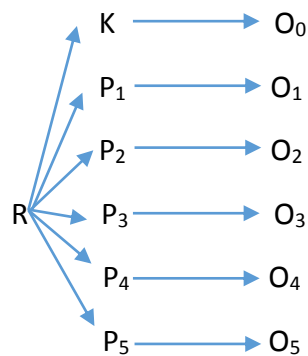


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah jenis penelitian eksperimental,. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya hambat ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) terhadap pertumbuhan bakteri *E.coli*. Dengan menggunakan rancangan seperti dibawah ini.



Keterangan :

R : Random

K : Kontrol

P1: Perlakuan dengan memberi ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) 20%

P2: Perlakuan dengan memberi ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) 40%

P3: Perlakuan dengan memberi ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) 60%

P4: Perlakuan dengan memberi ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) 80%

P5: Perlakuan dengan memberi ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) 100%

O0: Observasi pertumbuhan bakteri tanpa diberi ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill)

O1: Observasi pertumbuhan bakteri setelah diberi ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) 20%

- O2: Observasi pertumbuhan bakteri setelah ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) 40%
- O3: Observasi pertumbuhan bakteri setelah diberi ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) 60%
- O4: Observasi pertumbuhan bakteri setelah diberi ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) 80%
- O5: Observasi pertumbuhan bakteri setelah diberi ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) 100%

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah biakan murni bakteri *E.coli* dari biakan murni di Laboratorium Mikrobiologi Progam studi D3 Teknik Laboratorium Medik Fakultas Ilmu kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya, Jalan Sutorejo 59 Surabaya.

3.2.2 Sampel Penelitian

Pada penelitian ini adalah *E.coli* dalam penelitian ini setiap perlakuan diulang sebanyak 4 kali. Pengulangan diperoleh Dari rumus yaitu $(t-1)(r-1) \geq 15$, maka perhitungan yang dilakukan sebagai berikut :

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

$$(7-1)(r-1) \geq 15$$

$$6(r-1) \geq 15$$

$$6r-5 \geq 15$$

$$6r \geq 20$$

$$r \geq 4 \quad (\text{Federer, 2010})$$

Maka jumlah replikasi adalah 4 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 Juni 2019 sampai dengan Juli 2019, adapun waktu pemeriksaan dilakukan sampai dengan Juli 2019.

3.3.2 Lokasi Penelitian

Sampel yang digunakan adalah daun alpukat (*Persea americana* Mill). Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi D3 Teknik Laboratorium Medik 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 : pemberian Ekstrak daun alpukat.

Variabel terikat : Pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*

Variabel control : Volume ekstrak 100 mikroliter, OD, waktu inkubasi, suhu, konsentrasi sampel, lubang sumuran atau alat *cork borer* ukuran (5)

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

1. Ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) adalah sediaan pekat yang didapat dengan mengekstraksi zat aktif, menggunakan pelarut etanol 96%, yang dibuat dengan berbagai konsentrasi mulai dari 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.
2. Daun alpukat (*Persea americana* Mill) yang digunakan adalah daun yang masih hijau segar lalu dibersihkan dengan air mengalir untuk

menghilangkan kotoran dan yang lainnya, lalu dilakukan proses pengeringan pada daun alpukat selama 24 jam dengan cara di angin-anginkan yang tidak langsung dibawah sinar matahari. Proses pengeringan ini bertujuan untuk mendapatkan ekstrak yang tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan lebih lama.

3. Pertumbuhan *Escherichia coli* adalah dikatakan tumbuh dengan munculnya koloni berwarna hijau metalik karena memfermentasi laktosa atau baktare yang dapat memfermentasi sukrosa pada media EMB (*Eosin Methylene Blue Agar*) yang telah diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.
4. Suhu adalah temperature yang digunakan bakteri aerob dikarenakan bakteri aerob membutuhkan oksigen (O_2) untuk bernafas.
5. Inkubasi adalah keadaan dimana bakteri berkembang biak. Pada waktu yang tepat untuk menginkubasi selama 1x24 jam.
6. *Optical Density* (OD) adalah tingkat kekeruhan bakteri yang sudah distandartkan dengan standart Mc Farland yaitu 0,05.

3.5 Teknik Pengumpulan Data

Daya zona hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* diperoleh dengan pengamatan langsung dengan melalui uji laboratorium. Daya hambat pertumbuhan bakteri dikategorikan seperti pada tabel 3.1 :

Gambar tabel 3.1 Data zona hambat dari yang lemah sampai sedang pada setiap konsentrasi ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill).

