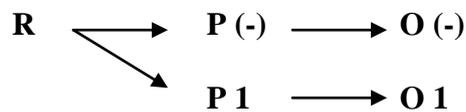


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah Eksperimental, dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh perasan daun pare (*Momordica charantia L*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.



Keterangan :

R : Random

P (-) : Tanpa pemberian perasan daun pare (kontrol)

P 1 : Dengan pemberian perasan daun pare

O (-) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* tanpa pemberian perasan daun pare

O 1 : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan perasan daun pare

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi Penelitian

Populasi yang diambil dalam penelitian ini adalah macam-macam kuman *Staphylococcus aureus* yang di peroleh dari *Balai Besar Laboratorium Kesehatan* (BBLK) Surabaya.

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel yang diambil dalam penelitian ini adalah biakan kuman murni *Staphylococcus aureus*. Terdapat 2 perlakuan sehingga setiap kelompok terdiri dari 16 sampel (ulangan), yang diperoleh dari rumus sebagai berikut:

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

$$(n-1)(2-1) \geq 15$$

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

$$1n - 1 \geq 15$$

$$1n \geq 15 + 1$$

$$1n \geq 16$$

$$n \geq 16 / 1 = 16$$

Sumber : (Zainudin, 2003).

Keterangan:

n : Jumlah sampel

k : Perlakuan

Jadi jumlah pengulangan sebanyak 16 kali

Jumlah sampel yang digunakan dalam seluruhnya ada 32 sampel dengan 2 perlakuan dan 16 pengulangan.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian di dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi D3 Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Juni – Agustus 2015, sedangkan waktu pemeriksaan dilakukan pada bulan Agustus 2015.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

1. Variabel Bebas : Perasan daun pare.
2. Variabel terikat : Pertumbuhan kuman *Staphylococcus aureus*.
3. Variabel kontrol : Sterilisasi alat, bahan dan media pertumbuhan *S.aureus*, suhu inkubasi, waktu inkubasi, waktu pengamatan, perasan bahan coba, dan metode pemeriksaan.

3.4.1 Definisi operasional variabel

1. Perasan daun pare dikategorikan menjadi tanpa pemberian sebagai kontrol dan dengan pemberian sebagai konsentrasi 100%.
2. Data pertumbuhan kuman *Staphylococcus aureus* dalam penelitian ini berupa angka yang menunjukkan lebar zona hambat pada media NAP tempat tumbuhnya *Staphylococcus aureus*.
3. Metode pemeriksaan dalam penelitian ini adalah *Disk Diffusion Test* yaitu Tes difusi Agar, caranya dengan melihat lebar zona hambat pada media NAP dan membandingkannya dengan kontrol positif.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh dengan cara Observasi tidak langsung, yaitu dengan melalui uji Laboratorium. Pemeriksaan

daya hambat bakteri *Staphylococcus aureus* ini menggunakan metode *Disk Diffusion Test*. Langkah – Langkah pemeriksan diantaranya sebagai berikut :

3.5.1 Prinsip Pemeriksaan

Pada media *Nutrien agar slant* (NAS) ditanami kuman biakan murni dari *Staphylococcus aureus* setelah melalui proses perhitungan Mc Farland 1, kemudian daun pare yang sudah steril di masukkan paper disk kosong agar bahan yang mengandung senyawa antimikroba tersebut terserap kedalamnya, Paper disk yang sudah mengandung senyawa antibiotik di tempelkan di atas permukaan media, kemudian dilihat apakah sudah terbentuk zona hambat yang menunjukkan kepekaan dari antibiotik yang selanjutnya dibandingkan dengan kontrol positif.

