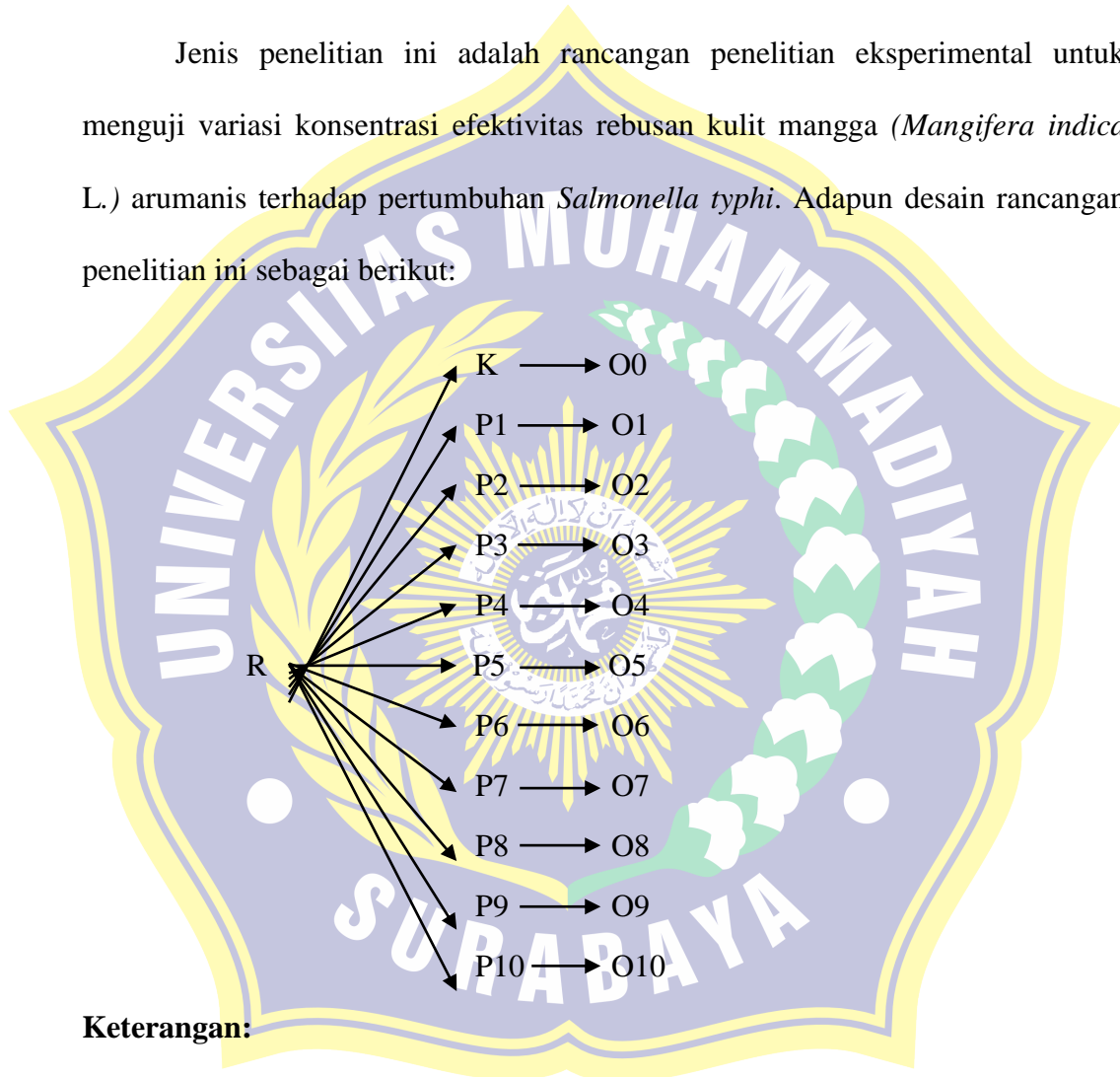


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah rancangan penelitian eksperimental untuk menguji variasi konsentrasi efektivitas rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) arumanis terhadap pertumbuhan *Salmonella typhi*. Adapun desain rancangan penelitian ini sebagai berikut:



