

BAB 3
METODE PENELITIAN

3.1 Design Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan rancangan penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian seduhan simpilisia daun kemuning (*Murraya paniculata*)

Desain dan rancangan penelitian *PosttestOnly Control Group Desing* adalah sebagai berikut:

Random	Perlakuan	Post test
Kelompok P (0)	-	O (0)
Kelompok P (1)	X	O (1)
Kelompok P (2)	X	O (2)

Tabel 3.1 Rancangan Penelitian (Notoatmojo, 2010)

Keterangan :

P(0) : perlakuan tanpa diberi seduhan simpilisia daun kemuning (kontrol).

P(1) : perlakuan dengan pemberian seduhan simpilisia daun kemuning
konsentrasi 100%

P(2) : perlakuan dengan pemberian seduhan simpilisia daun kemuning
konsentrasi 50%

O(0) : hasil observasi pertumbuhan kuman tanpa adanya perlakuan

O(1) : hasil observasi setelah pemberian seduhan simpilisia daun kemuning
konsentrasi 100%

O(2) : hasil observasi setelah pemberian seduhan simpilisia daun kemuning konsentrasi 50%

3.2 Populasi Sampel Dan Sampling

3.2.1 Populasi Penelitian

Dalam penelitian ini, populasi yang diambil adalah dari biakan murni *Salmonella typhi* yang dibeli di UNAIR kampus A.

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini diambil secara acak atau random dengan cara membuat suspensi biakan murni bakteri *Salmonella typhi* disamakan dengan standar Mac Farland 0,5 yang setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (Pramita, 2009), dengan jumlah replikasi 9 yang ditentukan dengan rumus berikut :

$$(R-1) (T-1) > 15$$

$$(R-1) (3-1) > 15$$

$$(R-1) (2) > 15$$

$$2R - 2 > 15$$

$$2R > 15 + 2$$

$$2R > 17$$

$$R > 17/2$$

$$R > 9 \text{ (Hidayat, 2010)}$$

Keterangan :

R : Replikasi atau Pengulangan

T : Perlakuan

Dari rumus di atas digunakan 9 replikasi setiap kelompok. Penempatan perlakuan dilakukan secara acak dengan menggunakan 9 petridish sebagai wadah media pertumbuhan. Setiap petridish berisi 3 perlakuan. Setiap petridish berisi 0,2 ml suspensi bakteri yang setara dengan standar Mac Farland $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Jadi keseluruhan jumlah koloni yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak $9 \times 0,2 \times 1,5 \times 10^8 = 2,7 \times 10^8$ atau 270.000.000 koloni.

3.3 Lokasi dan waktu penelitian

3.3.1 Lokasi penelitian

Lokasi penelitian sampel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya Jl Sutorejo 59 Surabaya.

3.3.2 Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2016 sampai dengan Juni 2017. Sedangkan waktu pemeriksaan sampel dilakukan pada bulan Juni 2017.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

3.4.1 Variabel penelitian

1. Variabel Bebas : konsentrasi seduhan simpilisia daun kemuning
2. Variabel Terikat : pertumbuhan *Salmonella typhi*

Variabel Kontrol : suhu inkubator, lama inkubasi, sterilisasi (autoclave dan oven), volume suspensi (ml).

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

Konsentrasi seduhan simpilisia daun kemuningdalam penelitian ini dikategorikan menjadi100%, 50%, dan 0% (kontrol), konsentrasi diencerkan dengan aquadest steril.

Pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* diamati berdasarkan terbentuknya zona bening disekitar disk pada media yang ditanami *Salmonella typhidimana* hasilnya merupakan respon penghambat pertumbuhan. zona hambat merupakan angka yang pengukurannya dilakukan dengan menggunakan jangka dalam satuan millimeter (mm).Suhu yang digunakan untuk inkubasi bakteri 37°C selama 24 jam. Volume suspensi bakteri 0,2 ml.

3.5 Teknik Pengumpulan Data

Data zona hambat diperoleh dari hasil uji Laboratorium yang menggunakan metode difusi cakram kertas (*paper diskdiffusion method*), dengan mengamati area zona jernih di sekeliling cakram kertas.

