

BAB 3

METODE PENELITIAN

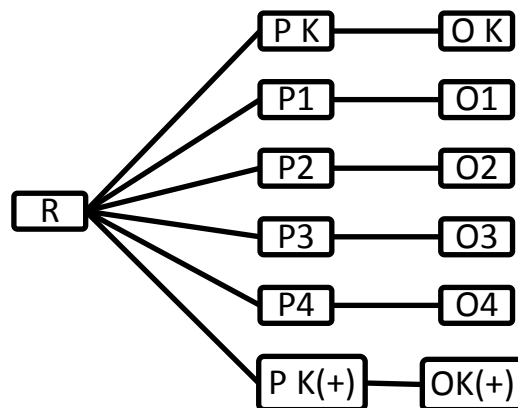
3.1 Jenis Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah eksperimental bersifat analitik laboratorik (Notoadmojo, 2012). Penelitian ini bertujuan untuk mengukur efektivitas perasan bunga kupu – kupu (*Bauhinia purpurea*) yang dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

3.1.1 Desain Penelitian

Dalam penelitian ini, desain penelitian yang digunakan adalah Desain Eksperimental secara *Posttest design group with control* secara *in vitro*, yaitu dengan menempatkan sasaran atau obyek pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan . Pengamatan dilakukan setelah ada perlakuan

Desain penelitian sebagai berikut:



Gambar 3.1 Desain Penelitian (Notoadmojo, 2012)

Keterangan :

- R : Random
- PK : Perlakuan yang tidak diberi perasan bunga kupu-kupu (0%)
- P1 : Perlakuan perasan bunga kupu-kupu konsentrasi 25%
- P2 : Perlakuan perasan bunga kupu-kupu konsentrasi 50%
- P3 : Perlakuan perasan bunga kupu-kupu konsentrasi 75%
- P4 : Perlakuan perasan bunga kupu-kupu konsentrasi 100%
- PK (+) : Pemberian kontrol positif larutan tetrasiklin
- OK : Observasi setelah perlakuan Kosentrasi 0% (kontrol negatif)
- O1 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 25%
- O2 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 50%
- O3 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 75%
- O4 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 100%
- OK (+) : Observasi setelah pemberian kontrol positif larutan tetrasiklin

3.2 Populasi, Sampel dan Sampling Penelitian

3.2.1. Populasi Penelitian

Dalam penelitian ini, populasi yang diambil adalah Isolat murni *Staphlococcus aureus* ATCC 25923 yang dibeli dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Kota Surabaya.

3.2.2. Sampel Penelitian

Sampel untuk penelitian adalah 150×10^3 CFU *Staphylococcus aureus* yang didapatkan dari hasil membandingkan kekeruhan suspensi kuman dengan standar Mc. Farland 0,5.

Besar replikasi atau pengulangan dalam penelitian ini adalah 5 yang ditentukan dengan rumus berikut (Notoadmojo, 2012) :

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

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

$$(n-1) 5 \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 15 + 5$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20 : 5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

n : Jumlah ulangan (*replikasi*)

k : Jumlah kelompok

Jadi jumlah replikasi yang dilakukan peneliti ≥ 4 kali setiap kelompok perlakuan. Peneliti bermaksud untuk menghindari terjadinya kesalahan saat pengujian menambah satu stok replikasi sehingga total replikasi yang peneliti lakukan adalah sebanyak 5 kali replikasi.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Lokasi pengujian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan (FIK) Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada awal bulan Desember 2016 sampai dengan Juli 2017, sedangkan untuk pemeriksaan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analis Kesehatan UMSurabaya selama 1 (satu) minggu .

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

3.4.1 Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas : Konsentrasi perasan Bunga Kupu-kupu (*Bauhinia purpurea*)
2. Variabel Terikat : Zona hambat pertumbuhan kuman *Staphylococcus aureus*
3. Variabel Kontrol : Standar Mc Farland, Suhu inkubator, lama inkubasi, sterilisasi (*autoclave*), volume bahan uji (μ l).