3.5.2 Alat – alat

Alat yang digunakan dalam pemeriksaan ini adalah sebagai berikut :

- | | |
|---------------------------|----------------------------------|
| 1. Neraca analitik | 11. Gelas arloji |
| 2. Tabung Reaksi | 12. Gelas ukur |
| 3. Batang pengaduk | 13. Rak tabung |
| 4. Pipet pasteur | 14. Api spirtus, kaki tiga, kasa |
| 5. Tabung centrifuge | 15. Filler |
| 6. Erlenmeyer | 16. Ose, pinset steril |
| 7. Autoclave | 17. Plate |
| 8. Pipet ukur | 18. Disk blanko kosong |
| 9. Kertas pH | 19. Lidi kapas steril |
| 10. Penggaris atau jangka | |

3.5.3 Bahan Pemeriksaan

1. Perasan daun pare

2. Suspensi kuman *Staphylococcus aureus*
3. Media *Nutrien agar slant* (NAS)
4. Aquades steril
5. Pz steril
6. Media *Nutrient Agar plate* (NAP)

3.5.4 Reagen Pemeriksaan

1. NaOH 0.1 N
2. HCL 0.1 N
3. H₂SO₄ 1%
4. BaCl 1%

3.5.5 Prosedure Pembuatan Nutrien Agar Plate

1. Melakukan perhitungan media NA (Nutrien Agar)

Membuat NAP 5 plate @ plate ± 15-17ml

Komposisi NA 20 gram per 1 Liter → $\frac{20\text{gram} \times 85\text{ml}}{1000\text{ ml}} = 1,7\text{ gram}$
2. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
3. Menimbang media NA sesuai dengan perhitungan yaitu gram menggunakan timbangan
4. Mengukur volume aquades sebanyak 85 ml menggunakan gelas ukur
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest yang sudah di ukur volumenya ke dalam erlenmeyer
6. Memanaskan larutan tersebut diatas api bunsen atau hotplate sampai larut sempurna jangan sampai mendidih

7. Mengangkat larutan yang sudah di panaskan dan letakan dalam baskom berisi air hingga suam-suam kuku
8. Mengukur pH media yaitu 7,4. Jika terlalu asam tambahkan NaOH , sedangkan jika terlalu basa tambahkan HCL hingga pH 7,4
9. Menutup erlenmeyer dengan kapas berlemak dan mensterilkan dengan autoclave pada suhu 121^oC selama 15 menit
10. Setelah dikeluarkan dari autoclave maka dituangkan ke dalam plate steril hingga merata
11. Mendinginkan media sampai terlihat memadat dan simpan dalam lemari es

3.5.6 Prosedure pemeriksaan

A. Pembuatan suspensi kuman *Staphylococcus aureus*

Pembuatan suspensi kuman sesuai dengan metode Mc Farland I sebagai berikut:

1. Menyiapkan 2 tabung steril, 1 untuk suspensi kuman dan yang 1 lagi untuk standart Mc Farland I.
2. Prosedur membuat standart Mc Farland I, yaitu:
 - a. Membuat perbandingan antara BaCl 1% : H₂SO₄ 1 % sebesar 1 : 99
 - b. Memipet 0,1 ml BaCl 1 % + 9,99 ml H₂SO₄ 1 %.
 - c. Menghomogenkan dengan cara mengocok tabung secara perlahan.

Standart Mc Farland I ini sama dengan tiap 1 ml nya mengandung 300 juta kuman.

3. Prosedur membuat suspensi kuman, yaitu:
 - a. Mengisi tabung steril dengan pz ± 5 ml.

- b. Mengambil kuman dari biakan *Staphylococcus aureus* murni yang sudah ditanam di media NAS dengan lidi kapas steril.
- c. Menyelupkan lidi kapas steril yang sudah ada kumannya pada tabung yang berisi pz.
- d. Membandingkan kekeruhan suspensi kuman dengan Mc Farland I.
- e. Apabila suspensi kuman kurang keruh, maka tambahkan kuman dengan lidi kapas steril dan apabila terlalu keruh, maka tambahkan pz steril hingga kekeruhannya sama dengan standart Mc Farland I.

B. Prosedure Pembuatan Perasan daun pare

Prosedure pembuatan perasan daun pare yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memetik daun pare dari pohonnya
2. Mencuci daun sampai bersih dan bilas dengan aquadest steril
3. Menimbang daun pare yang segar sebanyak 100 gram
4. Menghaluskan daun sampai halus. Sebelumnya mortal diusap dengan alkohol agar steril
5. Menyaring daun pare yang sudah dihaluskan tadi dengan kasa yang steril.
6. Menyentrifuge perasan yang ada di dalam tabung sentrifuge yang steril sehingga didapatkan perasan yang benar-benar jernih.

