

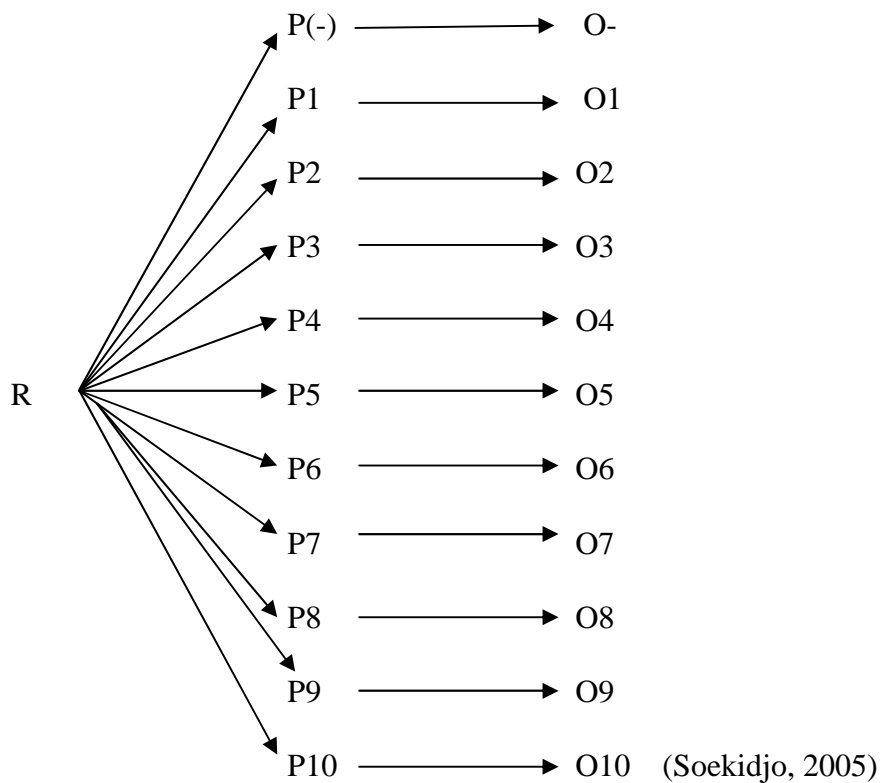
BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah eksperimental dengan tujuan untuk mengetahui konsentrasi terkecil pada rebusan air daun sirsak yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.2 Rancangan Penelitian



Keterangan :

R : Random

P (-) : Perlakuan tanpa diberi air rebusan daun sirsak

P1 : Perlakuan konsentrasi rebusan daun sirsak 100%

P2 : Perlakuan konsentrasi rebusan daun sirsak 90%

- P3 : Perlakuan konsentrasi rebusan daun sirsak 80%
- P4 : Perlakuan konsentrasi rebusan daun sirsak 70%
- P5 : Perlakuan konsentrasi rebusan daun sirsak 60%
- P6 : Perlakuan konsentrasi rebusan daun sirsak 50%
- P7 : Perlakuan konsentrasi rebusan daun sirsak 40%
- P8 : Perlakuan konsentrasi rebusan daun sirsak 30%
- P9 : Perlakuan konsentrasi rebusan daun sirsak 20%
- P10 : Perlakuan konsentrasi rebusan daun sirsak 10%
- O(-) : Observasi setelah perlakuan kontrol
- O1 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 100%
- O2 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 90%
- O3 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 80%
- O4 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 70%
- O5 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 60%
- O6 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 50%
- O7 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 40%
- O8 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 30%
- O9 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 20%
- O10 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 10%

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya.

3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* dalam biakan media *Nutrient Agar Salt* (NAS). Besar sampel dalam penelitian ini adalah 3 yang ditentukan dengan rumus berikut :

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

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

$$10n-n-1n+1 \geq 15$$

$$9n-9 \geq 15$$

$$9n \geq 24$$

$$n \geq 24/9$$

$$n \geq 2,7 \approx 3 \text{ (Zainuddin, 2003)}$$

Keterangan :

k : Perlakuan atau jumlah kelompok

n : Replikasi atau jumlah ulangan atau jumlah sampel

3.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya, sedangkan waktu penelitian dilakukan pada bulan Maret 2012 sampai Juli 2012 dan waktu pemeriksaan dilaksanakan pada bulan Juli 2012.