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Konseptual	Definisi Operasional		
		Parameter	Skor	Skala
Independen (Bebas) : Kosentrasi perasan bunga kupu-kupu (<i>Bauhinia purpurea</i>)	1. Perasan Bunga Kupu-kupu (<i>Bauhinia purpurea</i>) merupakan hasil dari proses penghancuran mekanik simplisia tanpa penambahan aquades steril kemudian diperas dan disaring dengan kasa steril. 2. Konsentrasi perasan bunga kupu-kupu (<i>Bauhinia purpurea</i>) adalah tingkatan kepekatan perasan yang digunakan dalam penelitian ini dibagi dalam 5 kelompok kosentrasi : 0%, 25%, 50%, 75%, dan 100%.	1. Kondisi bunga yang segar 2. Tahapan pembuatan kosentrasi bertingkat dari perasan bunga kupu-kupu.	1. 100% 2. 75% 3. 50% 4. 25% 5. 0%	Ordinal
Dependen (terikat) : Zona Hambat pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i>	1. Zona hambat adalah daerah dimana terhambatnya pertumbuhan bakteri pada media agar oleh senyawa antibiotik ditandai dengan zona bening yang diukur dengan	1. Diameter zona hambat	Dalam satuan millimeter (mm)	Interval

	penggaris dengan satuan millimeter (mm)			
Kontrol : 1. Standar Mc Farland 2. Suhu inkubator 3. Lama inkubasi, 4. Sterilitas 5. Volume Bahan uji (μ l).	1. Standar Mc. Farland adalah larutan standar pembanding kekeruhan suspense kuman 2. Suhu Inkubator adalah suhu optimum yang diperlukan untuk proses pertumbuhan kuman. 3. Lama Inkubasi adalah Waktu yang diperlukan untuk pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i> 4. Sterilitas adalah keadaan alat dan tempat pengujian yang bebas dari kontaminasi bakteri lain 5. Volume Bahan uji adalah Jumlah perasan yang diberikan pada tiap kosentrasi	1. Kekeruhan 2. Panel indikator alat 3. Jam 4. Kontaminasi 5. volime sampel	1. - 2. 37 ° C 3. 24 jam 4. Kontam/tidak kontam 5. 50 μ L	1. nominal 2. Interval 3. Interval 4. Nominal 5. Interval

3.5 Pembuatan Perasan Bunga Kupu-kupu (*Bauhinia purpurea*)

3.5.1 Alat- alat

1. Beaker glass 250 ml,
2. Gelas ukur 100 ml,
3. Corong,
4. Blender,
5. Kasa,
6. Kertas saring,
7. Pisau dan,
8. Neraca ohaus.

3.5.2 Bahan Uji

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah bunga kupu-kupu (*Bauhinia purpurea*).

3.5.3 Prosedur Pembuatan Perasan Bunga Kupu – kupu (*Bauhinia purpurea*)

Teknik pembuatan perasan bunga kupu-kupu yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Bunga kupu-kupu dipilih yang segar yang berwarna merah muda.
2. Bunga kupu-kupu dicuci hingga bersih, dan potong kecil-kecil
3. Untuk pembuatan Konsentrasi 100 % :

bunga kupu – kupu ditimbang sebanyak 100 gram kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender, bunga kupu – kupu yang sudah dihaluskan tadi diperas dengan kasa lapis lima sehingga perasan yang terpisah dari ampasnya kemudian lakukan penyaringan ulang.

4. Kemudian pengenceran dengan cara :

Tabel 3.2 Pembuatan Larutan Konsentrasi Perasan Bunga Kupu-kupu (*Bauhinia purpurea*)

Konsentrasi	larutan Pz Steril	Perasan Bunga Kupu-kupu (<i>Bauhinia purpurea</i>)
100 %	-	1 ml
75 %	0,25 ml	0,75 ml
50 %	0,5 ml	0,5 ml
25 %	0,75 ml	0,25 ml
0 %	1 ml	-

Keterangan :

- 1 Konsentrasi 100% : Tabung 1 di isi 1 ml perasan awal, itu sebagai konsentrasi 100%
- 2 Konsentrasi 75% : Pada tabung 2 diisi 0.25 ml Larutan Pz steril ditambahkan perasan bunga kupu-kupu (*Bauhinia purpurea*) konsentrasi 100% sebanyak 0.75 ml, dihomogenkan
- 3 Konsentarsi 50% : Pada tabung 3 diisi 0.5 ml Larutan Pz steril ditambahkan perasan bunga kupu-kupu (*Bauhinia purpurea*) konsentrasi 100% sebanyak 0.5 ml, dihomogenkan
- 4 Konsentrasi 25% : Pada tabung 4 diisi 0.75 ml Larutan Pz steril ditambahkan perasan bunga kupu-kupu (*Bauhinia purpurea*) konsentrasi 100% sebanyak 0.25 ml, dihomogenkan
- 5 Konsentrasi 0% : Pada tabung 5 diisi 1 ml Larutan Pz steril tanpa diberi tambahan perasan bunga kupu-kupu (*Bauhinia purpurea*).