C. Prosedur tindalisasi

1. Mengambil satu mata ose bulat perasan yang telah benar-benar jernih tersebut secara steril, lalu menanamnya ke media NAP dengan cara menggoreskannya dipermukaan media

2. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C
3. Mengamati hasilnya jika tidak terjadi pertumbuhan kuman berarti perasan daun pare tadi sudah benar-benar steril. Tetapi jika pada media NAP terdapat pertumbuhan kuman berarti perlu dilakukan proses tindalisasi (pemanasan bertingkat), yaitu :
 4. Memanaskan perasan daun pare dengan waterbath pada suhu 90°C selama 15 menit
 5. Kemudian meletakkannya di incubator selama 24 jam pada suhu 37°C
 6. Perlakuan tersebut sampai 3 kali
 7. Menanam kembali perasan daun pare yang sudah melalui proses tindalisasi di media NAP dan menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37°C.

D. Prosedur Pemeriksaan *Staphylococcus aureus*

Hari pertama pemeriksaan :

1. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
2. Kemudian menyalakan api spirtus dengan korek api.
3. Memanaskan ose bulat diatas nyala api spirtus.
4. Mengambil suspensi kuman murni *Staphylococcus aureus* sebanyak 1 mata ose dan membiakkannya pada media *Nutrient Agar Slant* (NAS).
5. pada suhu 37°C selama 24 jam.

Hari kedua :

1. Membuatan suspensi kuman dengan metode Mc Farland 1.
2. Menyiapkan disk tanpa pemberian perasan dan dengan pemberian perasan (sudah di rendam selama \pm 1 jam)
3. Mengambil kuman dengan lidi kapas steril dari pembuatan suspensi kuman Mc. Farland 1.
4. . Pada media NAP dilakukan penanaman kuman *Staphylococcus aureus* yang sudah di standart Mc Farland 1 (menggunakan lidi kapas steril).
5. Memisahkan perlakuan tanpa pemberian dan dengan pemberian masing-masing 16 plate
6. Ambil pinset steril dan disk blanko kosong (kertas whatman WH 40 dengan diameter 0,5 cm= 5mm dan yang mempunyai ketebalan 0,5 mm mempunyai pori-pori rapat 0,05 mikropore (SNI 02-3769-1995), kemudian letakkan disk yang sudah direndam dalam perasan daun pare selama 1 jam.
7. Tempelkan disk blanko kosong yang tidak diberi perasan daun pare pada plate yang telah berisi media NAP dan kuman, Tangguhkan 3 – 5 menit.
8. Meletakkan disk di media NAP pada perlakuan tanpa pemberian sebanyak 7 tempat, sebaliknya dengan perlakuan pemberian perasan.
9. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Hari Ketiga :

1. Mengamati hasilnya pada media padat apakah terbentuk zona hambat yang mengidentifikasi bahwa antibiotik tersebut peka terhadap *Staphylococcus aureus* dan bandingkan dengan kontrol positif.
2. Mengukur diameter zona hambat dengan penggaris atau jangka.
3. Mencatat hasil diameter zona hambat yang diamati sebagai data.

Hasil perbandingan rata-rata pertumbuhan bakteri stapylococcus aureus sebelum dan setelah pemberian perasan daun pare

Kode Sampel	Rata-Rata Diameter Zona Hambat Setelah Pemberian Perasan Daun Pare (mm)	
	Tanpa Pemberian Perasan Daun Pare	Tanpa Pemberian Perasan Daun Pare
Sampel 1		
Sampel 2		
Sampel 3		
Sampel 4		
Sampel 5		
Sampel 6		
Sampel 7		
Sampel 8		
Sampel 9		
Sampel 10		
Sampel 11		
Sampel 12		
Sampel 13		
Sampel 14		
Sampel 15		
Sampel 16		
Rata-Rata		
Sd		

3.6 Metode Analisa Data

Setelah diperoleh data dalam bentuk tabel, data kemudian dianalisis dengan menggunakan Uji Wilcoxon Test dengan tingkat kesalahan 5% (0,05).