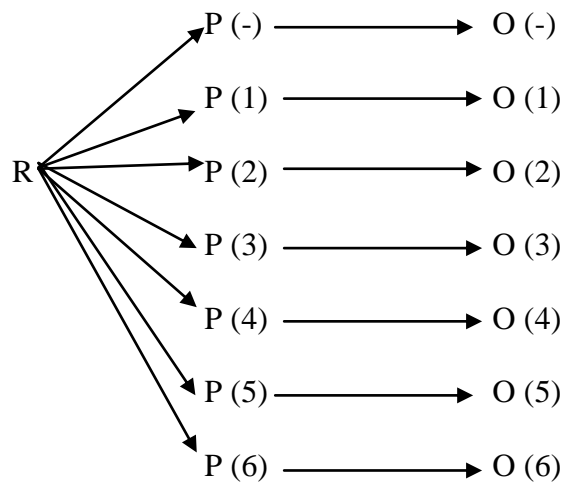


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian filtrat tanaman Kucing-kucingan (*Acalypha indica L.*) terhadap pertumbuhan Bakteri *Eschericia coli*. Sedangkan untuk rancangan penelitiannya adalah sebagai berikut:



(Zainuddin, 2003)

Keterangan :

R : Random

P (-) : Perlakuan tanpa pemberian filtrat tanaman kucing-kucingan

P (1) : Perlakuan dengan pemberian filtrat kucing-kucingan konsentrasi 60%

P (2) : Perlakuan dengan pemberian filtrat kucing-kucingan konsentrasi 50%

P (3) : Perlakuan dengan pemberian filtrat kucing-kucingan konsentrasi 40%

P (4) : Perlakuan dengan pemberian filtrat kucing-kucingan konsentrasi 20%

P (5) : Perlakuan dengan pemberian filtrat kucing-kucingan konsentrasi 10%

P (6) : Perlakuan dengan pemberian filtrat kucing-kucingan konsentrasi 5%

- O (-) : Observasi pertumbuhan *Eschericia coli* pada perlakuan tanpa pemberian filtrat
- O (1) : Observasi pertumbuhan *Eschericia coli* pada perlakuan pemberian filtrat konsentrasi 60%
- O (2) : Observasi pertumbuhan *Eschericia coli* pada perlakuan pemberian filtrat konsentrasi 50%
- O (3) : Observasi pertumbuhan *Eschericia coli* pada perlakuan pemberian filtrat konsentrasi 40%
- O (4) : Observasi pertumbuhan *Eschericia coli* pada perlakuan pemberian filtrat konsentrasi 20%
- O (5) : Observasi pertumbuhan *Eschericia coli* pada perlakuan pemberian filtrat konsentrasi 10%
- O (6) : Observasi pertumbuhan *Eschericia coli* pada perlakuan pemberian filtrat konsentrasi 5%

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi Penelitian

Dalam penelitian ini populasinya adalah semua bakteri *Eschericia coli* yang tumbuh pada media pertumbuhan dan bakteri *Eschericia coli* berasal dari biakan murni.

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah bakteri *Eschericia coli* pada masing-masing konsentrasi yang dilihat pertumbuhannya pada media EMB (Eosin

Methylen Blue) setelah diinkubasi selama 24 jam. Banyaknya pengulangan pada tiap perlakuan adalah 7 yang ditentukan dengan rumus berikut:

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

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

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

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 15 + 6$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 21 : 6$$

$$n \geq 3,5 \sim 4$$

(Zainuddin, 2003)

Keterangan :

n = jumlah pengulangan

k = jumlah kelompok

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analisis kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya, Jalan Surejo no.59 Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dimulai dari bulan Desember 2013 – Juni 2014, sedangkan pemeriksaan dilaksanakan pada bulan Mei 2014.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Varibel bebas	: Konsentrasi filtrat Kucing-kucingan
Variabel terikat	: Pertumbuhan bakteri <i>Eschericia coli</i>
Variabel kontrol	: Volume suspensi kuman, suhu, dan lama inkubasi