Diameter Zona Hambat (mm)	Aktivitas antibakteri
< 15 mm	+ (Resisten)
15– 20 mm	++ (Intermediant)
>20 mm	+++ (Sensitife)

Pemeriksaan adanya pengaruh atau tidak pada bakteri *Escherichia coli* menggunakan metode difusi. Dengan langkah-langkah berikut ini :

3.5.1 Prinsip Pemeriksaan

Antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumuran, dikarenakan metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan untuk metode lubang\sumuran. Metode ini dapat digunakan untuk melihat daerah bening yang dihasilkan disekitar lubang sumur yang dibuat. Daerah bening yang disekitar sumur inilah yang disebut zona hambat. Menggunakan metode difusi sumuran dilakukan dengan cara membuat lubang-lubang pada media yang telah mengandung bakteri dengan menggunakan yellow tip dengan ukuran pada alat *cork borer* yang bertulis 5, sebanyak 4 lubang pada setiap plate (Rezqy N, 2017). Kemudian memasukkan larutan ekstrak kedalam lubang tersebut. Dengan berbagai konsentrasi lalu membiarkan cawan petri selama 10 menit untuk melakukan proses difusi kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah 24 jam mengamati daerah pertumbuhan bakteri yang terjadi dan mengukur diameter dalam milimeter dengan menggunakan jangka

sorong/penggaris (termasuk diameter lubang) minimal sebanyak tiga kali pengukuran.

3.5.2 Persiapan Alat dan Bahan

A. Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain :

timbangan, Erlenmeyer, Beaker glass, pengaduk, kaki tiga, Bunsen, kasa asbes, cawan Petri, ose bulat, ose jarum, filler, *autoclave*, kertas saring, gelas arloji, tabung, *cork borer*.

B. bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain :

ekstrak daun alpukat dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100% suspensi kuman *Escherichia coli*, kasa, kertas pH, media *Mueller Hinton* (MH), media *Nutrient Agar Slant* (NAS), media Eosin Methylene Blue (EMB) media Boilon, larutan H₂SO₄ 1%, larutan BaCl 1%.

3.5.3 Prosedur Pembuatan

A. Prosedur Pembuatan Media Muller Hinton (MH)

1. Alat dan bahan yang dibutuhkan di siapkan
2. Media MH yang dibutuhkan dihitung dengan rumus :

MH 34gram/liter, membuat MH sebanyak 10 plate @18ml

$$\text{Gram MH} = \frac{34 \text{ gram} \times 180 \text{ ml}}{1000} = 6,12 \text{ gr}$$

1000

3. Serbuk media MH ditimbang sebanyak 6,12 gram
4. Aquades yang dibutuhkan yaitu sebanyak 180 ml dan diukur dengan gelas ukur
5. Bahan yang ditimbang tadi dilarutkan dengan aquades yang sudah diukur volumenya dengan erlenmeyer

6. Media dipanaskan diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih
7. Media yang sudah larut sempurna kemudian disuam-suam dalam baskom berisi air
8. pH disesuaikan sebesar 7,4
9. Media di erlenmeyer ditutup dengan kapas berlemak dan koran serta mengikatnya
10. Media dan alat yang dibutuhkan disterilisai dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit
11. Setelah turun dari autoklaf, media dituang dalam plate yang telah steril dengan volume media 18ml kedalam plate, setelah dingin dan memadat disimpan dalam lemari es

B. Pembuatan Kontrol Positif Amoksisilin

Tablet amoksisilin 500 mg digerus dan dilarutkan dalam 5ml aquadest steril sehingga didapat konsentrasi 100 mg/ml (Gusti Ayu,2018).

C. Pembuatan Standart Mc.Farland

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 :
 - a. Campuran antara BaCl 1% : H₂SO₄ disiapkan dengan perbandingan 0,05 : 9,95

- b. BaCl 1% dipipet sebanyak 0,05 ml kedalam H₂SO₄ 9,95 ml lalu dihomogenkan
 - c. Standart Mac Farland 0,5 setara dengan 1,5x10⁸ 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 kapas steril.
 - c. Dihomogenkan lidi kapas dengan bakteri kedalam tabung berisikan boilon.
 - d. Lalu menyimpannya dalam incubator dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C
 - e. Suspensi yang telah dibuat dibandingkan dengan standart Mc Farland 0,5
4. Tera Ose untuk ose yang akan digunakan dalam penelitian :
- 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.