3.6 Pembuatan Larutan Kontrol Positif Tetrasiklin 500 μ g/mL

3.6.1 Alat

Alat – alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Timbangan *Triplle beam balance*
2. Pertidish
3. Mortal
4. Pipet pastur
5. Labu ukur 100 ml

3.6.2 Bahan

1. Antibiotik Tetrasiklin HCl 500 mg
2. Aquades steril

3.6.3 Prosedur Pembuatan Larutan Kontrol Positif Tetrasiklin HCl

1. Tablet tetrasiklin HCl digerus dengan mortal hingga menjadi halus
2. Hasil gerusan ditimbang sebanyak 50 mg dengan neraca analitik
3. Dilarutkan dengan aquades steril dan encerkan hingga 100 mL dengan labu ukur 100 mL.

3.6.4 Standar Diameter Zona Resistensi Kontrol Positif Tentrasiklin (CLSI, 2014)

Tabel 3.3 Standar Diameter Zona Resistensi Kontrol Positif

Diameter zona tiap kategori		
Resistensi (mm)	Intermediet (mm)	Sensitif (mm)
≤ 14	15 - 18	≥ 19

3.7 Pembuatan Media untuk Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*

3.7.1 Alat

Alat – alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

Cawan Petri, Timbangan *Triplle beam balance*, Pertidish, Pipet pastur, Autoklaf, Alat pemanas, Penangas air (*water bath*), Gelas ukur 250 ml, Tabung reaksi, Rak tabung, Pengaduk, Api spirtus, kaki tiga, Filler, Erlenmeyer, Pipet ukur, dan Swab steril.

3.7.2 Bahan

1. Media MH (*Mueller Hinton*)
2. Media NA (*Nutrient Agar*)
3. Aquades
4. Pz Steril

3.7.3 Prosedur Sterilisasi Alat

Menurut Hendriati (2013) prosedur sterilisasi menggunakan autoklaf adalah sebagai berikut :

1. Tangki autoklaf diisi air sampai batas dibawah angsang
2. Semua alat atau bahan yang akan disterilisasi dimasukkan kedalam angsang.
3. Tutup autoklaf dengan rapat dan kencangkan baut – baut autoklaf agar tidak ada uap yang keluar dari bibir autoklaf.
4. Autoklaf dipanaskan baik dengan elektrik ataupun kompor gas sesuai dengan jenis autoklafnya.

5. Menunggu sampai air mendidih dan uap memenuhi kompartemen autoklaf dan tersedak keluar dari klep pengaman. Selanjutnya klep pengaman ditutup.
6. Setelah 2 atm dan suhu 121°C tercapai, proses sterilisasi dimulai, pasang timer dan hitung mundur 15 menit.
7. Setelah timer berbunyi, tunggu sampai tekanan dalam autoklaf sama dengan tekanan lingkungan ditunjukkan dengan jarum penunjuk di angka nol. Klep – klep autoklaf di buka dan isi autoklaf dikluarkan.

3.7.4 Prosedur Pembuatan Suspensi Kuman

1. Pembuatan Larutan Standar Mc. Farland 0,5 :

- 1) Dua buah tabung steril disiapkan, tabung 1 untuk standar Mc Farland 0,5 dan tabung 2 untuk suspensi kuman.
- 2) Dibuat perbandingan antara BaCl 1% : H₂SO₄ 1 % sebesar 0,5 : 9,5 ml
- 3) Dipipet 0,05 ml BaCl 1 % + 0,95 ml H₂SO₄ 1 %
- 4) Standar Mc Farland dihomogenkan dengan cara di vorteks, Mc Farland 0,5 setara dengan 150 juta kuman.

2. Prosedur membuat suspensi kuman, yaitu:

- 1) Tabung steril diisi dengan larutan Pz ± 5 ml.
- 2) *Staphylococcus aureus* dari biakan murni, diambil dengan lidi kapas steril

- 3) lidi kapas steril yang sudah ada kumannya dicelupkan pada tabung yang berisi larutan Pz .
- 4) kekeruhan suspensi kuman dibandingkan dengan standar Mc Farland 0,5
- 5) Apabila kurang keruh, maka tambahkan kuman dengan lidi kapas dan apabila terlalu keruh tambahkan larutan Pz hingga kekeruhannya sama dengan standar Mc Farland 0,5 (Sutton, 2011).

