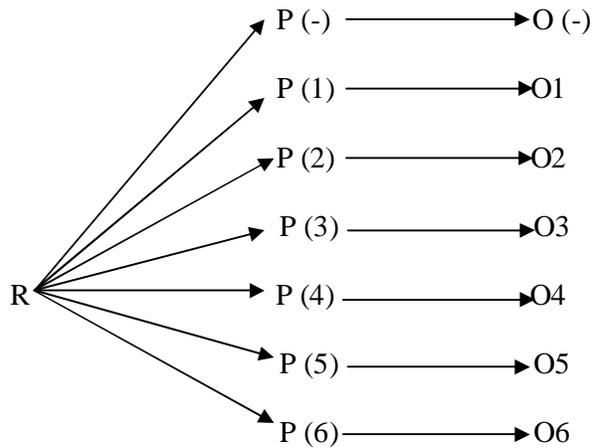


**BAB 3**  
**METODE PENELITIAN**

**3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorium dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh air rebusan daun kersen (*Muntingia calabura*) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus sp.*



Gambar 3.2 : Rancangan penelitian (Sibagariang, 2010)

Keterangan :

R : Random.

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

P (1) : Perlakuan dengan pemberian air rebusan daun kersen konsentrasi 50%.

P (2) : Perlakuan dengan pemberian air rebusan daun kersen konsentrasi 45%.

P (3) : Perlakuan dengan pemberian air rebusan daun kersen konsentrasi 40%.

P (4) : Perlakuan dengan pemberian air rebusan daun kersen konsentrasi 35%.

P (5) : Perlakuan dengan pemberian air rebusan daun kersen konsentrasi 30%.

- P (6) : Perlakuan dengan pemberian air rebusan daun kersen konsentrasi 25%.
- O (-) : Observasi pertumbuhan *Streptococcus sp* pada perlakuan tanpa pemberian air rebusan daun kersen.
- O (1) : Observasi pertumbuhan *Streptococcus sp* pada perlakuan dengan pemberian air rebusan daun kersen konsentrasi 50%.
- O (2) : Observasi pertumbuhan *Streptococcus sp* pada perlakuan dengan pemberian air rebusan daun kersen konsentrasi 45%.
- O (3) : Observasi pertumbuhan *Streptococcus sp* pada perlakuan dengan pemberian air rebusan daun kersen konsentrasi 40%.
- O (4) : Observasi pertumbuhan *Streptococcus sp* pada perlakuan dengan pemberian air rebusan daun kersen konsentrasi 35%.
- O (5) : Observasi pertumbuhan *Streptococcus sp* pada perlakuan dengan pemberian air rebusan daun kersen konsentrasi 30%.
- O (6) : Observasi pertumbuhan *Streptococcus sp* pada perlakuan dengan pemberian air rebusan daun kersen konsentrasi 25%.

## **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 NA (Nutrient Agar). Terdapat 7 kelompok data, sehingga setiap kelompok terdiri dari 4 sampel (ulangan), berdasarkan rumus:

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

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

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 15 + 6$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 21 : 6$$

$$n \geq 3,5$$

$$n \sim 4$$

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 D3 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

#### **3.3.2 Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2013 sampai dengan Juli 2014, sedangkan waktu pemeriksaan laboratorium dilaksanakan pada bulan April 2014.

### 3.4 Variabel Penelitian Dan Definisi Operasional

#### 3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas : Konsentrasi air rebusan daun kersen.

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. Rebusan daun kersen dibuat dari 100 gr daun kersen ditambah 100 ml aquades yang direbus dengan suhu 90°C dalam waktu 15 menit. Data konsentrasi air rebusan daun kersen dalam penelitian ini berupa keterangan yaitu skala ordinal yang dikategorikan menjadi berbagai macam konsentrasi, yaitu: 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25% dan 0% (kontrol) berdasarkan uji pendahuluan.
2. Data pertumbuhan bakteri *Streptococcus sp* dalam penelitian ini berupa angka yaitu skala rasio yang menunjukkan lebar zona hambat pada media NAP yang tidak ditumbuhi bakteri *Streptococcus sp.*
3. Saliva yang digunakan diperoleh secara swab di daerah lidah dan sela-sela gigi di dalam rongga mulut.
4. Lama perlakuan yaitu inkubasi media yang sudah ditanami bakteri *Streptococcus sp* dan diberi perlakuan rebusan selama 24 jam.
5. Sterilisasi alat yang dilakukan sebelum melakukan penelitian di dalam autoclave 121<sup>0</sup>C, tekanan 1 atm, 15 menit.
6. Suhu yang digunakan untuk perebusan adalah 90<sup>0</sup>C dan suhu yang digunakan untuk inkubasi bakteri adalah 37<sup>0</sup>C.

7. Volume media yang digunakan untuk penanaman bakteri harus sama yaitu 17 ml.

### **3.5 Tahapan Pemeriksaan**

Berdasarkan uji pendahuluan menggunakan konsentrasi 25%, 50%, 100% (Jawetz, 2010), didapatkan hasil tidak ada zona hambat pada konsentrasi 25%, zona hamba 13 mm pada konsentrasi 50%, dan zona hambat 17 mm pada konsentrasi 100%.

