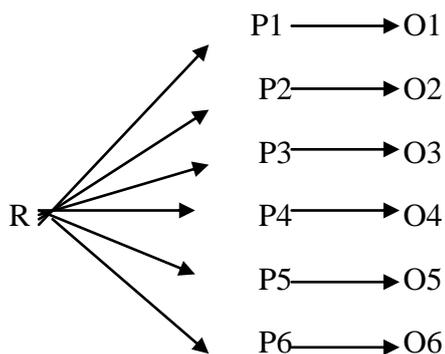


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah termasuk jenis penelitian eksperimental laboratorium yang bertujuan untuk mengetahui efektifitas perasan daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Dengan rancangan penelitian sebagai berikut :



Keterangan :

R : Random

P1 : Perlakuan dengan pemberian perasan daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) dengan konsentrasi 100%

P2 : Perlakuan dengan pemberian perasan daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) dengan konsentrasi 95%

- P3 : Perlakuan dengan pemberian perasan daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) dengan konsentrasi 90%
- P4 : Perlakuan dengan pemberian perasan daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) dengan konsentrasi 85%
- P5 : Perlakuan dengan pemberian perasan daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) dengan konsentrasi 80%
- P6 : Perlakuan dengan pemberian perasan daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) dengan konsentrasi 75%
- O1 : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* setelah pemberian perasan daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) konsentrasi 100%
- O2 : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* setelah pemberian perasan daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) konsentrasi 95%
- O3 : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* setelah pemberian perasan daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) konsentrasi 90%
- O4 : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* setelah pemberian perasan daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) konsentrasi 85%
- O5 : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* setelah pemberian perasan daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) konsentrasi 80%
- O6 : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* setelah pemberian perasan daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) konsentrasi 75%

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah biakan murni *Staphylococcus aureus* di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya Propinsi Jawa Timur .

3.2.2 Sampel Penelitian

Dalam penelitian ini dilakukan setiap perlakuan masing-masing sebanyak 6 perlakuan dan 4 kali pengulangan didasarkan dari rumus

$(n-1)(K-1) \geq 15$, maka akan diperoleh jumlah sebagai berikut :

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 15+5$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4 \text{ (Federer, 2010)}$$

Jadi jumlah replikasi sebanyak 4 kali setiap kelompok.

Keterangan :

n = jumlah pengulangan

K = jumlah kelompok

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Pengambilan sampel penelitian yaitu daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) di desa mantup, Lamongan. Dan penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi D3 Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya Jalan Sutorejo 59 Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Desember sampai dengan Juni 2018, sedangkan waktu pemeriksaan dilakukan pada bulan Juni 2018.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut :

- Variabel bebas : Perasan daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*)
- Variabel terikat : Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.
- Variabel kontrol : Suhu, waktu inkubasi, konsentrasi sampel, jumlah suspensi kuman dan metode pemeriksaan.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

Definisi Operasional Variabel dalam penelitian ini sebagai berikut :

1. Perasan adalah suatu cara yang digunakan untuk mengeluarkan zat aktif yang terdapat di dalam sel bahan alami, baik secara manual maupun

mekanik. Perasan daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) di peras dengan cara di tumbuk dan di saring menggunakan kasa steril. Konsentrasi tanaman daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) dikategorikan menjadi beberapa konsentrasi, yaitu : 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%.

2. Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ditetapkan berdasarkan kekeruhan atau kejernihan air perasan daun bahagia. Pertumbuhan dikategorikan positif (+) jika terjadi pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, negatif (-) jika tidak terjadi pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Untuk melihat ada tidaknya pertumbuhan kuman perlu dilakukan pemeriksaan yaitu dengan cara menanam pada media MSA (*Manitol Salt Agar*) dan menghitung jumlah koloni yang tumbuh setelah inkubasi 24 jam suhu 37° C.
3. Lama inkubasi dalam penelitian ini yaitu selama 1x24 jam
4. Suhu dalam penelitian ini yaitu dengan suhu 37° C
5. Jumlah suspensi kuman dalam penelitian ini menggunakan standart Mc Farland 0,5

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 dilusi. Langkah – langkah pemeriksaan diatarannya sebagai berikut :

