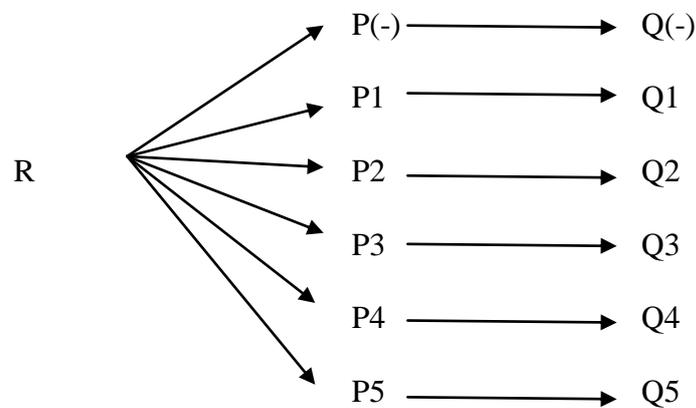


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh air rebusan daun alamanda (*Allamanda cathartica* Linn) terhadap pertumbuhan *Streptococcus sp* Desain penelitiannya adalah sebagai berikut :



Gambar 3.1 : Rancangan Penelitian.
(Sibagariang, 2010)

Keterangan :

R : Random.

P (-) :Perlakuan tanpa diberi air perasan daun alamanda..

P1 :Perlakuan dengan pemberian air rebusan daun alamanda konsentrasi100%.

P2 :Perlakuan dengan pemberian air rebusan daun alamanda konsentrasi 80%.

P3 : Perlakuan dengan pemberian air rebusan daun alamanda konsentrasi 60%.

P4 : Perlakuan dengan pemberian air rebusan daun alamanda konsentrasi 40%.

P5 : Perlakuan dengan pemberian air rebusan daun alamanda konsentrasi 20%.

Q(-): Observasi pertumbuhan *Streptococcus sp* tanpa pemberian air rebusan daun alamanda.

Q1 : Observasi pertumbuhan *Streptococcus sp* pada perlakuan dengan pemberian air rebusan daun alamanda konsentrasi 100%.

Q2 : Observasi pertumbuhan *Streptococcus sp* pada perlakuan dengan pemberian air rebusan daun alamanda konsentrasi 80%.

Q3 : Observasi pertumbuhan *Streptococcus sp* pada perlakuan dengan pemberian rebusan daun alamanda konsentrasi 60%.

Q4 : Observasi pertumbuhan *Streptococcus sp* pada perlakuan dengan pemberian air rebusan daun alamanda konsentrasi 40%.

Q5 : Observasi pertumbuhan *Streptococcus sp* pada perlakuan dengan pemberian air rebusan daun alamanda konsentrasi 20%.

3.2 Populasi Dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus sp* yang diambil dari saliva.

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus sp* yang ditanam di media *Nutrient Agar* (NA). Terdapat 7 kelompok data, sehingga setiap kelompok terdiri dari 4 sampel (ulangan), berdasarkan rumus :

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

$$(n-1) (6-1) > 15$$

$$(n-1) 5 > 15$$

$$5n - 5 > 15$$

$$5n > 15+5$$

$$5n > 20$$

$$n > 4$$

Keterangan :

n = jumlah sampel

k = kelompok / perlakuan

(Sibagariang, 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

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2015 sampai dengan bulan Juli 2016. Sedangkan waktu pemeriksaan dilaksanakan pada bulan Juni 2016.

3.4 Variabel Penelitian Dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas : Konsentrasi air rebusan daun alamanda.