Dari hasil uji pendahuluan tersebut maka pada penelitian, konsentrasi yang digunakan adalah 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%.

#### **3.5.1 Metode pemeriksaan**

Penelitian ini memakai metode kertas saring (paper disk) yang dipotong dengan bentuk bulat diameter 0,6 cm dan ditetesi 60 µl varian konsentrasi rebusan daun kersen (Supriyadi, 2009).

#### **3.5.2 Prinsip Pemeriksaan**

Rebusan daun kersen yang terserap kertas saring akan menghambat pertumbuhan *Streptococcus sp.*

#### **3.5.3 Alat Pemeriksaan**

Alat yang digunakan dalam pemeriksaan ini adalah sebagai berikut: Neraca analitik, Gelas arloji, Tabung Reaksi, Gelas ukur, Spatula, Rak tabung, Pipet pasteur, Api spirtus, kaki tiga, Beaker glass, Filler, Erlenmeyer, Ose bulat, Autoclave, Plate, Pipet ukur, Termometer, Pinset, Kertas pH, Kertas saring whatman, Lidi kapas steril.

Sebelum dipergunakan, plate, Erlenmeyer, pipet ukur dan tabung 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 kersen, Saliva, Aquades steril, Media Nutrient Agar Plate (NAP), Pz steril.

#### **3.5.5 Reagen Pemeriksaan**

Reagen yang digunakan dalam pemeriksaan ini adalah sebagai berikut: NaOH 0.1 N, HCL 0.1 N, Minyak Imersi.

#### **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 aquades 136 ml menggunakan gelas ukur.
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquades 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 7.5, jika terlalu asam menambahkannya dengan NaOH 0.1 N, sedangkan jika terlalu basa menambahkannya dengan HCL 0.1 N sampai pH nya 7.5.
9. Menutup erlenmeyer dengan kasa kapas dan menyeterilkannya dengan autoclave pada suhu 121° C atm selama 15 menit.
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 Kersen**

Prosedur Pembuatan Konsentrasi Air Rebusan daun kersen adalah sebagai berikut:

1. Menimbang daun kersen 100 gr (b/v).
2. Mencuci daun kersen dengan sampai bersih dan yang terakhir cuci dengan aquades steril.
3. Merebus daun kersen dengan 100 ml (b/v) aquades pada suhu 90°C selama 15 menit (Farmakope Indonesia edisi IV, 1995).
4. Menyaring air rebusan daun kersen tersebut dengan kertas saring. Menyaring sampai benar-benar jernih.
6. Membuat konsentrasi 25%, 30%, 35%, 40%, 45% dan 50%, yaitu :
  - Konsentrasi 50% : 0,50 ml air rebusan daun kersen + 0,50 ml aquades steril
  - Konsentrasi 45% : 0,45 ml air rebusan daun kersen + 0,55 ml aquades steril
  - Konsentrasi 40% : 0,40 ml air rebusan daun kersen + 0,60 ml aquades steril
  - Konsentrasi 35% : 0,35 ml air rebusan daun kersen + 0,65 ml aquades steril
  - Konsentrasi 30% : 0,30 ml air rebusan daun kersen + 0,70 ml aquades steril

Konsentrasi 25% : 0,25 ml air rebusan daun kersen + 0,75 ml aquades steril

### 3.5.8 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 adalah sebagai berikut :  
Menggenangi preparat dengan carbol gentian violet selama 1 menit, Bilas air, Menggenangi preparat dengan lugol selama 1 menit, Bilas air, Menggenangi preparat dengan alkohol 96% selama 10 detik, Bilas air, Menggenangi preparat dengan air fuchsin selama 1 menit, Bilas air.
3. Mengambil suspensi saliva secara swab menggunakan lidi kapas steril.
4. Menanam ke media NAP. Tangguhkan 3-5 menit agar suspensi saliva meresap ke media NAP.
5. Menetesi kertas saring sebanyak 60 µl varian konsentrasi air rebusan daun kersen.
6. Meletakkan kertas saring yang sudah terserap oleh rebusan diatas media NAP.
7. Menginkubasi 37°C selama 24 jam.

#### Hari kedua :

1. Melakukan pewarnaan gram untuk memastikan bakteri yang tumbuh di media NAP adalah bakteri *Streptococcus sp*.
2. Mengamati pertumbuhan bakteri pada NAP. Mengukur diameter zona jernih disekitar kertas saring yang menunjukkan telah terjadi penghambatan bakteri *Streptococcus sp*.

### 3.6 Metode Analisis Data

Setelah diperoleh hasil dalam bentuk tabel, data kemudian dianalisis dengan uji anova untuk mengetahui pengaruh konsentrasi air rebusan daun kersen dengan  $\alpha$  0,05.

**Tabel 3.1. Tabulasi Data Hasil Penelitian Pengaruh Konsentrasi Air Rebusan Daun Kersen (*Muntingia calabura*) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus sp* Pada Saliva Secara *In Vitro***

Konsentrasi air rebusan daun kersen	Diameter zona hambat (mm)				Total	Rata-Rata
	1	2	3	4		
0%						
25%						
30%						
35%						
40%						
45%						
50%						