3.5.1 Prinsip Pemeriksaan

Senyawa antibakteri diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi, kemudian masing-masing konsentrasi ditambahkan suspensi bakteri uji dalam media cair. Perlakuan tersebut akan di inkubasi dan diamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan terjadinya kekeruhan. Larutan uji senyawa antibakteri pada konsentrasi terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan bakteri uji ditetapkan sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM) atau MIC (*Minimum inhibitory concentration*) (Pratiwi, 2008). Karena perasan daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) merupakan larutan yang berwarna maka kekeruhan dalam tabung yang seharusnya menunjukkan adanya pertumbuhan kuman sepertinya sulit untuk dilihat secara visual. Untuk meyakinkan ada tidaknya pertumbuhan kuman perlu dilakukan pemeriksaan lebih lanjut yaitu dengan cara menanam pada media MSA (*Manitol Salt Agar*).

3.5.2 Persiapan Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : timbangan, gelas arloji, tabung reaksi, gelas ukur, pengaduk, rak tabung, pipet pasteur, api spirtus, kaki tiga, blender, filler, Erlenmeyer, ose, autoclave, plate, pipet ukur, tabung, centrifuge, mortar, spatula, kertas pH, lidi kapas.

Sedangkan bahan yang digunakan meliputi perasan daun bahagia dengan berbagai konsentrasi 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, suspensi kuman *Staphylococcus aureus*, aquadest steril, media Nutrient Agar (NA), media manitol salt agar (MSA), dan PZ steril

Reagen yang digunakan adalah sebagai berikut : NaOH 0,1 N dan HCL 0,1 N.

3.5.3 Prosedur Pemeriksaan

A. Pembuatan Suspensi Kuman

Pembuatan suspensi kuman sesuai dengan metode Mc Farland 0,5 sebagai berikut:

1. Menyiapkan 2 tabung steril, 1 untuk suspensi dan yang 1 untuk standart Mc Farland 0,5.
2. Prosedur membuat standart Mc Farland 0,5 , yaitu :
 - a. Membuat perbandingan antara BaCl 1% : H₂SO₄.
 - b. Memipet 0,05 ml BaCl 1 % + 9,95 ml H₂SO₄.
 - c. Menghomogenkan dengan cara mengocok pelan tabung.
 - d. Standart Mc Farland 0,5 ini sama dengan tiap 1 ml nya mengandung 150 juta kuman (Soemarno, 2005).
3. Prosedur membuat suspensi kuman, yaitu :
 - a. Mengisi tabung steril dengan PZ ± 5 ml
 - b. Mengambil kuman dari biakan *S.aureus* murni yang mudah ditanam di media NAS dengan lidi kapas steril.
 - c. Menyelupkan lidi kapas steril yang sudah ada kumannya pada tabung yang berisi PZ
 - d. Membandingkan warna suspensi kuman dengan Mc Farland 0,5
 - e. Apabila warna kurang keruh, maka tambahkan kuman dengan lidi kapas steril dan apabila terlalu keruh tambahkan PZ hingga kekeruhannya sama dengan standart Mc Farland 0,5.
4. Menstandarkan ose yang akan dipakai dalam penelitian (Tera Ose) :

- a. Menyiapkan tabung steril, pipet 0.1 ml, ose bulat, dan filler.
- b. Memipet aquadest 0.1 ml, kemudian menunggunya ke dalam tabung.
- c. Menyalakan api spiritus
- d. Mengambil 1 mata ose aquadest yang sudah dituang ke dalam tuang, kemudian memijarkan ose tersebut di atas api spiritus. Lakukan berulang-ulang sampai air dalam tabung habis.
- e. Didapatkan 20 mata ose dari aquadest tersebut habis.

$$\frac{0.1ml}{20} = \frac{1}{200}/ml$$

Jumlah kuman setiap 1 mata ose :

$$= \frac{150.000.000}{200}$$

= 750.000 kuman (bila suspensi kuman per mililiternya 150 juta kuman)

Jumlah kuman setiap 1 mata ose :

$$= \frac{750.000}{200}$$

= 3750 kuman (bila suspensi kuman per mililiternya 1 juta kuman)

B . Prosedur Pembuatan Media *Nutrient Agar Slant* (NAS)

Alat yang digunakan adalah neraca analitik, pengaduk, pipet pasteur, pipet ukur filler, Erlenmeyer, gelas ukur, beaker glass, gelas arloji, plate, autoclave.