3.6 Tahap-tahap Uji Laboratorium sebagai berikut ini

1. Sterilisasi pada Oven

- Alat yang digunakan untuk sterilisasi adalah oven
- Bahan yang digunakan untuk sterilisasi adalah koran, kapas
- Prosedur :
 - 1) Beaker glass 250 ml, spatula, pipet ukur 2 ml dan 10 ml, cakram kertas, dan pinset di bungkus menggunakan koran.

Untuk tabung reaksi ditutup dulu menggunakan kapas lalu di bungkus koran.

- 2) Memasukkan alat dan bahan yang sudah di bungkus kedalam oven dengan suhu 140°C selama 3 jam (Razuna, 2010).

2. Pembuatan Media *Mueller Hinton* (MH)

- Alat yang digunakan dalam pembuatan media *Mueller Hinton* (MH) adalah Erlenmeyer 250 ml, neraca analitik, autoclave, hotplate dan petridisk.
- Bahan yang digunakan dalam pembuatan media *Mueller Hinton* (MH) adalah Reagen media *Mueller Hinton* (MH), aquadest, kertas PH, NaOH 0,1 N dan HCL 0,1 N.
- Prosedur :
 - 1) Menimbang 8,16 gram media *Mueller Hinton* (MH)
 - 2) Kemudian dilarutkan dalam 240 ml aquadest
 - 3) Mengaduk sambil dipanaskan sampai media larut dan didinginkan sampai kurang lebih suhu $\pm 25^{\circ}\text{C}$
 - 4) Setelah suhu $\pm 25^{\circ}\text{C}$ dilakukan pengukuran PH sampai PH 7,6
 - 5) Apabila PH terlalu asam maka ditambah NaOH 0,1 N, apabila PH terlalu basa maka ditambah HCL 0,1 N sampai syarat PH tercapai
 - 6) Setelah PH media MH memenuhi syarat, media MH disteril dengan autoclave dengan suhu 121° C selama 15 menit

- 7) Setelah disteril media MH dituang ke petridish yang sudah terlebih dahulu disteril (Maya, 2016).

3. Sterilisasi pada Autoclave

- Alat yang digunakan untuk sterilisasi adalah autoclave
- Bahan yang digunakan untuk sterilisasi adalah koran, kapas
- Prosedur :
 - 1) Memasukkan air secukupnya kedalam bejana.
 - 2) Memasang pemanasnya.
 - 3) Aquadest, media *Mueller Hinton* (MH), dan PZ yang sudah ada dalam Erlenmeyer 250 ml ditutup menggunakan kapas dan koran.
 - 4) Memasukkan bahan yang akan disteril kedalam bejana dan pasang pengunci autoclave.
 - 5) Membuka klep angin sampai udara yang ada di dalam bejana keluar.
 - 6) Menutup klep angin dan pertahankan dalam suhu 121° C selama 15 menit
 - 7) Mematikan pemanas, biarkan suhu turun dan membuka klep angin agar tekanan udara didalam autoclave turun sampai suhu tepat pada 0° C.
 - 8) Membuka autoclave saat suhunya tepat pada 0° C (Maya, 2016).

4. Pembuatan seduhan simpilisia daun kemuning (*Murraya paniculata*(L) Jack)

- Alat yang digunakan dalam prosen pengeringan daun kemuning (*Murraya paniculata*) adalah oven.
- Bahan yang digunakan dalam proses pengeringan daun kemuning (*Murraya paniculata*) adalah daun kemuning (*Murraya paniculata*).
- Prosedur :
 - 1) Mengambil daun kemuning di jalan Sutorejo, Surabaya.
 - 2) Daun kemuning yang sudah dipetik di bersihkan dari kotoran yang menempel dengan air mengalir.
 - 3) Kemudian daun kemuning (*Murraya paniculata*) dihilangkan kadar air dalam tanaman menggunakan oven dengan suhu 60° C selama 24 jam agar reaksi enzimatik dapat dihentikan sehingga tidak mudah rusak.
 - 4) Setelah kering daun kemuning (*Murraya paniculata*) di hancurkan dengan cara di remas sampai terbentuk serbuk kasar (Maya, 2016).