Keterangan:

R : Random

K : Kontrol

- P1 : Perlakuan dengan memberi rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) arumanis 10%
- P2 : Perlakuan dengan memberi rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) arumanis 20%
- P3 : Perlakuan dengan memberi rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) arumanis 30%
- P4 : Perlakuan dengan memberi rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) arumanis 40%
- P5 : Perlakuan dengan memberi rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) arumanis 50%
- P6 : Perlakuan dengan memberi rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) arumanis 60%
- P7 : Perlakuan dengan memberi rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) arumanis 70%
- P8 : Perlakuan dengan memberi rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) arumanis 80%
- P9 : Perlakuan dengan memberi rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) arumanis 90%
- P10 : Perlakuan dengan memberi rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) arumanis 100%
- O0 : Observasi pertumbuhan bakteri telah diberi antibiotik
- O1 : Observasi pertumbuhan bakteri setelah diberi rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) arumanis 10%
- O2 : Observasi pertumbuhan bakteri setelah diberi rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) arumanis 20%
- O3 : Observasi pertumbuhan bakteri setelah diberi rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) arumanis 30%
- O4 : Observasi pertumbuhan bakteri setelah diberi rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) arumanis 40%
- O5 : Observasi pertumbuhan bakteri setelah diberi rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) arumanis 50%
- O6 : Observasi pertumbuhan bakteri setelah diberi rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) arumanis 60%
- O7 : Observasi pertumbuhan bakteri setelah diberi rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) arumanis 70%
- O8 : Observasi pertumbuhan bakteri setelah diberi rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) arumanis 80%
- O9 : Observasi pertumbuhan bakteri setelah diberi rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) arumanis 90%

O10 : Observasi pertumbuhan bakteri setelah diberi rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) arumanis 100%

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah biakan murni bakteri *Salmonella Typhi* dari biakan murni di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi D3 Teknik Laboratorium Medik Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya, Jalan Sutorejo 59 Surabaya.

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah *Salmonella Typhi*. Dalam penelitian ini setiap perlakuan dengan 3 pengulangan didasarkan dari rumus $(t-1)(r-1) \geq 15$, maka perhitungan sebagai berikut:

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

$$(11-1)(r-1) \geq 15$$

$$10(r-1) \geq 15$$

$$10r-10 \geq 15$$

$$10r \geq 25$$

$$r \geq 2,5$$

$$r \geq 3 \quad (\text{Federer, 2010})$$

Maka jumlah replikasi adalah 3 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 Juli 2019, adapun waktu pemeriksaan dilakukan sampai dengan Juli 2019.

3.3.2 Lokasi Penelitian

Lokasi 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 rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.)

Variabel terikat : Pertumbuhan bakteri *Salmonella Typhi*.

Variabel Kontrol : lama inkubasi, suhu inkubator, tingkat kekeruhan kuman / OD (Optical Density), konsentrasi rebusan, sterilisasi, tingkat kematangan mangga yang sedikit muda.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

1. Rebusan adalah menaruh suatu bahan didalam air kemudian merebusnya sampai suhu yang diinginkan. Rebusan kulit mangga arum manis dilakukan dengan menaruh kulit mangga yang telah dikupas lalu dimasukkan ke dalam aquades dan dipanaskan, dengan suhu 50°. Lalu

disaring dengan konsentrasi masing-masing adalah 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%.

2. Tingkat kematangan mangga yang digunakan adalah sedang dengan ciri-ciri kulit yang berwarna hijau, tekstur yang sedikit keras.
3. Bakteri *Salmonella typhi* dikatakan tumbuh adalah dengan munculnya koloni tidak berwarna (bening) dengan inti hitam pada media SSA (*Salmonella Shigella Agar*) yang telah diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.
4. Suhu adalah temperature, yang digunakan bakteri aerob untuk berkembang biak dengan baik yaitu suhu 37°C.
5. Inkubasi adalah keadaan dimana bakteri berkembang biak. Waktu yang tepat untuk menginkubasi adalah 1x24 jam.
6. *Optical Density* (OD) adalah tingkat kekeruhan bakteri yang sudah distandarkan dengan standart Mc Farland yaitu 0,05.