3.4.2 Definisi Operasional

1. Filtrat kucing-kucingan dikategorikan menjadi berbagai macam konsentrasi, yaitu : 60%, 50%, 40%, 20%, 10%, 5%, dan 0%.
2. Pertumbuhan Bakteri *Eschericia coli* yang tumbuh pada masing-masing konsentrasi dalam skala nominal yang dikategorikan menjadi positif (+) dan negatif (-).Dikatakan positif (+) apabila terdapat kekeruhan dan negatif (-) apabila tidak terdapat kekeruhan.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data pertumbuhan Bakteri *Eschericia coli* diperoleh dengan cara observasi. Pemeriksaan daya hambat bakteri *Eschericia coli* ini menggunakan metode dilusi. Langkah-langkah pemeriksaannya sebagai berikut :

3.5.1 Prinsip Pemeriksaan

Senyawa antibakteri yang ada pada filtrat tanaman kucing-kucingan 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. Larutan uji senyawa antibakteri pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan bakteri uji, ditetapkan sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM) atau MIC (*Minimum Inhibition Concentration*) (Pratiwi,2008). Untuk menegaskan adanya bakteri *Eschericia colitumbuh* atau tidak, dilakukan tes penegasan dengan cara : hasil dari tabung pada tes uji tersebut ditanam pada media EMB (Eosin Methylen Blue) lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.5.2 Alat-alat

1. Timbangan
2. Tabung reaksi
3. Pengaduk
4. Pipet Pasteur
5. Erlenmeyer
6. Autoclave
7. Pipet ukur
8. Gelas arloji
9. Gelas ukur
10. Rak tabung
11. Api spirtus dan kaki tiga
12. Filler
13. Ose
14. Plate
15. Tabung sentrifuge
16. Lidi kapas steril

3.5.3 Bahan Pemeriksaan

1. Filtrat tanaman kucing-kucingan (*Acalypha indica* L.)
2. Suspensi kuman *Eschericia coli*

3.5.4 Reagen dan Media Pemeriksaan

1. NaOH 0,1 N
2. HCl 0,1 N
3. BaCl₂ 1%
4. H₂SO₄ 1%
5. Pz Steril
6. Aquadest Steril
7. Media NA (Nutrient Agar)
8. Media EMB (Eosin Methylen Blue)

3.5.5 Prosedur Pembuatan Suspensi Kuman

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

1. Menyiapkan 2 tabung steril, 1 untuk suspense dan yang 1 untuk standart Mc. Farlan I.
2. Prosedur membuat standart Mc. Farlan 1, yaitu :
 - a. Membuat perbandingan antara BaCl₂ 1% : H₂SO₄ 1% sebesar 1 : 99
 - b. Memipet 0,1 ml BaCl₂ 1% + 9,9 ml H₂SO₄ 1%
 - c. Homogenkan dengan cara kocok pelan tabungStandart Mc Farlan I ini kekeruhannya sama dengan tiap 1 ml dari suspense kuman mengandung 300 juta kuman.
3. Prosedur membuat suspensi kuman, yaitu:

- a. Mengisi tabung steril dengan Pz \pm 4 ml.
 - b. Mengambil kuman dari biakan *E.coli* murni umur 24 jam yang sudah ditanam di media NAS (Nutrient Agar Slant) dengan lidi kapas steril
 - c. Menyelupkan lidi kapas steril yang sudah ada kumannya pada tabung yang berisi Pz.
 - d. Membandingkan kekeruhan suspensi kuman dengan Mc Farlan I
 - e. Apabila suspensi kurang keruh, maka tambahkan kuman dengan lidi kapas dan apabila terlalu keruh tambahkan Pz hingga kekeruhannya sama dengan standart Mc Farlan I.
- Suspensi sudah dapat digunakan.

