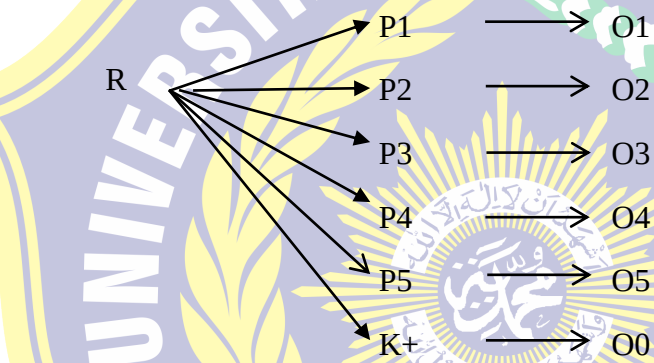


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah Eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui efektivitas dari konsentrasi rebusan daun balakacida (*Chromolaena odorata*) terhadap pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*, dengan menggunakan rancangan dibawah ini



Keterangan

R randomisasi

P1: Perlakuan dengan pemberian rebusan daun balakacida (*Chromolaena odorata*) konsentrasi 100%

P2: Perlakuan dengan pemberian rebusan daun balakacida (*Chromolaena odorata*) konsentrasi 80%

P3 : Perlakuan dengan pemberian rebusan daun balakacida (*Chromolaena odorata*) konsentrasi 60%

P4 : Perlakuan dengan pemberian rebusan daun balakacida (*Chromolaena odorata*) konsentrasi 40%

P5 : Perlakuan dengan pemberian rebusan daun balakacida (*Chromolaena odorata*) konsentrasi 20%

O1 : Observasi pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* pada perlakuan dengan pemberian rebusan daun balakacida (*Chromolaena odorata*) 100%

O2 : Observasi pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* pada perlakuan dengan pemberian rebusan daun balakacida (*Chromolaena odorata*) 80%

O3 : Observasi pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* pada perlakuan dengan pemberian rebusan daun balakacida (*Chromolaena odorata*) 60 %

O4 : Observasi pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* pada perlakuan dengan pemberian rebusan daun balakacida (*Chromolaena odorata*) 40 %

O5 : Observasi pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* pada perlakuan dengan pemberian rebusan daun balakacida (*Chromolaena odorata*) 20 %

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah biakan murni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dari biakan murni Departement Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dari biakan murni yang diambil secara acak yang ditanam di NAS. Dalam penelitian ini terdapat 5 perlakuan. Setiap perlakuan dilakukan masing-masing 5 kali didapatkan dari rumus dibawah ini.

$$(r-1)(t-1) \geq 15$$

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

$$(r-1)(4) \geq 15$$

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 15+4$$

$$19 : 4 = 4,75$$

$$r \geq 4,75 = 5$$

(Sumber : Dikutip dari Subrata, 2003 dalam Istikhomah)

Keterangan :

r: jumlah replikasi(pengulangan)

t: banyak kelompok perlakuan

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analisa Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya, Jl. Suterejo No, 59 Surabaya, Jawa Timur.

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Desember sampai dengan bulan Agustus, sedangkan waktu pemeriksaan dilakukan dibulan Juli 2019.

3.4 Variabel dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah pemberian rebusan daun balakacida (*Chromolaena odorata*)

2. Variabel terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*

3. Variabel kontrol

Suhu, lama inkubasi, volume rebusan 50µl, standart MC Farland 0,5, lubang sumuran ukuran 5.

3.4.2 Defini Operasional Variabel

1. Pemberian rebusan daun balakacida (*Chromolaena odorata*) adalah daun balakacida yang sudah direbus dengan berbagai konsentrasi mulai dari 100%, 80%, 60%, 40% dan 20%
2. Pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* adalah pertumbuhan bakteri pada media yang dilihat dari terbentuknya daerah bening atau transparan (zona hambat) disekitar sumuran yang telah diberi rebusan daun balakacida, kemudian diukur dengan menggunakan penggaris dengan satuan mm (milimeter), pada metode difusi sumuran dimedia MHA (*Mueller Hinton Agar*).

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan adalah data yang diperoleh melalui observasi secara langsung, dengan menggunakan pengujian yang diukur zona kejernihan yang menunjukan adanya pertumbuhan pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*) yang

diberikan perlakuan yaitu dengan konsentrasi 100%, 80%, 60%, 40%. Dan 20% rebusan balakacida yang dibandingkan dengan kontrol positif .