Prosedur pembuatan sebagai berikut :

1. Melakukan perhitungan media *Nutrient Agar Plate* (NAS)
2. Membuat NAS 3 tabung, @tabung ± 6 ml
 Komposisi NA 20 gr per 1liter $\rightarrow 20 \text{ gr}/100 \times 18 \text{ ml} = 0,36 \sim 1 \text{ gr}$
3. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
4. Menimbang bahan (media NA) sesuai dengan perhitungan menggunakan timbangan neraca analitik
5. Memasukkan sampel NA ke beaker glass kemudian ditambahkan dengan aquadest
6. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest yang sudah diukur volumenya dalam beaker glass
7. Memanaskan larutan diatas api spiritus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih
8. Mengangkat larutan yang sudah larut sempurna dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam-suam
9. Mengukur pH larutan, jika terlalu asam menambahkannya dengan NaOH 0,1 N, sedangkan jika terlalu basa menambahkannya dengan HCl 0,1 N sampai pH nya 7,4
10. Menutup erlenmeyer dengan kapas berlemak dan mesterilkannya pada autoclave dengan suhu 121° atm selama 15 menit
11. Setelah turun di autoclave , menuangkannya didalam plate yang steril

12. Mendinginkannya sampai terlihat padat dan menyimpannya di lemari es.

(Sumarsono, 1996)

C. Prosedur Pembuatan Manitol Salt Agar (MSA)

Alat yang digunakan adalah neraca analitik, pengaduk, pipet pasteur, pipet ukur filler, erlenmeyer, gelas ukur, gelas arloji, plate, autoclave. Prosedur pembuatan sebagai berikut :

1. Melakukan perhitungan media MSA yang dibutuhkan :

Membuat MSA (24 plate, @ ± 17 ml → 408 ml)

Komposisi MSA 108 gr per 1 liter → $\frac{108 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}} \times 408 \text{ ml} = 44,06 \text{ gr}$

2. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan

3. Melakukan penimbangan bahan sesuai dengan yang di perlukan yaitu 44,06 gr menggunakan timbangan.

4. Mengukur volume aquadest yang dibutuhkan yaitu sebanyak 408 ml menggunakan gelas ukur

5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang tadi dengan aquadest yang sudah diukur volumenya ke dalam erlenmeyer

6. Memanaskannya diatas api spiritus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih

7. Mengangkat larutan yang sudah larut sempurna dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan di baskom sampai suam-suam kuku

8. Mengukur ph yaitu 7.2-7.4 , jika pH terlalu asa, tambahkan NaOH 0,1 N jika terlalu basa tambahkan HCl 0,1 N sampai pH yang telah ditentukan

9. Menutup larutan yang ada di erlenmeyer dengan kapas berlemak dan bungkus dengan koran serta mengikatnya dengan benang wol
10. Melakukan sterilisasi di autoclave pada suhu 121° atm
11. Setelah turun autoclave, menuangkannya ke dalam plate steril sampai rata ± 17 ml secara steril dan dekat api
12. Mendinginkannya sampai terlihat padat dan menyimpannya ke lemari es
(Dewi. P, 2010)

E. Prosedur Pembuatan Konsentrasi Daun Bahagia

Alat yang akan digunakan adalah timbangan (neraca analitik), erlemeyer, mortar, tabung sentrifuge, sentrifuge, rak tabung, corong, filler, pipet ukur, dan tabung reaksi. Prosedur sebagai berikut :

1. Memilih tanaman daun bahagia yang masih segar dan mencabutnya sampai akar.
2. Mencuci tanaman daun bahagia sampai bersih dan terakhir dicuci dengan aquadest steril.
3. Menimbang tanaman daun bahagia sebanyak 100gr pada neraca beam balance.
4. Tumbuk tanaman daun bahagia dengan menggunakan mortar yang sebelumnya sudah disteril dengan menggunakan alkohol 70%
5. Peras tumbukan daun bahagia, lalu saring dengan menggunakan kertas saring steril. Tampung pada erlenmeyer