3.5 Variabel dan Definisi Operasional Variabel

3.5.1 Variabel

Variabel bebas : konsentrasi rebusan daun sirsak

Variabel terikat : pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

Variabel kontrol : sterilisasi, inkubasi, cara inokulasi, jumlah bakteri

3.5.2 Definisi operasional variabel

1. Konsentrasi rebusan daun sirsak adalah rebusan daun sirsak yang diencerkan dengan aquades steril menjadi konsentrasi bertingkat 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%
2. Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* adalah bakteri yang tumbuh ditandai dengan adanya kekeruhan pada rebusan daun sirsak yang ditambahkan bakteri *Staphylococcus aureus*. Pertumbuhan dikategorikan menjadi positif(+) : ada pertumbuhan (keruh) bakteri *Staphylococcus aureus*, jika pada media menjadi negatif (-) : tidak ada pertumbuhan (jernih) bakteri *Staphylococcus aureus*
3. Sterilisasi, inkubasi, cara inokulasi, jumlah bakteri pada penelitian ini dikategorikan sebagai perlakuan kontrol rebusan daun sirsak terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Sterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121⁰C selama 15 menit, inkubasi dilakukan pada suhu 37⁰C selama 24 jam, cara inokulasi menggunakan ose yang sudah distandarisasi, jumlah kuman yang digunakan dalam penelitian menggunakan standart Mac Farland 0,5 suspensi bakteri untuk 1 mata ose standart 1/300 ml akan mengandung bakteri 5x10⁵ bakteri/ml.

3.6 Teknik Pengumpulan Data

3.6.1 Metode Pemeriksaan

Penelitian ini menggunakan metode Dilusi, dengan mengamati pertumbuhan bakteri pada rebusan daun sirsak yang ditandai dengan adanya kekeruhan.

3.6.2 Prinsip Pemeriksaan

Senyawa antibakteri diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi, kemudian masing-masing konsentrasi ditambahkan suspensi bakteri uji dalam media cair. Perlakuan tersebut di inkubasi dan diamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan terjadinya kekeruhan.

3.6.3 Alat - alat

1. Tabung reaksi
2. Rak tabung reaksi
3. Sengkelit atau ose standar
4. Incubator
5. Pipet ukur
6. Tisu
7. Timbangan
8. Labu erlemeyer
9. Spidol permanen
10. Autoclave
11. Lampu bunsen
12. Petridish
13. Kapas berlemak
14. Pushball
15. Laminary flow

3.6.4 Bahan – bahan

1. Rebusan daun sirsak
2. Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

standart Mac Farland 0,5 makat tambahkan PZ (NaCl 0,85% - 0,9%) steril, dan apabila kekeruhan yang diperoleh masih kurang dari standart Mac Farland 0,5 maka tambahkan dengan kultur murni bakteri *Staphylococcus aureus*, lakukan hal tersebut sampai didapatkan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* yang sesuai dengan standart Mac Farland 0,5. Suspensi bakteri ini untuk 1 mata ose standar 1/300 ml akan mengandung bakteri 5×10^5 bakteri/ml.

3.7.3 Pembuatan rebusan daun sirsak

Daun sirsak dicuci sebanyak 3 kali dengan menggunakan aquades. Setelah kering ditimbang sebanyak 100 gram dan ditambah aquades steril sebanyak 100 ml, direbus pada suhu 90° C selama 15 menit, kemudian disaring, Karena hasil rebusan agak keruh maka rebusan daun sirsak dicentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan rebusan daun sirsak yang jernih. Rebusan daun sirsak jernih yang didapatkan adalah rebusan daun sirsak dengan konsentrasi 100%. Kemudian dilakukan uji sterilitas dengan ditanam pada media *Nutrient Agar Plate* (NAP) lalu inkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Apabila tidak terdapat pertumbuhan kuman maka sampel daun sirsak dinyatakan telah steril, setelah itu dilakukan pengenceran.