3.5 Teknik Pengumpulan Data

Data pertumbuhan *Salmonella typhi* diperoleh dengan pengamatan langsung dengan melalui uji laboratorium. Pemeriksaan adanya pengaruh atau tidak pada bakteri *Salmonella typhi* menggunakan metode difusi. Dengan langkah-langkah berikut ini :

3.5.1 Prinsip Pemeriksaan

Metode Sumuran merupakan salah satu metode difusi dimana pada metode ini dibuat suatu lubang (sumur) pada media padat yang diisi rebusan kulit mangga arumanis dengan berbagai konsentrasi dan yang

telah ditanami kuman *Salmonella typhi*, kemudian diinkubasi. Selanjutnya mengukur daya hambat yang terbentuk disekitar sumuran.

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, cutter, cotton swab steril, *autoclave*, gelas ukur, tabung, Laminar Air Flow (LAF).

b) Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

rebusan kulit mangga arumanis dengan konsentrasi 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% suspensi kuman *Salmonella thypi*, kasa, kertas pH, kasa steril, Bouillon, media *Mueller Hinton* (MH), media *Salmonella Shigella Agar* (SSA), larutan H₂SO₄ 1%, larutan BaCl 1%, NaOH 0,1 N, HCL 0,1 N.

3.5.3 Prosedur Persiapan Media dan rebusan

A. Prosedur Pembuatan Media *Mueller Hinton* (MH)

1. alat dan bahan yang dibutuhkan disiapkan
2. media MH yang dibutuhkan dihitung dengan rumus:
MH 34 gram/liter, membuat MH sebanyak 16 plate @15 ml
gram MH = $\frac{34 \text{ gram} \times 240 \text{ ml}}{1000} = 8,16 \text{ gr}$
3. serbuk media MH ditimbang sebanyak 8,16 gram
4. aquades yang dibutuhkan yaitu sebanyak 240 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 dierlenmeyer ditutup dengan kapas berlemak dan koran serta mengikatnya
10. media dan alat-alat yang dibutuhkan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit
11. setelah turun dari autoklaf, media dituang dalam plate yang telah steril dengan volime media 15ml kedalam plate, setelah dingin dan memadat disimpan dalam lemari es.

B. Prosedur Pembuatan Media *Salmonella Shigella* Agar (SSA)

1. Menyiapkan semua alat dan bahan yang dibutuhkan (semua dalam keadaan steril)
2. Melakukan perhitungan media SSA yang dibutuhkan dengan rumus:
SSA 60 gram/liter, membuat SSA sebanyak 4 plate @20 ml
$$\text{gram SA} = \frac{60 \text{ gram} \times 60 \text{ ml}}{1000} = 3,6 \text{ gr}$$
3. serbuk media SSA ditimbang sebanyak 3,6 gram
4. aquades steril yang dibutuhkan yaitu sebanyak 100 ml.
5. bahan yang ditimbang tadi dilarutkan dengan aquades steril sebanyak 100ml yang sudah diukur volumenya dalam erlenmeyer.
6. media dipanaskan diatas api spirtus sampai mendidih, jangan diAutoclaf.

7. media yang sudah larut sempurna kemudian disuam-suam dan mengukur ph sampai 7,2, jika PH terlalu asam tambahkan NaOH, jika terlalu basa tambahkan HCL.
8. Setelah selesai, lalu menuang media SSA ke dalam plate masing-masing 15ml.
9. Lalu dingin dan disimpan dalam lemari es dengan suhu 2-8°C.

C. Prosedur Penentuan Bakteri *Salmonella typhi* sebagai Control Pertumbuhan Pada Media SSA

1. Siapkan 2 plate media SSA yang steril dan biakan kuman *Salmonella typhi* murni
2. Inkubasi Media yang sudah ditanam bakteri kedalam inkubator selama 1x24 jam dengan suhu 37°C
3. Setelah itu amati pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* dengan ciri koloni tidak berwarna (bening) dengan inti hitam pada media SSA (*Salmonella Shigella Agar*) yang telah diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.