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

D. Persiapan daun Alpukat (*Persea americana* Mill)

Alat : Pisau, karung

Bahan : Daun Alpukat (*Persea americana* Mill)

Prosedur :

1. Memilih daun Alpukat (*Persea americana* Mill) yang tidak terlalu tua dan muda dilihat dari warnanya yang hijau dan segar.
2. Memetik daun Alpukat (*Persea americana* Mill) dengan menggunakan pisau
3. Mengumpulkan daun Alpukat (*Persea americana* Mill) dan dimasukkan kedalam karung yang sudah di sediakan.

E. Pembuatan sediaan Serbuk daun Alpukat (*Persea americana* Mill)

Alat : Gunting, blender, nampan plastik, dan ayakan kassa

Bahan : Alpukat (*Persea americana* Mill)

Prosedur :

1. Membersihkan daun Alpukat (*Persea americana* Mill) dengan air bersih
2. Memisahkan daun Alpukat (*Persea americana* Mill) dari tangkainya
3. Meletakkan potongan daun Alpukat (*Persea americana* Mill) di atas nampan plastik, lalu di angin-anginkan yang tidak langsung dibawah sinar matahari selama 3x24 jam.
4. Setelah daun Alpukat (*Persea americana* Mill) kering dan mudah di haluskan, lalu di blander sampai halus, kemudian di ayak sehingga di dapatkan serbuk halus.

F. Pembuatan Sediaan ekstrak daun Alpukat (*Persea americana* Mill)

Alat : neraca timbang, toples kaca, gelas ukur, corong corong buncher, kertas saring, rotary evaporator

Bahan : Serbuk halus daun Alpukat (*Persea americana* Mill), etanol 96%

Prosedur : di Lab Biologi Unair

1. Disiapkan alat dan bahan yang digunakan
2. Daun Alpukat (*Persea americana* Mill) yang sudah di haluskan ditimbang dengan menggunakan neraca analitik sebanyak 100 gram
3. Serbuk daun Alpukat (*Persea americana* Mill) yang sudah di timbang di rendam dengan pelarut etanol 96% sebanyak 300 ml selama 24 jam
4. Hasil rendaman disaring dengan menggunakan corong buncher sehingga menghasilkan filtrate sebanyak 200 mg / ml
5. Filtrate daun Alpukat (*Persea americana* Mill) tersebut kemudian di uapkan menggunakan vacum rotary evaporator
6. Setelah itu akan menghasilkan ekstrak kental (larutan induk konsentrasi 100%)

G. Perhitungan pembuatan konsentrasi ekstrak menggunakan rumus sebagai berikut : (Mita suci Afrilla, 2011)

$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$ dengan cara :

A. (20%) : $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$

$$: V_1 \times 100\text{mg/ml} = 10 \times 20 \text{ mg/ml}$$

$$: V_1 = 100\text{mg/ml} : 200\text{mg/ml}$$

$$: V_1 = 2 \text{ ml}$$

B. (40%) : $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$

$$: V_1 \times 100\text{mg/ml} = 10 \times 40 \text{ mg/ml}$$

$$: V_1 = 100\text{mg/ml} : 400 \text{ mg/ml}$$

$$: V_1 = 4 \text{ ml}$$

$$C. (60\%) : V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$: V_1 \times 100\text{mg/ml} : 10 \times 60\text{mg/ml}$$

$$: V_1 := 100\text{mg/ml} : 600 \text{ mg/ml}$$

$$: V_1 = 6 \text{ ml}$$

$$D. (80\%) : V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$: V_1 \times 100\text{mg/ml} = 10 \times 80\text{mg/ml}$$

$$: V_1 : 100\text{mg/ml} : 800\text{mg/ml}$$

$$: V_1 : 8 \text{ ml}$$

$$E. (100\%) : V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$: V_1 \times 100\text{mg/ml} = 10 \times 10\text{mg/ml}$$

$$: V_1 : 100\text{mg/ml} : 100\text{mg/ml}$$

$$: V_1 : 10 \text{ ml}$$

Keterangan : V_1 = volume larutan ekstrak etanol yang diambil (ml)

C_1 = konsentrasi ekstrak etanol yang diambil (mg/ml)

V_2 = volume larutan yang akan diambil (ml)

C_2 = konsentrasi larutan yang akan dibuat (mg/ml)