Menstadartkan ose yang akan dipakai dalam penelitian:

- 1) Menyiapkan pipet 0,1 ml dan filler serta tabung
- 2) Memipet aquadest 0,1 ml, kemudian menuanginya ke dalam tabung
- 3) Menyalakan api spirtus
- 4) Mengambil 1 mata ose aquadest yang sudah dituang ke dalam tabung dan kemudian memanaskan ose tersebut di atas api spirtus, lakukan berulang-ulang sampai aquadest dalam tabung 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 millimeter 300 juta kuman). (Wikipedia, 2009)

3.5.6 Prosedur Pembuatan Media NAP (Nutrient Agar Plate)

1. Melakukan perhitungan media NA (Nutrient Agar)

Membuat NAP 5 plate, @ plate \pm 17 ml

Komposisi NA 20 gr per 1 liter \longrightarrow 20 gr/1000 ml x 85 ml = 1,7 gr

2. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
3. Menimbang bahan (media NA) sesuai dengan perhitungan yaitu 1,7 gr 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 di atas api spiritus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih
7. Mengangkat larutan yang sudah dipanaskan dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan di baskom sampai suam-suam kuku
8. Mengukur pHnya sampai 7,4, jika terlalu asam tambahkan NaOH 0,1 N, sedangkan jika terlalu basa tambahkan HCl 0,1 N 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, tuangkan larutan pada plate yang sudah disteril secara rata
11. Didiamkan sampai terlihat padat dan kemudian disimpan di lemari es
(Soewarsono, 1993)

3.5.7 Prosedur Pembuatan Konsentrasi Filtrat Tanaman Kucing-kucingan

1. Memilih tanaman Kucing-kucingan yang masih segar dan mencabutnya sampai akar.
2. Mencuci tanaman Kucing-kucingan sampai bersih dan terakhir dicuci dengan aquadest steril.

3. Keringkan tanaman Kucing-kucingan dengan oven pada suhu 50°C selama 2 jam.
4. Menghaluskan tanaman Kucing-kucingan yang sudah kering dengan mortir. Sebelumnya mortir diusap dengan alkohol agar steril.
5. Menimbang gerusan tanaman kucing-kucingan yang sudah dihaluskan sebanyak 60 gram untuk konsentrasi 60% dan sebanyak 40 gram untuk konsentrasi 40%.
6. Melarutkan tanaman Kucing-kucingan yang telah ditimbang dengan aquadest steril sebanyak 100 ml.
7. Menyaring tanaman Kucing-kucingan yang sudah dilarutkan dengan kasa berlapis yang steril. Menyaring sampai benar-benar jernih.
8. Menyentrifuge kembali filtrat dengan menggunakan tabung sntrifuge yang steril sehingga didapatkan filtrat yang benar-benar jernih.
9. Mengambil 1 mata ose filtrat yang sudah jernih secara steril, kemudian menanamnya ke media NAP, dengan cara menggoreskannya pada permukaan media.
10. Inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C
11. Mengamati hasilnya, jika tidak terjadi pertumbuhan kuman berarti filtrat tanaman Kucing-kucingan sudah benar-benar steril. Namun jika pada media NAP terdapat pertumbuhan kuman berarti perlu dilakukan proses tindalisasi, yaitu:
 - a. Memanaskan filtrat tanaman Kucing-kucingan dengan waterbath pada suhu 90°C selama 15 menit.

- b. Kemudian meletakkannya pada inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C.
 - c. Mengulangi perlakuan tersebut sampai 3 kali
12. Menanam kembali filtrat tanaman Kucing-kucingan yang sudah melalui proses tindalisasi di media NAP dan menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37°C.
 13. Membuat konsentrasi 60%, 50%, 40%, 20%, 10%, dan 5% Pz steril, yaitu:
 - Konsentrasi 60% : Pada tabung 1 diisi filtrat tanaman Kucing-kucingan konsentrasi 60% sebanyak 1 ml.
 - Konsentrasi 50% : Pada tabung 2 diisi 0,2 ml Pz ditambahkan 0,2 ml filtrat tanaman Kucing-kucingan sebanyak 0,8 ml, dihomogenkan!
 - Konsentrasi 40% : Pada tabung 3 diisi filtrat tanaman Kucing-kucingan konsentrasi 40% sebanyak 1 ml.
 - Konsentrasi 20% : Pada tabung 4 diisi 0,5 ml Pz steril ditambahkan filtrat tanaman Kucing-kucingan konsentrasi 40% sebanyak 0,5 ml, dihomogenkan!
 - Konsentrasi 10% : Pada tabung 5 diisi 0,75 ml Pz steril ditambahkan filtrat tanaman Kucing-kucingan konsentrasi 40% sebanyak 0,25 ml, dihomogenkan!

