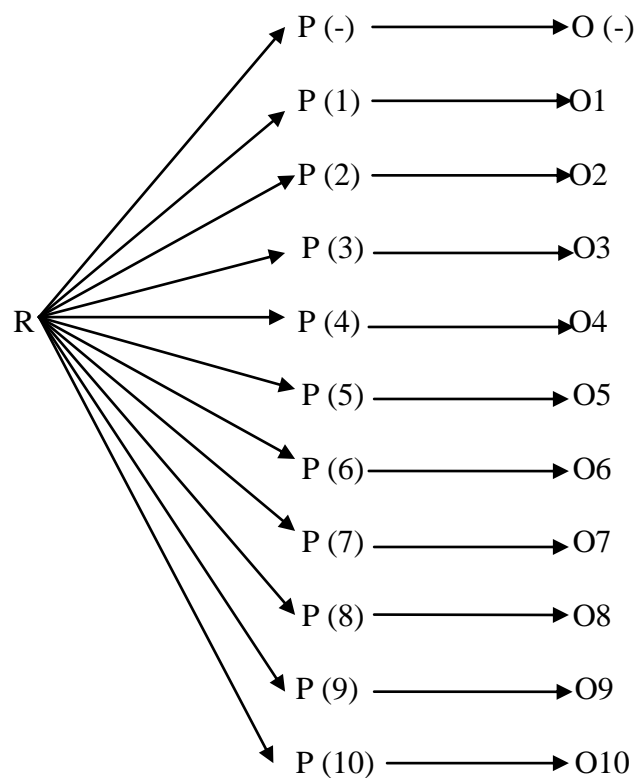


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan tujuan untuk mengetahui konsentrasi terkecil pada rebusan daun putri malu yang dapat membunuh bakteri *Escherichia coli* dengan rancangan penelitian sebagai berikut :



Gamabar 3.1 Rancangan penelitian

Keterangan :

R : Random.

P (-) : Perlakuan tanpa diberi air rebusan daun putri malu.

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

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi Penelitian

Populasi yang diambil dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli*.

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* yang di ambil pada media NAS. Terdapat 11 kelompok data sehingga setiap kelompok terdiri dari 3 sampel (ulangan), berdasarkan rumus:

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

$$(n-1)(11-1) \leq 15$$

$$(n-1)10 \leq 15$$

$$10n - 10 \leq 15$$

$$10n \leq 15 + 10$$

$$10n \leq 25$$

$$n \leq 25 : 10$$

$$n \leq 2,5$$

$$n \sim 3$$

Keterangan:

n = jumlah sampel

k = kelompok (perlakuan)

(Hidayat, 2010).

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dan pemeriksaan sampel dilakukan di laboratorium Mikrobiologi prodi D3 Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan april sampai dengan Juli 2014, sedangkan waktupemeriksaan laboratoriumdilaksanakan pada bulan april 2014.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas : Konsentrasirebusan daun putri malu.

Variabel terikat : Pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

Variabel kontrol : suhu (inkubasi 37°),waktu (inkubasi 24 jam)

3.4.2 Definisi Operasional

1. Konsentrasi air rebusan daun putri malu dikategorikan menjadi berbagai macam konsentrasi, yaitu: 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, dan 0% (kontrol).
2. Pertumbuhan bakteri *Escherichiacoli* adalah *Escherichiacoli* yang terdapat dimasing-masing konsentrasi air rebusan daun putri malu dengan melihat kekeruhan pada masing – masing tabung setelah di inkubasi selama 24 jam 37°C.

3.5 Metode Pengumpulan Data

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

3.5.1 Prinsip Pemeriksaan

Senyawa antibakteri 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).

3.5.2 Alat Pemeriksaan

Alat yang digunakan dalam pemeriksaan ini adalah sebagai berikut:

- | | |
|------------------|----------------------------|
| 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 |

3.5.3 Bahan Pemeriksaan

Bahan yang digunakan dalam pemeriksaan ini adalah sebagai berikut:

1. rebusan daun putri malu
2. Suspensi kuman *E.coli*
3. Aquades steril
4. Media Nutrient Agar Plate (NAP)
5. Pz steril
6. Media Eosin Methylene Blue (EMB)

3.5.4 Reagen Pemeriksaan

Reagen yang digunakan dalam pemeriksaan ini adalah sebagai berikut:

1. NaOH 0.1 N
2. HCL 0.1 N

3.5.5 Prosedur Pembuatan Suspensi Kuman *Escherichia coli*

Prosedur pembuatan suspensi kuman *Escherichia coli* sesuai dengan metode Mc.Farlan I:

