu inkubasi adalah waktu optimal yang dibutuhkan bakteri untuk memperbanyak diri. Waktu yang tepat yaitu 1x24 jam.
6. Optical Density (OD) adalah tingkat kekeruhan bakteri yang sudah distandartkan dengan standart Mc Farland yaitu 0,5.

3.5 Teknik Pengumpulan Data

Data pertumbuhan *Escherichia coli* diperoleh dengan pengamatan tidak langsung dengan melalui uji laboratorium. Pemeriksaan adanya pengaruh atau tidak pada bakteri *Escherichia coli* menggunakan metode dilusi.

3.5.1 Prinsip Pemeriksaan

Antibakteri yang ada didalam rendaman kulit pisang di encerkan sampai memperoleh beberapa konsentrasi, lalu diuji dalam media cair dengan ditambahkan suspensi bakteri. Perlakuan ini lalu diinkubasi dan diamati apakah ada pertumbuhan dari bakteri atau tidak.

3.5.2 Persiapan Alat dan Bahan untu Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : Neraca digital, Erlenmeyer, Beaker glass, pengaduk, kaki tiga, Bunsen, kasa asbes, cawan Petri, ose bulat, ose jarum, filler, *autoclave*, gelas arloji, tabung, Laminar Air Flow (LAF).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : rendaman kulit pisang kepok dengan konsentrasi 100%, suspensi kuman *Escherichia coli*, kasa, kertas pH, kertas saring, media *Nutrient Agar Plate* (NAP), media *Nutrient*

Agar Slant (NAS), media *Eosin Methylene Blue* (EMB), media Boilon, larutan H₂SO₄ 1%, larutan BaCl 1%.

3.5.3 Prosedur Persiapan Pemeriksaan

A. Pembuatan Suspensi Kuman

Pembuatan suspensi kuman dengan metode Mac Farland 0,5 untuk membuat suspensi kuman dengan cara sebagai berikut :

1. Disiapkan 2 tabung steril yang digunakan untuk suspensi dan standart Mac Farland 0,5.
2. Pembuatan standart Mac Farland 0,5 :
 - a. BaCl 1% dipipet sebanyak 0,05 ml kedalam H₂SO₄ 9,95 ml lalu dihomogenkan
 - b. Campuran antara BaCl 1% : H₂SO₄ disiapkan dengan perbandingan 0,05 : 9,95 atau 1 : 199
 - c. Standart Mac Farland 0,5 setara dengan $1,5 \times 10^8$ kerapatan kuman (Sutton, 2011).
3. Pembuat suspensi kuman :
 - a. Media boilon sebanyak 3 ml disiapkan dalam tabung yang steril.
 - b. Biakan murni bakteri *E. coli* diambil pada media NAS dengan lidi ose bulat.
 - c. Dihomogenkan ose bulat dengan bakteri kedalam tabung berisikan boilon dengan cara mencelupkan ose bulat 2-3 kali ke boilon.
 - d. Lalu menyimpannya dalam inkubator dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.

- e. Suspensi yang telah dibuat dibandingkan dengan standart Mc Farland 0,5 sampai kekeruhannya sama.
 - f. Bila suspensi terlalu terlalu keruh saat dibandingkan dengan Mc Farland, maka ditambahkan PZ atau NaCl 0,9 sampai keruhannya sama dengan Mc Farland.
 - g. Bila suspense kurang keruh maka ditambahkan bakteri lagi.
4. Tera Ose untuk ose yang akan digunakan dalam penelitian :
- Untuk mengetahui berapa banyak bakteri yang dapa diambil dengan 1 ose.
- a. Aquadest 0,1ml diambil dengan pipet, dimasukkan dalam tabung steril.
 - b. Api spirtus dinyalakan.
 - c. Aquadest diambil 1 mata ose kemudian bakar diatas api spirtus hingga aquadest yang ada di ose tersebut habis. Lakukan berulang sampai aquadest dalam tabung habis.
 - d. Setelah aquadest habis, didapatkan 20 mata ose.

$$\frac{0,1 \text{ ml}}{20} = \frac{1}{200} \text{ ml}$$

B. Pembuatan Rendaman Air Kulit Pisang

1. Dengan menggunakan perbandingan 1:1 antara pisang dengan aquadest
2. Menimbang 100gr kulit pisang kepok yang berwarna kuning.
3. Memotong kecil-kecil kulit pisang kepok.
4. Memasukkan kulit pisang kepok ke dalam aquadest steril sebanyak 100 ml.
5. Menyimpan selama 24 jam.

