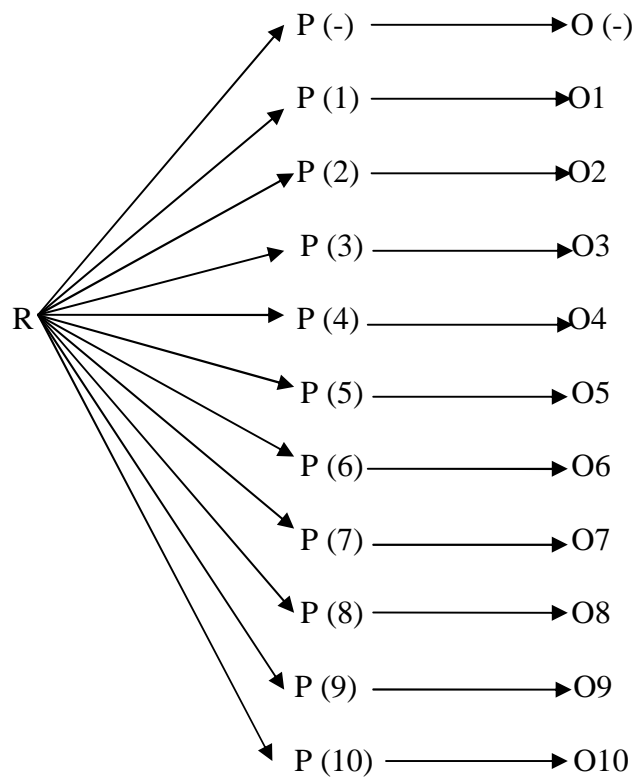


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh perasan daun belimbing wuluh terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Sedangkan untuk rancangan penelitian adalah sebagai berikut :



Keterangan :

R : Random

P (-) : Perlakuan tanpa diberi perasan daun belimbing wuluh

P (1) : Perlakuan dengan pemberian perasan konsentrasi 100%

- P (2) : Perlakuan dengan pemberian perasan konsentrasi 90%
- P (3) : Perlakuan dengan pemberian perasan konsentrasi 80%
- P (4) : Perlakuan dengan pemberian perasan konsentrasi 70%
- P (5) : Perlakuan dengan pemberian perasan konsentrasi 60%
- P (6) : Perlakuan dengan pemberian perasan konsentrasi 50%
- P (7) : Perlakuan dengan pemberian perasan konsentrasi 40%
- P (8) : Perlakuan dengan pemberian perasan konsentrasi 30%
- P (9) : Perlakuan dengan pemberian perasan konsentrasi 20%
- P (10) : Perlakuan dengan pemberian perasan konsentrasi 10%
- O (-) : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan tanpa pemberian perasan
- O (1) : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian perasan konsentrasi 100%
- O (2) : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian perasan konsentrasi 90%
- O (3) : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian perasan konsentrasi 80%
- O (4) : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian perasan konsentrasi 70%
- O (5) : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian perasan konsentrasi 60%
- O (6) : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian perasan konsentrasi 50%

- O (7) : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian perasan konsentrasi 40%
- O (8) : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian perasan konsentrasi 30%
- O (9) : Observasi pertumbuhan *Escherichia coli* pada perlakuan pemberian perasan konsentrasi 20%
- 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 ditanam di media EMB (Eosin Methyline Blue).

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 24 jam. Besar sampel dalam penelitian ini adalah 3 yang ditentukan dengan rumus berikut (Hidayat, 2010) :

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

$$(n-1) (11-1) > 15$$

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

$$10n - 10 > 15$$

$$10n > 15 + 10$$

$$10n > 25$$

$$n > 25 : 10$$

$$n > 2,5$$

$$n \sim 3$$

Keterangan :

n : Jumlah ulangan atau jumlah sampel

k : Jumlah kelompok

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di daerah Sutorejo Surabaya, sedangkan pemeriksaan dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai bulan Juli 2012, sedangkan pemeriksaan dilaksanakan pada bulan April sampai bulan Mei 2012.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas : Perasan daun belimbing wuluh.

Variabel terikat : Pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

Variabel Kontrol : Volume suspensi bakteri, lama inkubasi.