1. Menyiapkan 2 tabung steril, 1 untuk suspensi dan yang 1 untuk standart Mc Farlan I.
2. Prosedur membuat standart Mc Farlan I, yaitu:
 - a. Membuat perbandingan antara BaCl 1% : H₂SO₄ 1 % sebesar 1 : 9.
 - b. Memipet 0,1 ml BaCl 1 % + 0,9 ml H₂SO₄ 1 %.
 - c. Menghomogenkan dengan cara kocok pelan tabung.
 - d. Standart Mc Farlan I ini sama dengan tiap 1 ml nya mengandung 300 juta kuman.
3. Prosedur membuat suspensi kuman *Escherichia coli*, yaitu:
 - a. Mengisi tabung steril dengan pz ± 5 ml.
 - b. Mengambil kuman dari biakan *Escherichia coli* murni yang sudah ditanam di media NAS dengan lidi kapas steril.
 - c. Menyelupkan lidi kapas steril yang sudah ada kuman *Escherichia coli* pada tabung yang berisi pz.
 - d. Membandingkan kekeruhan suspensi kuman *Escherichia coli* dengan Mc Farlan I.

- e. Apabila suspensi kuman *Escherichia coli* kurang keruh, maka tambahkan kuman *Escherichia coli* dengan lidi kapas dan apabila terlalu keruh tambahkan pz hingga warnanya sama dengan standart Mc Farlan I.

Untuk mendapatkan kuman 1 juta dalam setiap 1 ml larutan, maka dilakukan pengenceran, dengan cara:

- a. Menyiapkan tabung steril.
- b. Memipet 9,97 ml Pz steril dan 0,033 ml suspensi kuman *Escherichia coli* yang sesuai dengan standart Mc Farlan I tadi.
- c. Menghomogenkan suspensi kuman *Escherichia coli* dengan cara dikocok pelan.
- d. Suspensi kuman *Escherichia coli* dengan jumlah 1 juta kuman *Escherichia coli* per ml siap digunakan.

(Wikipedia, 2009)

3.5.6 Prosedur Pembuatan Media Nutrient Agar Plate (NAP)

Prosedur pembuatan media Nutrient Agar Plate (NAP) adalah sebagai berikut:

1. Melakukan perhitungan media NA (Nutrient Agar).
2. Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan.
3. Menimbang bahan (media NA) sesuai dengan perhitungan menggunakan timbangan.
4. Mengukur volume aquadest 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 atm selama 15 menit.
10. Setelah turun dari autoclave, menuangkannya ke dalam plate yang steril sampai rata.
11. Mendiampkannya sampai terlihat padat dan menyimpannya ke almari es.

(Sumarsono, 1996)

3.5.7 Prosedure Pembuatan Media EosineMethyline Blue (EMB)

Prosedure Pembuatan Media EosineMethyline Blue

(EMB) adalah sebagai berikut:

1. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
2. Melakukan perhitungan terhadap media EMB yang dibutuhkan.
3. Melakukan penimbangan bahan sesuai dengan yang diperlukan menggunakan timbangan.
4. Mengukur volume aquadest yang di butuhkan yaitu sebanyak 340 ml dengan gelas ukur.
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang tadi dengan aquadest yang sudah diukur volumenya ke dalam erlenmeyer.

6. Memanaskannya diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih.
7. Mengangkat larutan yang sudah larut sempurna dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom 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
10. Menyeterilisasi larutan tersebut bersama dengan plate yang dibutuhkan di autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
10. Setelah turun dari Autoclave, menuang lartan tadi ke dalam plate. Masing – masing plate \pm 17 ml secara steril dekat dengan api.

(Sumarsono, 1996)

3.5.8 Prosedur pembuatan konsentrasi rebusan daun putri malu

Prosedur pembuatan konsentrasi 100%-10% rebusan daun putri malu adalah sebagaiberikut:

1. Memisahkandaun putri malu dengan batangnya
2. Mencuci daun putri malu dengan air lalu di lanjutkan dengan mencuci dengan aquadest steril
3. menimbang daun putri malu \pm 50 gr
4. Merebusdaunputrimaludengan50 ml aquadestpadasuhu 50°C - 90°C selama 15 menit.
5. Menyaring air rebusandaun putri malutersebutdengan kertassaringyang steril. Menyaring sampai benar-benar jernih.

6. Menyentrifuge kembali rebusan tadi ditabung sentrifuge yang steril sehingga didapatkan perasan yang benar- benar jernih (lakukan 3x pengulangan)
 7. Mengambil 1 mata ose air rebusan yang sudah jernih secara steril, kemudian menanamnya ke media NAP, dengan cara menggoreskannya dipermukaan media
 8. Menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37° C
 9. Mengamati hasilnya, jika tidak terjadi pertumbuhan kuman berarti air rebusan daun putri malu tadi sudah benar – benar steril. Namun jika pada media NAP terdapat pertumbuhan kuman berarti perlu dilakukan proses tindalisasi, yaitu:
 - a) Memanaskan air rebusan daun putri malu dengan waterbath pada suhu 90° C selama 15 menit
 - b) Kemudian meletakkannya di inkubator selama 24 jam pada suhu 37° C
 - c) Mengulangi perlakuan tersebut sampai 3 kali
 10. Menanam kembali air rebusan daun putri malu yang sudah melalui proses tindalisasi di media NAP dan menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37° C
- . Membuat konsentrasi 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, dan 10% Pz steril, yaitu :
- Konsentrasi 100% : Tabung 1 di isi 1 ml air rebusan daun putri malu awal, itu sebagai konsentrasi 100%
- Konsentrasi 90% : Tabung 2 di isi 0.1 ml Pz steril ditambahkan air rebusan daun putri malu konsentrasi 100% sebanyak 0.9 ml, kemudiandihomogenkan