H. Membuat konsentrasi :

1. Konsentrasi 100% : mengisi tabung A dengan ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) sebanyak 10 ml dan etanol 96% sebanyak 10 ml
2. Konsentrasi 80% : mengisi tabung B dengan ekstrak daun alpukat(*Persea americana* Mill) sebanyak 8 ml dan etanol 96% sebanyak 10 ml
3. Konsentrasi 60% : mengisi tabung C dengan ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) sebanyak 6 ml dan etanol 96% sebanyak 10 ml

4. Konsentrasi 40% : mengisi tabung D dengan ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) sebanyak 4 ml dan etanol 96% sebanyak 10 ml
5. Konsentrasi 20% : mengisi tabung E dengan ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) sebanyak 2 ml dan etanol 96% sebanyak 10 ml

3.5.4 Prosedur Pemeriksaan Sampel.

Prosedur : Pemeriksaan sampel adalah sebagai berikut.

Hari Pertama :

1. Menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan
2. Menyalakan api spiritus
3. Melabeli tabung dengan masing-masing kode untuk setiap konsentrasi A (20%), B (40%), C (60%), D (80%), E (100%)
4. Memasukkan konsentrasi ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) ke pada setiap tabung yang sudah di siapkan.
5. Menanam biakan murni *Escherichia coli* lalu ditanam di media NAS lalu di inkubasi selama 1x24 jam dengan suhu 37°C

Hari Kedua :

1. Menanam biakan murni *Escherichia coli* yang di ambil dari media NAS, lalu di tanam di boilon dan di inkubasi selama 1x24 jam dengan suhu 37°C
2. Menyiapkan media MH lalu memberi lebel sesuai konsentrasi yang akan diujikan pada setiap plate yaitu 20%, 40%, 60%, 80%,100%, kontrol (+), kontrol negatif (-).

Hari Ketiga :

1. Mempersiapkan alat dan bahan
Alat : api spiritus, pelubang sumuran, rak tabung, mikro pipet

Bahan : media boilon, media MH, standart Mc Farland, ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill)

2. Suspensi kuman dibuat dengan mengikuti prosedur dengan dibandingkan kekeruhannya dengan larutan standart Mc Farland 0,5
3. Suspensi kuman ditanam ke media MH dengan teknik *street plate* dengan swab steril.
4. Pembuatan sumuran yang sudah steril, ditempatkan pada permukaan media MH dengan jarak ring satu sama lain ± 50 mm
5. Memasukan konsentrasi ekstrak daun alpukat sebanyak 100 μ beserta pengulangannya pada setiap konsentrasi yang sudah di buat sumuran dari konsentrasi 20%,40%,60%,80%,100%.
6. Setelah memasukan konstentrasi ke setiap sumuran ditunggu sealama 10 menit agar esktrak dapat mendifusi media
7. Memasukan kontrol positif yang sudah dibuat konsentrasi 100% pada media MH besertra pengulangannya sebanyak 100 μ pada setiap lubang.
8. Memasukan kontrol negatif pada media MH menggunakan aquades steril sebanyak 100 μ pada setiap sumuran/lubang beserta pengulangannya.
9. Mnginkubasi media MH tersebut dengan suhu 37°C selama 1x24 jam

Hari keempat :

1. Mempersiapkan Alat dan Bahan :

Alat : Penggris, buku

Bahan : Media MH

2. Mengamati setiap zona hambat yang terjadi pada media MH disetiap konsentrasi dan pengulangan.
3. Zona hambat yang terbentuk disetiap konsentrasi diukur dengan menggunakan penggaris / jangka sorong.
4. Mencatat hasil yang diamati sebagai data.

3.6 Pengumpulan Data dan Analisa Data

3.6.1 Metode Pengumpulan Data

Data yang diperoleh dari pemeriksaan ekstrak daun alpukat terhadap *Escherichia coli* selama 4 hari dengan menggunakan metode difusi disajikan dalam bentuk Tabel 3.2

Tabel 3.2 Data Hasil Pemeriksaan Zona hambat Ekstrak daun alpukat terhadap akteri *ESCHERICHIA COLI*

No	Perlakuan	Zona Hambat Pertumbuhan (ZHP) (mm)					
		20%	40%	60%	80%	100%	K (+)
1	A						
2	B						
3	C						
4	D						

3.6.2 Metode Analisa Data

Setelah diperoleh hasil dalam bentuk tabel, data kemudian dianalisa menggunakan uji Kruskal Wallis untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun alpukat terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* dengan tingkat kesalahan 5% (0,05).