D. Prosedur Pembuatan Suspensi Kuman

Pembuatan suspensi kumandengan 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 atau 1 : 199

- 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 Bouillon sebanyak 3 ml disiapkan dalam tabung yang steril.
- b. Biakan murni bakteri *Salmonella typhi* diambil pada media Bouillon dengan ose steril.
- c. Dihomogenkan ose dengan menggunakan vortex
- d. Suspensi yang telah dibuat dibandingkan dengan standart Mc Farland 0,5
- e. Bila suspensi kurang keruh dibandingkan dengan standart Mc Farland maka tambahkan suspensi kuman kembali dan apabila terlalu keruh maka tambahkan boillon hingga warna benar-benar sama keruh seperti standart Mc Farland.

E. Pembuatan Rebusan Kulit Mangga

Pembuatan rebusan kulit mangga dengan cara sebagai berikut :

1. Dengan menggunakan perbandingan 1:1, maka 100 gr untuk kulit mangga dan 100ml untuk aquadest.
2. Cuci bersih dan menimbang 100gr kulit Mangga arumanis yang berwarna hijau.
3. Alat dan bahan dimasukan kedalam LAF untuk uji sterilitas agar terhindar dari kontaminasi

4. Kemudian kulit Mangga arumanis dimasukan kedalam aquadest steril sebanyak 100ml lalu tutup.
5. Rebus kulit mangga diatas api spirtus sampai suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ diluar LAF (Yuliantari, 2017).

F. Kontrol Positif Menggunakan Standart Diameter Daya Hambat Resistensi Antibiotik *Amoxicillin*

Tabel 3.1 Hasil Uji Sensitivitas Bakteri *S. typhi* terhadap Antibiotik (Tri Wahyuning Lestari, 2013)

Bakteri	Disk Antibiotik	Standar resistensi zona hambat bakteri			Diameter zona hambat (mm)	Keterangan
		R	I	S		
<i>S. typhi</i>	Amoksisilin	≤ 15	16-20	≥ 21	21	sensitif

G. Uji Sterilisasi Air Rebusan

1. Ambil rebusan kulit mangga, saring menggunakan kasa steril dalam LAF.
2. Mengambil 1 mata ose air rebusan kulit mangga, lalu menanam pada media MH dengan cara menggoreskan pada permukaan media
3. Menginkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C
4. Mengamati hasil, apabila pada media sudah tidak ada bakteri yang tumbuh maka air rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) sudah benar-benar steril. Apabila pada media MH masih ada bakteri maka perlu dilakukan proses tindalasi, yaitu :
 - a. Memanaskan air rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) pada waterbath dengan suhu 90°C selama 15 menit
 - b. Meletakkan pada incubator selama 24 jam dengan suhu 37°C

- c. Menanam kembali pada media MH dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C
- d. Ulangi tahap diatas apabila masih ada bakteri yang tumbuh

5. Membuat konsentrasi:

- a. Konsentrasi 100% : mengisi tabung A dengan air rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) sebanyak 1ml
- b. Konsentrasi 90% : mengisi tabung B dengan air rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) sebanyak 0,9ml dan PZ sebanyak 0,1ml
- c. Konsentrasi 80% : mengisi tabung C dengan air rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) sebanyak 0,8ml dan PZ sebanyak 0,2ml
- d. Konsentrasi 70% : mengisi tabung D dengan air rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) sebanyak 0,7ml dan PZ sebanyak 0,3ml
- e. Konsentrasi 60% : mengisi tabung E dengan air rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) sebanyak 0,6ml dan PZ sebanyak 0,4ml
- f. Konsentrasi 50% : mengisi tabung E dengan air rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) sebanyak 0,5ml dan PZ sebanyak 0,5ml
- g. Konsentrasi 40% : mengisi tabung E dengan air rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) sebanyak 0,4ml dan PZ sebanyak 0,6ml
- h. Konsentrasi 30% : mengisi tabung E dengan air rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) sebanyak 0,3ml dan PZ sebanyak 0,7ml
- i. Konsentrasi 20% : mengisi tabung E dengan air rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) sebanyak 0,2ml dan PZ sebanyak 0,8ml
- j. Konsentrasi 10% : mengisi tabung E dengan air rebusan kulit mangga (*Mangifera indica* L.) sebanyak 0,1ml dan PZ sebanyak 0,9ml