Variabel terikat : Pertumbuhan bakteri *Streptococcus sp.*

Variabel Kontrol : Lama perlakuan, sterilisasi alat, suhu perebusan daun dan suhu inkubasi bakteri, volume media.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

1. Konsentrasi air rebusan daun alamanda yaitu Rebusan daun alamanda yang dibuat dari 100 gr daun alamanda ditambah 100ml aquades dan direbus dengan dalam waktu 15 menit. Data konsentrasi air rebusan daun alamanda dari penelitian ini berupa keterangan yaitu skala ordinal yang dikategorikan menjadi berbagai macam konsentrasi, yaitu 100%,80%,60%,40%,20%.
2. Pertumbuhan bakteri *Streptococcus sp* dalam penelitian ini yaitu lebar zona hambat pada media NAP yang tidak ditumbuhi bakteri *Streptococcus sp*
3. Saliva adalah cairan yang diperoleh secara swab di daerah lidah dan sela-sela gigi di dalam rongga mulut.
4. Lama perlakuan yaitu waktu inkubasi media yang sudah ditanami bakteri *Streptococcus sp* dan diberi perlakuan rebusan selama 24 jam.
5. Sterilisasi alat merupakan proses pemusnahan semua organisme. Dilakukan sebelum melakukan penelitian di dalam autoclave dengan suhu 121⁰ C, tekanan 1 atm selama 15 menit.
6. Suhu yang digunakan untuk inkubasi bakteri adalah 37⁰ C.
7. Volume media yang digunakan untuk penanaman bakteri harus sama yaitu 17 ml.

3.5 Tahapan Pemeriksaan

3.5.1 Metode Pemeriksaan

Penelitian ini menggunakan metode kertas saring (paper disk) yang dipotong dengan bentuk bulat dengan diameter 1 cm dan dicelupkan kedalam varian air rebusan daun alamanda.

3.5.2 Prinsip Pemeriksaan

Adanya kandungan flavonoid dalam air rebusan daun alamanda yang terserap kertas saring akan menghambat pertumbuhan *Streptococcus sp.*

3.5.3 Alat Dan Bahan

Alat yang digunakan dalam pemeriksaan ini adalah sebagai berikut :

Neraca analitik, Gelas arloji, Tabung reaksi, Gelas ukur, Spatel, Rak tabung, Pipet Pasteur, Api spiritus, Kaki tiga, Beaker glass, Filler, Erlenmeyer, Ose bulat, Autoclave, Plate, Pipet ukur, Kertas pH, Kertas saring, Lidi kapas steril, termometer.

Sebelum digunakan, plate, Erlenmeyer, pipet ukur, spatel, lidi kapas dan tabung reaksi yang akan dipakai disterilisasi di dalam autoclave pada suhu 121°C , tekanan 1 atm, selama 15 menit (Novel dkk,2010).

3.5.4 Bahan Pemeriksaan

Bahan yang digunakan dalam pemeriksaan ini adalah sebagai berikut:

Rebusan daun alamanda, saliva, aquades steril, Media Nutrient Agar Plate, PZ steril.

3.5.5 Reagen Pemeriksaan

Reagen yang digunakan dalam pemeriksaan ini adalah sebagai berikut :

NaOH 0,1 N, HCl 0,1 N.

3.5.6 Prosedur Pembuatan Media *Nutrient Agar Plate* (NAP)

Prosedur pembuatan media *Nutrient Agar Plate* adalah sebagai berikut :

1. Melakukan perhitungan media *Nutrient Agar* (NA).
2. Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan.
3. Menimbang bahan (media NA) sesuai dengan perhitungan menggunakan timbangan.
4. Mengukur volume aquades 150 ml menggunakan gelas ukur.
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquades yang sudah diukur volumenya di 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 0,1N, sedangkan jika terlalu basa menambahkannya dengan HCL 0,1N sampai pH nya 7,4.
9. Menutup Erlenmeyer dengan kasa kapas dan menyeterilkannya dengan autoclave pada suhu 121°C , 1 atm selama 60menit.
10. Menuangkan media NA ke dalam plate yang steril sampai rata.
11. Mendinginkannya sampai terlihat padat.