5. Pembuatan konsentrasi seduhan daun kemuning (*Murraya paniculata*(L) Jack)

- Alat yang digunakan dalam Pembuatan konsentrasi seduhan simpilisia daun kemuning (*Murraya paniculata*) adalah neraca analitik, beaker glass 250 ml, dan spatula. Bahan yang digunakan dalam Pembuatan konsentrasi seduhan simpilisia daun kemuning (*Murraya paniculata*) adalah aquadest steril.

- Prosedur :
 - 1) Konsentrasi seduhan simpilisia daun kemuning (*Murraya paniculata*) 0%. Menuang 100 ml aquadest steril tanpa diberi simpilisia daun kemuning (*Murraya paniculata*) kedalam beaker glass 250 ml (1).
 - 2) Konsentrasi seduhan simpilisia daun kemuning (*Murraya paniculata*) 50%. Menimbang 50 gram simpilisia daun kemuning (*Murraya paniculata*) ditambah 100 ml aquadest steril kedalam beaker glass 250 ml (2).
 - 3) Konsentrasi seduhan simpilisia daun kemuning (*Murraya paniculata*) 100%. Menimbang 100 gram simpilisia daun kemuning (*Murraya paniculata*) ditambah 100 ml aquadest steril kedalam beaker glass 250 ml (3) (Maya, 2016).

6. Pembuatan standart Mac Farland 0,5

- Alat yang digunakan dalam pembuatan standart Mac Farland 0,5 adalah pipet ukur 2 ml dan 10 ml, tabung reaksi dan filler.
- Bahan yang digunakan dalam pembuatan standart Mac Farland 0,5 adalah Asam Sulfat (H_2SO_4) 1%, Barium Klorida ($BaCl_2$) 1% dan Aquadest.
- Prosedur :
 - 1) Memipet 0,05 ml Barium Klorida ($BaCl_2$) 1% kedalam tabung reaksi
 - 2) Kemudian menambahkan 9,95 ml asam sulfat (H_2SO_4) 1%

- 3) Mencampur kedua larutan tersebut sehingga didapatkan standart Mac Farland 0,5 maka setara dengan jumlah bakteri $2,7 \times 10^8$ CFU/ml (Maya, 2016).

7. Pembuatan Suspensi Bakteri *Salmonella typhi*

- Alat yang digunakan dalam Pembuatan Bakteri *Salmonella typhi* adalah tabung reaksi, ose bulat dan pipet pasteur.
- Bahan yang digunakan dalam Pembuatan Suspensi Bakteri *Salmonella typhi* adalah koloni biakan murni Bakteri *Salmonella typhi* dan PZ steril.
- Prosedur :
 - 1) Mengisi tabung reaksi dengan 10 ml PZ steril
 - 2) Menambahkan 1 mata ose biakan murni Bakteri *Salmonella typhi*.
 - 3) Bila suspensi bakteri lebih keruh dari standart Mac Farland 0,5 maka ditambah PZ steril.
 - 4) Jika suspensi bakteri kekeruhannya kurang dari standart Mac Farland 0,5 maka ditambah koloni biakan murni Bakteri *Salmonella typhi*.

Sampai kekeruhan suspensi bakteri *Salmonella typhi* setara dengan standart Mac Farland 0,5 (Maya, 2016).

8. Pembuatan difusi cakram kertas seduhan simpilisia daun kemuning (*Murraya paniculata* (L) Jack)

- Alat yang digunakan dalam pembuatan cakram kertas adalah Stampler atau pelubang kertas dengan diameter 6 mm.

- Bahan yang digunakan dalam pembuatan cakram kertas adalah kertas saring whatman dan seduhan simpilisia daun kemuning (*Murraya paniculata*).
- Prosedur :
 - 1) Menyiapkan kertas saring Whatman.
 - 2) Membuat cakram kertas dengan diameter 6 mm menggunakan stamper dengan cara menekan stamper pada kertas saring Whatman.
 - 3) Mensteril cakram kertas yang sudah dibuat kedalam oven dengan suhu 140° C selama 3 jam.
 - 4) Memasukkan cakram kertas kedalam seduhan simpilisia daun kemuning (*Murraya paniculata*) menggunakan pinset steril.
 - 5) Kemudian merendam \pm 2 jam untuk menjenuhkan seduhan simpilisia daun kemuning (*Murraya paniculata*) pada cakram kertas (Maya, 2016).