3.5.4 Prosedur Pemeriksaan Sampel.

Hari Pertama :

1. Menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan.

Alat: Api spirtus, ose, rak tabung

Bahan: Bakteri murni *Salmonella typhi* pada media TSB, Media SSA

2. Sterilitas dalam melaksanakan pengujian di pertahankan dengan menyalakan api spirtus.
3. Ambil biakan Murni lalu tanam ke Media SSA lalu Inkubasi dalm inkubator selama 1x24 jam dengan suhu 37°C

Hari Kedua :

1. Persiapan Alat dan Bahan

Alat: Api spirtus, rak tabung, timbangan, plate, ose bulat, inkubator, LAF

Bahan: Media SSA, Media Bouillon, Rebusan kulit Mangga

2. Bakteri dari media SSA diambil dan ditanam kedalam media bouillon lalu inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.
3. Membuat rebusan kulit mangga dengan konsentrasi 100%
4. Melakukan uji sterilisasi rebusan kulit Mangga
5. Inkubasi uji steril rebusan kulit mangga keinkubator selama 1x24 jam dengan suhu 37°C

Hari Ketiga:

1. Mempersiapkan Alat dan Bahan

Alat: Api spirtus, swab steril, pelubang sumuran, rak rabung, mikropipet,

Bahan: Media Bouillon, Media MH, standart Mc Farland, rebusan kulit Mangga

2. Suspensi kuman dibuat dengan mengikuti prosedur dengan dibandingkan kekeruhannya dengan larutan standar Mc Farland 0,5.
3. Suspensi kuman tanam ke media Mueller Hinton (MH) dengan tehnik *Street plate* dengan swab steril
4. Pelubang sumuran yang sudah steril, ditempatkan pada permukaan media MH dengan jarak ring satu sama lain ± 50 mm
5. Rebusan kulit mangga dipipet sesuai konsentrasi sebanyak 50 μ l beserta pengulangannya
6. Menginkubasi media MH tersebut dengan suhu 37°C selama 1x24 jam

Hari keempat:

1. Mempersiapkan Alat dan Bahan
Alat: Penggaris, buku,
Bahan: Media MH
2. Mengamati zona hambat yang terjadi pada media MH disetiap konsentrasi dan pengulangannya
2. Zona hambat yang terbentuk ditiap konsentrasi diukur dengan menggunakan jangka sorong / atau penggaris.
3. Mencatat hasil yang diamati sebagai data

3.6 Pengumpulan Data dan Analisa Data

3.6.1 Metode Pengumpulan Data

Data yang diperoleh dari pemeriksaan air rebusan kulit mangga (*Mangifera indica L.*) arumanis terhadap *Salmonella typhi* selama 2 hari dengan

menggunakan metode difusi disajikan dalam bentuk Tabel 3.2 Pembacaan hasil dibandingkan dengan Kontrol Positip.

Tabel 3.2 Pengaruh Air rebusan kulit mangga terhadap *Salmonella typhi*

No	Perlakuan	Pengulangan (mm)			Total	Rata-rata	Std.deviation
		I	II	III			
1	K (+)						
2	10%						
3	20%						
4	30%						
5	40%						
6	50%						
7	60%						
8	70%						
9	80%						
10	90%						
11	100%						

3.6.2 Metode Analisa Data

Data pertumbuhan *Salmonella typhi* yang telah diberi rebusan kulit mangga kemudian diuji normalitas data dengan one sample kolmogorov smimov, apabila data terdistribusi normal lanjut ke uji Homogenitas dengan levene test apabila data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen maka dianalisis dengan Kruskal Wallis dengan nilai $\alpha < 0,05$ untuk mengetahui pengaruh rebusan kulit mangga terhadap pertumbuhan *Salmonella Thypi* dengan tingkat kesalahan 5% (0,05).