(Sumber : Novel dkk, 2010)

3.5.7 Prosedur Pembuatan Konsentrasi Air Rebusan Daun Alamanda

Prosedur Pembuatan Konsentrasi Air Perasan Daun Alamanda adalah sebagai berikut :

1. Menimbang daun alamanda 100gr (b/v).
2. Mencuci daun alamanda dengan aquades sampai bersih dan yang terakhir cuci dengan aquades.
3. Merebus daun alamanda dengan 100ml (b/v) aquades selama 15 menit (Farmakope Indonesia edisi IV , 1995).
4. Menyaring air rebusan daun alamanda tersebut dengan kertas saring sampai benar-benar jernih.
5. Membuat konsentrasi 100%, 80%, 60%, 40%, 20% yaitu:

Konsentrasi 100% : hasil rebusan daun alamanda tanpa penambahan aquades.

Konsentrasi 80% : diambil dari konsentrasi 100% sebanyak 1ml + aquadest
1ml.

Konsentrasi 60% : diambil dari konsentrasi 80% sebanyak 1ml + aquadest
1ml.

Konsentrasi 40% : diambil dari konsentrasi 60% sebanyak 1ml + aquadest
1ml.

Konsentrasi 20% : diambil dari konsentrasi 40% sebanyak 1 ml + aquadest
1ml.

3.5.8 Prosedur Pengambilan Sampel Saliva

1. Melihat rekam medis pasien rawat jalan poli spesialis gigi di Rumah Sakit Soerya
2. Memastikan pasien tersebut mendapat diagnosa karies gigi
3. Mengambil saliva dengan menggunakan swab steril dan langsung dimasukkan pada wadah yang tertutup rapat dan steril

4. Membawa sampel saliva ke Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Surabaya dengan menggunakan ice box.
5. Dilakukan Pemeriksaan sampel

3.5.9 Prosedur Pemeriksaan Sampel

Hari pertama:

1. Menyiapkan alat dan bahan.
2. Melakukan pewarnaan gram pada saliva untuk melihat adanya bakteri *Streptococcus sp* pada saliva. Langkah-langkahnya sebagai berikut :

Menggenangi preparat dengan cat gentian violet tunggu selama 1 menit, cat dibuang lalu tetesi preparat dengan lugol tunggu selama 30 detik, lugol dibuang dan mencuci dengan alkohol 96% sampai warna gentian violet larut, mencuci dengan air sampai bersih, kemudian ditetesi dengan air fuchsine dan tunggu selama 2 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan.
3. Mengambil suspensi saliva secara swab dengan lidi kapas steril.
4. Menanam ke media *Nutrient Agar Plate* (NAP). Tangguhkan selama 3-5 menit agar suspensi saliva meresap ke media *Nutrient Agar Plate* (NAP).
5. Menetesi kertas saring sampai terserap varian konsentrasi air rebusan daun alamanda.
6. Meletakkan kertas saring yang sudah menyerap rebusan daun alamanda diatas media *Nutrient Agar Plate* (NAP).
7. Menginkubasi pada 37⁰ C selama 24 jam.

Hari Kedua :

1. Melakukan pewarnaan gram untuk memastikan bakteri yang tumbuh di media NAP adalah *Streptococcus sp*.

2. Mengamati pertumbuhan bakteri pada media *Nutrient Agar Plate* (NAP).
Mengukur diameter zona jernih disekitar kertas saring yang menunjukkan telah terjadi penghambatan bakteri *Streptococcus sp.*

Sumber (Radita, 2014).

3.6 Metode Analisis Data

Setelah diperoleh hasil dalam bentuk tabel, data kemudian dianalisis dengan uji anova untuk mengetahui pengaruh konsentrasi air rebusan daun alamanda dengan α 0,05.

Tabel 3.1 Tabulasi Data Hasil Penelitian Pengaruh Konsentrasi Air Rebusan Daun Alamanda (*Allamanda cathartica* Linn) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus sp.*

Pengulangan	Diameter zona hambat(mm) pada konsentrasi air rebusan daun alamanda					
	0 %	20%	40%	60%	80%	100%
1						
2						
3						
4						
Total						
Rata-rata						