6. Menyentrifus kembali filtrat dengan menggunakan tabung sentrifus yang steril sehingga didapatkan filtrat yang benar-benar jernih
7. Mengambil 1 mata ose perasan yang sudah jernih secara steril, kemudian menanamnya ke media NAP, dengan cara menggoreskannya di permukaan media.
8. Inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°
9. Mengamati hasilnya, jika tidak terjadi pertumbuhan kuman berarti perasan daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) tadi sudah benar-benar steril. Namun jika pada media NAP terdapat pertumbuhan kuman berarti perlu dilakukan proses tindalisasi, yaitu :
 - a. Memanaskan filtrat tanaman daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) dengan waterbath pada suhu 90°C selama 15 menit
 - b. Kemudian meletakkannya pada inkubator selama 24 jam dengan suhu 37° C
 - c. Menanam kembali filtrat tanaman daun bahagia yang sudah melalui proses tindalisasi di media NAP dan menginkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C
12. Membuat konsesentrasi 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, yaitu :

Konsentrasi 100% : pada tabung 1 diisi filtrat tanaman daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) sebanyak 1 ml

Konsentrasi 95% : pada tabung 2 diisi filtrat tanaman daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) sebanyak 0,95 ml dan PZ sebanyak 0,05 ml

Konsentrasi 90% : pada tabung 3 diisi filtrat tanaman daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) sebanyak 0,9 ml dan PZ sebanyak 0,1 ml

Konsentrasi 85% : pada tabung 4 diisi filtrat tanaman daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) sebanyak 0,85 ml dan PZ sebanyak 0,15 ml

Konsentrasi 80% : pada tabung 5 diisi filtrat tanaman daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) sebanyak 0,8 ml dan PZ sebanyak 0,2 ml

Konsentrasi 75% : pada tabung 6 diisi filtrat tanaman daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) sebanyak 0,75 ml dan PZ sebanyak 0,25 ml

3.5.4 Prosedur Pemeriksaan Sampel

Alat yang digunakan adalah tabung reaksi kecil, rak tabung, pipet ukur, api spiritus, kaki tiga, filler, ose bulat, dan autoclave.

Prosedur :

Hari pertama :

1. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
2. Menyalakan api spiritus dengan korek api
3. Dilabeli masing-masing tabung sesuai dengan konsentrasinya, yaitu konsentrasi 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%

4. Dipanaskan ose bulat diatas nyala api spirtus, mengambil suspensi kuman *Staphylococcus aureus* sebanyak 1 mata ose dan membiakkannya di tabung berlabel 100% dengan cara menggesekkannya ose dinding permukaan media cair sebanyak 3 kali. Kemudian mengambil lagi 1 mata ose kuman *Staphylococcus aureus* pada suspensi kuman dan membiakkannya pada tabung berlabel 95%, begitu seterusnya sampai pada tabung berlabel 75%. Semua perlakuan dilakukan secara steril dekat dengan api.

5. ditutup kembali tabung dengan kapas berlemak.

6. inkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam.

Hari kedua :

1. Diamati masing-masing tabung, apakah terjadi kekeruhan atau tidak.
2. Diambil konsentrasi terkecil yang mula terlihat keruh, dan menguji kembali ke media padat (MSA) dengan tujuan memastikan apakah kuman tersebut *Staphylococcus aureus*.
3. Dipanaskan ose bulat diatas nyala api spirtus, mengambil 1 mata ose kuman yang ada pada konsentrasi terkecil tadi.
4. Ditanam di media padat dengan cara menggoreskannya dipermukaan media.
5. Inkubasi kembali pada suhu 37° C selama 24 jam.

Hari Ketiga

1. Diamati hasilnya pada media padat apakah terbentuk koloni yang mengidentifikasi kuman tersebut adalah *Staphylococcus aureus*.
2. Dicatat konsentrasi terkecil tadi sebagai daya hambat pertumbuhan kuman
3. Dicatat hasil yang diamati sebagai data.

3.6 Pengumpulan dan Analisis Data

3.6.1 Metode pengumpulan data

Untuk memperoleh data dan informasi yang mempunyai kualitas dan validitas yang cukup tinggi, maka penelitian dilakukan dengan eksperimen laboratorium yang kemudian hasil ditabulasikan.

Tabel 3.2 Tabulasi Data

No	Kode sampel	Jumlah Koloni Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> pada Perasan Daun Bahagia (<i>Dieffenbachia bowmanii</i>)					
		75%	80%	85%	90%	95%	100%
1	A						
2	B						
3	C						
4	D						
Jumlah							

3.7 Metode Analisis Data

Setelah diperoleh hasil dalam bentuk tabel, data kemudian dianalisis dengan uji ANOVA untuk mengetahui pengaruh air perasan daun bahagia (*Dieffenbachia bowmanii*) dengan tingkat kesalahan 5% (α 0,05).