C. Uji Sterilisasi Air Rendaman

1. Setelah 24 jam, saring menggunakan kasa steril dalam LAF.
2. Mengambil 1 mata ose air rendaman kulit pisang, lalu menanam pada media NAP dengan cara menggoreskan ose bulat pada permukaan media.
3. Menginkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
4. Mengamati hasil, apabila pada media sudah tidak ada bakteri yang tumbuh maka air rendaman kulit pisang kepok (*Musa balbisiana*) sudah benar-benar steril. Apabila pada media NAP masih ada bakteri maka perlu dilakukan proses tindalasi, yaitu :
 - a. Memanaskan air rendaman kulit pisang kepok (*Musa balbisiana*) pada waterbath dengan suhu 90°C selama 15 menit
 - b. Meletakkan pada inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C
 - c. Menanam kembali pada media NAP dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Untuk mengetahui apakah ada bakteri yang tumbuh.
 - d. Ulangi tahap diatas apabila masih ada bakteri yang tumbuh
5. Membuat konsentrasi 100% dengan mengisi tabung dengan air rendaman kulit pisang kepok (*Musa balbisiana*) sebanyak 1ml

3.5.4 Prosedur Pemeriksaan Sampel.

3.5.4.1 Hari Pertama :

1. Menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan
2. Menyalakan api spirtus

3. Dipanaskan ose bulat pada api spirtus, lalu ose dimasukkan pada suspense kuman untuk mengambil kuman. Lalu membiakkan kuman pada tabung dengan konsentrasi 100% dengan mencelupkan ose sebanyak 3 kali melalui dinding tabung. Lakukan prosedur tersebut pada tabung yang hanya berisikan boilon
4. Menutup tabung dengan kapas kasa
5. Menginkubasi tabung-tabung tersebut dengan suhu 37°C selama 24 jam

3.5.4.2 Hari Kedua :

1. Mengamati tabung-tabung tersebut, terjadi kekeruhan ataupun tidak.
2. Mengambil dari masing-masing tabung dengan ose lalu di tanam pada media EMB dan diamati apakah kuman yang tumbuh.
3. Dipanaskan ose bulat pada api spirtus, lalu mengambil biakan pada masing-masing tabung. Menggoreskan ose pada media EMB dengan metode pembagian Y
4. Menginkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam

3.5.4.3 Hari Ketiga :

1. Mengamati hasil pada media, apakah terbentuk koloni yang mengidentifikasi bakteri *E.coli* atau bukan
2. Mencatat hasil sebagai data

3.6 Pengumpulan Data dan Analisa Data

3.6.1 Metode Pengumpulan Data

Data yang diperoleh dari pemeriksaan air rendaman kulit pisang kepok terhadap *E.coli* selama 3 hari dengan menggunakan metode dilusi disajikan dalam bentuk Tabel 3.1

Tabel 3.1 Contoh table hasil pemeriksaan Pengaruh Air Rendaman Kulit Pisang Kepok Terhadap *Escherichia coli*

Kelompok Kontrol		Kelompok Perlakuan	
Kode	Hasil Hitung Koloni	Kode	Hasil Hitung Koloni
K1		P1	
K2		P2	
K3		P3	
K4		P4	
K5		P5	
K6		P6	
K7		P7	
K8		P8	
K9		P9	
K10		P10	
K11		P11	
K12		P12	
K13		P13	
K14		P14	
K15		P15	
K16		P16	
Jumlah		Jumlah	
Rata-rata		Rata-rata	
SD		SD	

3.6.2 Metode Analisa Data

Data pertumbuhan bakteri dianalisis dengan uji normalitas lalu dilanjutkan dengan uji homogenitas setelah itu dilanjutkan dengan uji T bebas dengan nilai signifikan 0,05. Data dapat dianalisa menggunakan uji T bebas jika memenuhi syarat sebagai berikut :

1. Data untuk dua sampel bersifat independen
2. Sampel acak dari distribusi normal