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

1. Alat dan bahan disiapkan
2. Nutrien agar ditimbang sesuai dengan perhitungan :

$$\text{NA } 20 \text{ gram/ liter, membuat NA sebanyak 5 plate @ 16 ml}$$

$$\text{gram NA} = (20 \text{ gram} \times 80 \text{ ml}) / 1000 \text{ ml} = 1,6 \text{ gram.}$$
3. Diukur volume aquades sebanyak 80 ml menggunakan gelas ukur
4. Bahan yang sudah ditimbang dilarutkan dengan aquades yang sudah diukur volumenya dalam erlenmeyer
5. larutan dipanaskan diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih
6. larutan yang sudah dipanaskan diangkat dan mdinginkan dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai kondisi suam – suam
7. pH Nutrien agar adalah 7.4, jika terlalu asam menambakkannya dengan NaOH 0.1 N, sedangkan jika terlalu basa menambakkannya dengan HCl 0.1 N sampai pH nya 7.4

8. erlenmeyer ditutup dengan kapas berlemak dan disteril dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit
9. Setelah turun dari autoklaf, Media dituang ke dalam plate yang steril sampai rata
10. Diamkan sampai terlihat padat dan menyimpannya ke lemari es.

3.7.6 Prosedur Pembuatan Media Mueller Hinton Agar (MHA)

1. Alat dan bahan yang dibutuhkan disiapkan
2. gram media MH yang dibutuhkan dihitung dengan rumus :
MH 34 gram/liter, membuat MH sebanyak 5 plate @ 20 ml
$$\text{gram MHA} = \frac{34 \text{ gr} \times 100 \text{ ml}}{1000} = 3,4 \text{ gr}$$
3. Serbuk media MH ditimbang sebanyak 3,4 gram
4. Aquades yang di butuhkan yaitu sebanyak 100 ml dan diukur dengan gelas ukur
5. Bahan yang sudah ditimbang tadi dilarutkan dengan aquades yang sudah diukur volumenya ke dalam erlenmeyer
6. Media dipanaskan diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih
7. Media yang sudah larut sempurna diangkat dan didinginkan dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai kondisi suam – suam.
8. pH nya disesuaikan dengan penambahan NaOH 0.1 N jika terlalu asam dan penambahan HCl 0.1 N jika terlalu basa sampai pH nya 7.2

9. Media di erlenmeyer ditutup dengan kapas berlemak dan koran serta mengikatnya
10. Medium dan alat – alat yang dibutuhkan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit
11. Setelah turun dari autoklaf, Media dituang pada plate yang telah disteril dengan volume media 15 – 20 ml ke dalam plat, setelah dingin dan memadat disimpan di lemari es.

3.8 Prosedur Pemeriksaan Sampel

3.8.1 Hari Pertama Pemeriksaan :

- 1 Alat dan bahan disiapkan.
- 2 Sterilitas dalam melaksanakan pengujian di pertahankan dengan menyalakan api spirtus.
- 3 Suspensi Kuman dibuat dengan mengikuti prosedur dengan dibandingkan kekeruhannya dengan larutan standar Mc Farland 0,5
- 4 Suspensi kuman diinoklasikan ke media Mueller Hinton Agar (MHA) dengan tehnik *Street plate* dengan swab steril
- 5 Ring yang sudah disteril, ditempatkan pada permukaan media MHA dengan jarak ring satu sama lain ± 25 mm.
- 6 Perasan bunga kupu – kupu dipipet sesuai konsentrasinya sebanyak 50 μ l beserta pengulangannya.
- 7 Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan posisi tidak dibalik.

3.8.2 Hari Kedua :

- 1 Ring yang menempel pada permukaan media Mueller Hinton Agar (MHA) diambil.
- 2 Zona hambat yang terbentuk ditiap kosentrasi diukur dengan menggunakan jangka sorong / atau penggaris.
- 3 Mencatat hasil yang diamati sebagai data

3.9 Tabulasi Data

Data yang diperoleh ditabulasikan sebagai berikut :

Tabel 3.4 Contoh tabulasi data hasil pengukuran zona hambat (dalam satuan mm)

No	R	Diameter zona hambat (mm)					
		0%	25%	50%	75%	100%	K+
1.	R1						
2.	R2						
3.	R3						
4	R4						
5	R5						
Jumlah							
Rata - rata							

Keterangan :

R : Pengulangan / Replikasi

K(+) : Kontrol positif

3.10 Metode Analisis Data

Data yang diperoleh diuji Normalitas dan Homogenitasnya dan di analisis menggunakan uji Anova dengan tingkat kesalahan 5% (0,05) serta dilanjutkan dngan uji Tukey HSD dengan program pengolah data SPSS versi 21.