- Konsentrasi 80% : Pada tabung 3 diisi 0.2 ml Pz steril ditambahkan air rebusan daun putri malu konsentrasi 100% sebanyak 0.8 ml, kemudiandihomogenkan
- Konsentrasi 70% : Pada tabung 4 diisi 0.3 ml Pz steril ditambahkan air rebusan daun putri malu konsentrasi 100% sebanyak 0.7 ml, kemudiandihomogenkan
- Konsentrasi 60% : Pada tabung 5 diisi 0.4 ml Pz steril ditambahkan air rebusan daun putri malukonsentrasi 100% sebanyak 0.6 ml, kemudiandihomogenkan
- Konsentrasi 50% : Pada tabung 6 diisi 0.5 ml Pz steril ditambahkan air rebusan daun putri malukonsentrasi 100% sebanyak 0.5 ml, kemudiandihomogenkan
- Konsentrasi 40% : Pada tabung 7 diisi 0.6 ml Pz steril ditambahkan air rebusan daun putri malu konsentrasi 100% sebanyak 0.4 ml, kemudiandihomogenkan
- Konsentrasi 30% : Pada tabung 8 diisi 0.7 ml Pz steril ditambahkan air rebusan daun putri malu konsentrasi 100% sebanyak 0.3 ml, kemudiandihomogenkan
- Konsentarsi 20% : Pada tabung 9 diisi 0.8 ml Pz steril ditambahkan air rebusan daun putri malu konsentrasi 100% sebanyak 0.2 ml, kemudiandihomogenkan
- Konsentrasi 10% : Pada tabung 10 diisi 0.9 ml Pz steril ditambahkan air rebusan daun putri malu konsentrasi 100% sebanyak 0.1 ml, kemudiandihomogenkan

Konsentrasi 0% : Pada tabung 11 diisi 1 ml Pz steril tanpa diberi tambahan rebusan daun putri malu.

(Anonim, 1996)

3.5.9 Prosedur Pemeriksaan Sampel

Hari pertama :

1. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
2. Menyalakan api spirtus dengan korek api.
3. Memberi label pada masing-masing tabung sesuai dengan konsentrasinya, yaitu konsentrasi 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% dan 0% atau C (Control).
4. Memanaskan ose bulat diatas nyala api spirtus, mengambil suspensi kuman *Escherichiacoli* sebanyak 1 mata ose dan membiakkannya di tabung berlabel 100% dengan cara menggesekkan ose didinding permukaan media cair sebanyak 3 kali.
5. Kemudian mengambil lagi 1 mata ose kuman *Escherichiacoli* pada suspensi kuman dan membiakkannya pada tabung berlabel 90%, begitu seterusnya sampai pada tabung C.
6. Semua perlakuan dilakukan secara steril dekat dengan api.
7. Menutup kembali tabung dengan kapas berlemak.
8. Menginkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Hari kedua :

1. Mengamati masing-masing tabung, apakah terjadi kekeruhan atau tidak.

2. kemudian dari tabung ditanam ke media EMB dengan mengambil satu mata ose bulat diatas nyala api spirtus dan di tanam ke media padat (EMB) dengan tujuan memastikan apakah kuman tersebut adalah *Escherichiacoli*.
3. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Hari ketiga :

1. Mengamati hasilnya pada media padat apakah terbentuk koloni yang mengidentifikasi kuman tersebut adalah *Escherichiacoli*.
2. Mencatat hasil yang di amati sebagai data.

3.5.10 Tabulasi Data

Data yang diperoleh ditabulasikan sebagai berikut :

Tabel 3.1. Contoh tabulasi data

No	Kode Sampel	Konsentrasi										
		100%	90%	80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	10%	C
1.	T1											
2.	T2											
3.	T3											
Jumlah												

Dengan keterangan :

Posistif (+) : Terjadi pertumbuhan kuman *Escherichia coli*(Keruh).

Negatif (-) : Tidak terjadi pertumbuhan kuman *Escherichia coli*(jernih).

3.6 Metode Analisis Data

Data yang diperoleh diuji menggunakan uji chi – square dengan tingkat kesalahan 5% (0,05).