3.7.4 Proses pengenceran daun sirsak.

Air dari rebusan daun sirsak 100% dibuat pengenceran dengan menggunakan aquades steril menjadi konsentrasi bertingkat 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% dan 10%, serta kontrol positif dan kontrol negatif. Yang masing – masing diulang sebanyak 3 kali dengan cara sebagai berikut : Menyiapkan 12 tabung reaksi steril, letakkan di rak tabung. Tabung 1 untuk konsentrasi 100%, tabung 2 untuk konsentrasi 90%, dan seterusnya sampai

dengan tabung 10. Sedangkan pada tabung 11 dan 12 digunakan sebagai kontrol.

Adapun ketentuan konsentrasi pengenceran sebagai berikut :

1. Tabung 1 (konsentrasi 100%): dipipet 1 ml rebusan daun sirsak 100% tanpa penambahan aquades steril.
2. Tabung 2 (konsentrasi 90%) : dipipet 0,9 ml rebusan daun sirsak 100%, lalu tambahkan 0,1 ml aquades steril.
3. Tabung 3 (konsentrasi 80%) : dipipet 0,8 ml rebusan daun sirsak 100%, lalu tambahkan 0,2 ml aquades steril.
4. Tabung 4 (konsentrasi 70%) : dipipet 0,7 ml rebusan daun sirsak 100%, lalu tambahkan 0,3 ml aquades steril.
5. Tabung 5 (konsentrasi 60%) : dipipet 0,6 ml rebusan daun sirsak 100%, lalu tambahkan 0,4 ml aquades steril.
6. Tabung 6 (konsentrasi 50%) : dipipet 0,5 ml rebusan daun sirsak 100%, lalu tambahkan 0,5 ml aquades steril.
7. Tabung 7 (konsentrasi 40%) : dipipet 0,4 ml rebusan daun sirsak 100%, lalu tambahkan 0,6 ml aquades steril.
8. Tabung 8 (konsentrasi 30%) : dipipet 0,3 ml rebusan daun sirsak 100%, lalu tambahkan 0,7 ml aquades steril.
9. Tabung 9 (konsentrasi 20%) : dipipet 0,2 ml rebusan daun sirsak 100%, lalu tambahkan 0,8 ml aquades steril.
10. Tabung 10 (konsentrasi 10%) : dipipet 0,1 ml rebusan daun sirsak 100%, lalu tambahkan 0,9 ml aquades steril.
11. Tabung 11 (kontrol positif) : dipipet 1 ml rebusan daun sirsak

12. Tabung 12 (kontrol negatif) : dipipet 1 ml media NaCl Broth ditambah 1 mata ose suspensi bakteri

3.7.5 Uji Daya Hambat

Menyediakan suspensi bakteri yang setara dengan Mac Farland 0,5 yang sebanding dengan $1,5 \times 10^8$ bakteri/ml. Suspensi bakteri ini untuk 1 mata ose standar 1/300ml akan mengandung bakteri 5×10^5 , lalu menyiapkan sampel yang telah dibuat pengenceran.

1. Sampel rebusan daun sirsak dengan konsentrasi 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, dan 10%. Kemudian menambahkan suspensi bakteri masing-masing 1 mata ose terstandarisasi 1/300.
2. Inkubasi semua tabung dan kontrol pada suhu 37° C selama 24 jam dalam inkubator.
3. Penilaian bakteri dilakukan bila kontrol positif tetap jernih dan kontrol negatif menjadi keruh. Jika ragu untuk menentukan keruh atau tidak, maka untuk mengetahui ada tidaknya pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dilanjutkan dengan menanam 1 mata ose pada media MSA dari pengenceran rebusan daun sirsak kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam.

3.8 Metode Pengumpulan Data

Untuk memperoleh data dan informasi yang mempunyai kualitas dan validitas yang cukup tinggi, maka penelitian dilakukan dengan eksperimen laboratorium yang kemudian ditabulasikan (data primer) seperti contoh berikut :

Tabel 3.9 Tabulasi data hasil penelitian pengaruh rebusan daun sirsak terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

	Konsentrasi rebusan daun sirsak										
	100%	90%	80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%	10%	Total
Σ Tumbuh											
Σ Tidak Tumbuh											
Total											

3.9 Metode Analisis Data

Setelah diperoleh hasil dalam bentuk tabel, data dianalisis dengan uji chi-square dengan kesalahan atau $\alpha=5\%$