3.4.2 Definisi Operasional

1. Perasan daun belimbing wuluh dikategorikan menjadi berbagai macam konsentrasi, yaitu: 100%, 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 dalam skala nominal yang dikategorikan menjadi positif (+) dan negatif (-). Dimana positif (+) jika terjadi pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, sedangkan negatif (-) jika tidak terjadi pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* diperoleh dengan cara observasi tidak langsung, yaitu dengan melalui uji Laboratorium. Pemeriksaan daya hambat bakteri *Escherichia coli* ini menggunakan metode Dilusi. Langkah-langkah pemeriksaannya diantaranya sebagai berikut :

3.5.1 Prinsip Pemeriksaan

Senyawa antibakteri yang ada pada perasan daun belimbing wuluh diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi, kemudian masing-masing konsentrasi ditambahkan suspensi bakteri uji dalam media cair. Perlakuan tersebut akan di inkubasi 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 bahwa bakteri *Escherichia coli* tumbuh atau tidak, dilakukan tes penegasan dengan cara : hasil dari tabung pada tes uji tersebut ditanam dimedia EMB (Eosin Methyline Blue). Lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.5.2 Alat-Alat

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

3.5.3 Bahan Pemeriksaan

1. Perasan daun belimbing wuluh
2. Suspensi kuman *Escherichia 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 Methyline 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 suspensi dan yang 1 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 % + 9,9 ml H_2SO_4 1 %
 - 3) Menghomogenkan dengan cara kocok pelan tabungStandart Mc Farlan I ini kekeruhannya sama dengan tiap 1 ml dari suspensi kuman mengandung 300 juta kuman.
3. Prosedur membuat suspensi kuman, yaitu:
 - 1) Mengisi tabung steril dengan pz \pm 4ml.
 - 2) Mengambil kuman dari biakan *E.coli* murni umur 24 jam yang sudah ditanam di media NAS (Nutrient Agar Slint) dengan lidi kapas steril
 - 3) Menyelupkan lidi kapas steril yang sudah ada kumannya pada tabung yang berisi pz.
 - 4) Membandingkan kekeruhan suspensi kuman dengan Mc Farlan I
 - 5) 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.

Menstandartkan ose yang akan dipakai dalam penelitian :

- 1) Menyiapkan pipet 0.1 ml dan filler serta tabung
- 2) Memipet aquadest 0.1 ml, kemudian menuanginya kedalam tabung
- 3) Menyalakan api spirtus
- 4) Mengambil 1 mata ose air yang sudah dituang kedalam tabung dan kemudian memanaskan ose tersebut diatas api spirtus, lakukan berulang – ulang sampai air dalam tabung habis.
- 5) Didapatkan 30 mata ose air tersebut habis.

$$0.1 \text{ ml} = 0.003$$

1 mata ose = 1 juta kuman (bila suspensi kuman per mililiter 300juta kuman).

3.5.6 Prosedur Pembuatan Media NAP (Nutrient Agar Plate)

- 1) Melakukan perhitungan media NA (Nutrient Agar)

Membuat NAP 5 plate, @ plate ± 17 ml

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

- 2) Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan
- 3) Menimbang bahan (media NA) sesuai dengan perhitungan yaitu 1,7 gram 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 diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih

- 7) Mengangkat larutan yang sudah dipanaskan dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam – suam kuku
- 8) Mengukur pH nya sampai 7.4, jika terlalu asam menambahkannya dengan NaOH 0.1 N, sedangkan jika terlalu basa menambahkannya dengan HCL 0.1 N sampai pH nya 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 ke dalam plate yang steril sampai rata
- 11) Mendinginkannya sampai terlihat padat dan kemudian menyimpannya ke almari es.

3.5.7 Prosedur Pembuatan Konsentrasi Perasan Daun Belimbing Wuluh

1. Memetik daun Belimbing wuluh dari pohonnya
2. Mencuci daun sampai bersih dan yang terakhir dicuci dengan aquadest steril
3. Menimbang daun belimbing wuluh yang masih muda sebanyak 100 gram
4. Menghaluskan daun sampai halus. Sebelumnya mortir diusap dengan alkohol agar steril.
5. Menyaring daun yang sudah dihaluskan tadi (juice) dengan kasa berlapis yang steril. Menyaring sampai benar-benar jernih.
6. Menyentrifuge kembali perasan tadi ditabung sentrifuge yang steril sehingga didapatkan perasan yang benar- benar jernih

7. Mengambil 1 mata ose perasan yang sudah jernih secara steril, kemudian menanamnya ke media NAP, dengan cara menggoreskannya dipermukaan media
8. Inkubasi selama 24 jam 37° C
9. Mengamati hasilnya, jika tidak terjadi pertumbuhan kuman berarti perasan daun belimbing wuluh tadi sudah benar – benar steril. Namun jika pada media NAP terdapat pertumbuhan kuman berarti perlu dilakukan proses tindalisasi, yaitu:
 - 1) Memanaskan perasan daun belimbing wuluh dengan waterbath pada suhu 90° C selama 15 menit
 - 2) Kemudian meletakkannya di inkubator selama 24 jam pada suhu 37° C
 - 3) Mengulangi perlakuan tersebut sampai 3 kali
10. Menanam kembali perasan daun belimbing wuluh yang sudah melalui proses tindalisasi di media NAP dan menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37° C
11. Membuat konsentrasi 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, dan 10% Pz steril, yaitu :