Konsentrasi 5% : Pada tabung 6 diisi 0,9 Pz steril ditambahkan filtrat tanaman Kucing-kucingan konsentrasi 40% sebanyak 0,1 ml, dihomogenkan!

Konsentrasi 0% : Pada tabung 7 diisi 1ml Pz steril tanpa diberi filtrat tanaman Kucing-kucingan.

(Anonim, 1996)

3.5.8 Prosedur Pembuatan Media EMB

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

Membuat 55 plate, @plate = 17ml

Komposisi EMB 36 gr per 1 liter \longrightarrow $36\text{gr}/1000\text{ ml} \times 935 = 33,66\text{ gr}$

3. Melakukan penimbangan bahan sebanyak 33,66 gr menggunakan timbangan
4. Mengukur volume aquadest yang dibutuhkan yaitu sebanyak 935 ml dengan menggunakan gelas ukur
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest yang sudah diukur volumenya di dalam Erlenmeyer
6. Memanaskannya di atas api spiritus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih
7. Mengangkat larutan yang sudah larut sempurna dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan di baskom sampai suam-suam kuku
8. Mengukur pH dengan cara menambahkan NaOH 0,1 N jika terlalu asam dan menambahkan HCl 0,1 N jika terlalu basa sampai pH 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 dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit
10. Setelah turun dari autoclave, menuang larutan tadi ke dalam plate. Masing-masing plate ± 17 ml secara steril dekat dengan api
11. Mendinginkan media yang sudah ditusng ke dalam plate beberapa menit agar mengeras, kemudian jika sudah padat simpan di lemari es
(Soewarsono, 1993)

3.5.9 Prosedur Pemeriksaan Sampel

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 60%, 50%, 40%, 20%, 10%, 5%, 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 60%. Masing-masing konsentrasi diperlakukan sama halnya seperti konsentrasi 60%. Semua perlakuan dilakukan secara steril dekat dengan api.
5. Menutup kembali tabung dengan kapas berlemak
6. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

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 di atas nyala api spirtus, mengambil mata ose kuman yang ada pada konsentrasi terkecil tadi
4. Menanamkannya di media EMB dengan cara menggoreskannya pada permukaan media. Inkubasi kembali pada suhu 37°C selama 24 jam

Hari Ketiga:

1. Mengamati hasilnya pada media EMB apakah terbentuk koloni yang mengidentifikasi kuman tersebut adalah *Escherichia coli*
2. Mencatat konsentrasi terkecil sebagai daya hambat pertumbuhan kuman
3. Mencatat hasil yang diamati sebagai data

3.5.10 Tabulasi Data

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

Tabel 3.1. Contoh tabulasi data

No	Kode Sampel	Pertumbuhan <i>Escherichia coli</i> pada masing-masing konsentrai						
		60%	50%	40%	20%	10%	5%	C
1.								
2.								
3.								
4.								
Jumlah								

Dengan keterangan:

Positif (+) : ada kekeruhan

Negatif (-) : tidak ada kekeruhan

3.6 Metode Analisis Data

Setelah diperoleh data untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh pemberian filtrat tanaman Kucing-kucingan (*Acalypha indica L.*) terhadap pertumbuhan *Eschericia coli*, maka data kemudian dianalisis dengan menggunakan uji uji chi – square dengan tingkat kesalahan 5% (0,05).