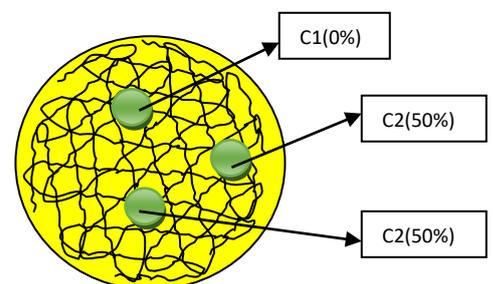
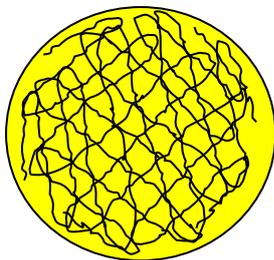
9. Penanaman Bakteri *Salmonella typhi* Media *Mueller Hinton* (MH) dengan cara strik (metode goresan)

- Alat penanaman Bakteri *Salmonella typhi* Media *Mueller Hinton* (MH) adalah api bunsen, filler, cotton swap steril, tabung reaksi steril, dan pipet ukur 2 ml.
- Bahan penanaman Bakteri *Salmonella typhi* media *Mueller Hinton* (MH) adalah Media *Mueller Hinton* (MH) suspensi Bakteri *Salmonella typhi* yang sudah setara dengan standart Mac Farland 0,5

- Prosedur :

- 1) Memipet 0,2 ml suspensi bakteri *Salmonella typhi* yang sudah setara dengan standart Mac Farland 0,5 dan tuang kedalam tabung reaksi steril.
- 2) Ambil catton swap steril lalu celupkan kedalam suspensi kuman yang sudah di pipet di dalam tabung reaksi. Ratakan suspensi bakteri *Salmonella typhi* dengan catton swap steril dengan cara strik (goresan) di permukaan media MH hingga suspensi kuman yang ada di dalam tabung reaksi habis dan rata.
- 3) Meletakkan cakram kertas yang sudah mengandung seduhan simpilisia daun kemuning (*Murraya paniculata*) 0 %, 50 % dan 100 % diatas permukaan media *Mueller Hinton* (MH).
- 4) Semua dilakukan dengan cara yang steril

Kemudian diinkubasi dengan inkubator pada suhu 37° C selama 24 jam (Maya, 2016).



3.1 gambar penanamanstrik bakteri 3.2 gambar peletakkan cakram kertas

10. Pengukuran zona hambat bakteri *Salmonella typhi*

- Alat yang digunakan untuk pengukuran zona hambat bakteri *Salmonella typhi* adalah penggaris dan bolpoin.
- Bahan digunakan media hambat bakteri *Salmonella typhi* yang sudah diberi perlakuan seduhan simpilisia daun kemuning (*Murraya paniculata*) 0%, 50% dan 100%.
- Prosedur :
 - 1) Menyiapkan penggaris dan bolpoin
 - 2) Mengukur diameter zona hambat bakteri *Salmonella typhi* horizontal dan vertikal
 - 3) Menjumlah hasil pengukuran horizontal dan vertikal kemudian dibagi dua sehingga didapat nilai rata-rata dari zona hambat bakteri *Salmonella typhi*.
 - 4) Mencatat hasil pengukuran zona hambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* dan membuat tabulasi (Maya, 2016).

3.7 Tabulasi Data

Data hasil pengamatan ditabulasikan dengan contoh tabel di bawah ini :

Tabel 3.2 Contoh tabulasi data zona hambatseduhan simpilisia daun kemuning (*Murraya paniculata*(L) Jack) terhadap bakteri *Salmonella typhi* secara in vitro

No.	Replikasi	Konsentrasi seduhan		
		P0 (0%)	P1 (50%)	P2 (100%)
1	R1			
2	R2			
3	R3			
4	R4			
5	R5			

6	R6			
7	R7			
8	R8			
9	R9			
Jumlah				
Rata-rata				
SD				

3.8 Metode Analisis Data

Data zona hambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* dianalisis dengan *One-Way ANOVA* untuk membandingkan zona hambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* dengan seduhan simpilisia daun kemuning (*Murraya paniculata*) pada konsentrasi 0%, 50% dan 100% pada tingkat kesalahan 5% ($\alpha=0,05$).