Konsentrasi 100% : Tabung 1 di isi 1 ml perasan awal, itu sebagai konsentrasi 100%

Konsentrasi 90% : Tabung 2 di isi 0.1 ml Pz steril ditambahkan perasan daun belimbing wuluh konsentrasi 100% sebanyak 0.9 ml, dihomogenkan!

- Konsentrasi 80% : Pada tabung 3 diisi 0.2 ml Pz steril ditambahkan perasan daun belimbing wuluh konsentrasi 100% sebanyak 0.8 ml, dihomogenkan!
- Konsentrasi 70% : Pada tabung 4 diisi 0.3 ml Pz steril ditambahkan perasan daun belimbing wuluh konsentrasi 100% sebanyak 0.7 ml, dihomogenkan!
- Konsentrasi 60% : Pada tabung 5 diisi 0.4 ml Pz steril ditambahkan perasan daun belimbing wuluh konsentrasi 100% sebanyak 0.6 ml, dihomogenkan!
- Konsentrasi 50% : Pada tabung 6 diisi 0.5 ml Pz steril ditambahkan perasan daun belimbing wuluh konsentrasi 100% sebanyak 0.5 ml, dihomogenkan!
- Konsentrasi 40% : Pada tabung 7 diisi 0.6 ml Pz steril ditambahkan perasan daun belimbing wuluh konsentrasi 100% sebanyak 0.4 ml, dihomogenkan!
- Konsentrasi 30% : Pada tabung 8 diisi 0.7 ml Pz steril ditambahkan perasan daun belimbing wuluh konsentrasi 100% sebanyak 0.3 ml, dihomogenkan!
- Konsentarsi 20% : Pada tabung 9 diisi 0.8 ml Pz steril ditambahkan perasan daun belimbing wuluh konsentrasi 100% sebanyak 0.2 ml, dihomogenkan!
- Konsentrasi 10% : Pada tabung 10 diisi 0.9 ml Pz steril ditambahkan perasan daun belimbing wuluh konsentrasi 100% sebanyak 0.1 ml, dihomogenkan!

Konsentrasi 0% : Pada tabung 11 diisi 1 ml Pz steril tanpa diberi tambahan perasan daun belimbing wuluh.

3.5.8 Prosedure Pembuatan Media EMB

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

Membuat EMB 15 plate, @ plate 17 ml

Komposisi EMB 36 gr per 1 liter $\rightarrow \frac{36 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}} \times 255 \text{ ml} = 9,18 \text{ gr}$

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 ke dalam erlenmeyer
6. Memanaskannya di atas api spirtus 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 nya dengan cara menambahkan NaOH 0.1 N jika terlalu asam dan menambahkan HCL 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

11. Setelah turun dari Autoclave, menuang larutan tadi ke dalam plate.
Masing – masing plate \pm 17 ml secara steril dekat dengan api
12. Mendiamkan media yang sudah dituang kedalam plate beberapa menit agar memadat, kemudian jika sudah padat taruh di almari Es.

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 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 1 mata ose sama dengan 1 juta kuman. Kemudian menanamnya ke konsentrasi 100%. Masing – masing konsentrasi diperlakukan sama halnya seperti konsentrasi 100%. Semua perlakuan dilakukan secara steril dekat dengan api.
7. Menutup kembali tabung dengan kapas berlemak
8. 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 1 mata ose kuman yang ada pada konsentrasi terkecil tadi.
4. Menanamnya di media EMB dengan cara menggoreskannya dipermukaan 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 konsentrasasi terkecil tadi sebagai daya hambat pertumbuhan kuman
3. Mencatat hasil yang di amati 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> di media EMB pada masing-masing konsentrasi										
		100%	90%	80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	10%	C
1.	A											
2.	B											
3.	C											
Jumlah												

Dengan keterangan :

Positif (+) : Ada pertumbuhan bakteri

Negatif (-) : Tidak ada pertumbuhan bakteri

3.6 Metode Analisis Data

Setelah diperoleh hasil dalam bentuk tabel, data kemudian dianalisis dengan uji Chi-Square untuk mengetahui pengaruh perasan daun belimbing wuluh dengan tingkat kesalahan 0.05.