Menurut Depertemen Kesehatan RI menyebutkan bahwa mikroba dinyatakan peka terhadap antibakteri asal tanaman apabila mempunyai diameter daya hambatnya antara 12-24 mm (Depkes RI, 1998), berdasarkan zona hambat tersebut peneliti menggolongkannya sebagai berikut :

Diameter Zona Hambat (mm)	Aktivitas Antibakteri
< 3	+ (Resisten)
3 – 6	++ (intermediat)
>6	+++ (Sensitif)

3.5.1 Prinsip Pemeriksaan

Metode sumuran merupakan salah satu metode difusi dimana pada metode ini dibuat suatu lubang (sumur) pada media padat yang di isi rebusan daun balakacida dengan berbagai konsentrasi dan yang telah ditanami kuman *Pseudomonas aeruginosa*. Kemudian di inkubasi. Selanjutnya mengukur zona bening yang terbentuk disekitar sumuran.

3.5.2 Prosedur Pembuatan MHA (Media Mueller Hinton Agar)

1. Mempersiapkan alat dan bahan yang mau digunakan
2. Menimbang media MHA sebanyak yang dibutuhkan dan dihitung sesuai rumus dibawah ini :

MHA gram/liter membuat MHA sebanyak 15 plate x 20ml = 300

gram MHA = $34 \frac{\text{gram}}{1000} \times 300 = 10,2 \text{ gram}$

1000

3. Media MHA yang sudah ditimbang masukkan kedalam erlenmeyer dan tambahkan aquades 300 ml kedalam erlemayer
4. Panaskan media di atas api spirtus sampai larut dengan sempurna, jangan sampai mendidih
5. Media yang sudah larut sempurna diangkat, kemudian di suam-suam dengan air
6. pH diukur yaitu 7.2-7.4, jika pH terlalu basah maka ditambahkan HCl 0.1 N dan jika terlalu asam maka ditambahkan NaOH 0.1 N sampai pH yang telah ditentukan
7. Menutup dengan kasa yang sudah ada kapasnya dan bungkus dengan koran lalu diikat dengan karet
8. Sterilisasi di autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit
9. Setelah selesai maka turunkan dan dituang ke plate yang sudah steril sampai rata-rata ± 20 ml secara steril dan didekatkan dengan api diamkam sampai terlihat padat dan di uji sterilitas selama 24 jam di suhu ruang atau inkubator.

3.5.3 Pembuatan Rebusan daun balakacida

A. Alat dan Bahan Pembuatan Rebusan Daun alakacida (*Chromolaena odorata*)

Bahan yang digunakan pada pembuatan rebusan daun balakacidah adalah Beaker glass 250 ml, Gelas ukur 100 ml, Kasa steril, Neraca, termometer dan mikropipet. Sedangkan Bahan yang digunakan adalah daun balakcida yang masih segar warnanya hijau muda, posisi urutan ke- 3 dari kuncup dan Pz

B. Prosedur pembuatan rebusan daun balakacida (*Chromolaena odorata*)

Prosedur pembuatan rebusan daun balakacida (*Chromolaena odorata*) yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Memilih daun balakacida yang masih muda dan segar.
2. Dengan menggunakan 1 : 1 maka 50 gram untuk daun balakacida (*Chromolaena odorata*) dan 50 ml untuk aquadest steril.
3. Menimbang daun balakacida sebanyak 50 gram
4. Merebus daun balakacida (*Chromolaena odorata*) yang sudah ditimbang dengan suhu 50 °C selama 15 menit. Kemudian dilanjutkan dengan uji sterilitas rebusan daun balakacida (*Chromolaena odorata*)
 - a. Mengambil rebusan daun balakacida dengan ose bulat selanjutnya ditanam di MHA
 - b. Menginkubasi selama 1 x 24 dengan suhu 37°C dalam inkubator
 - c. Mengamati hasil, jika tidak terjadi pertumbuhan kuman berarti rebusan daun balakacida (*Chromolaena odorata*) benar- benar steril, namun jika media MHA terdapat pertumbuhan kuman berarti perlu dilakukan proses tindalisasi
 - d. Menanam kembali pada media MHA yang sudah melalui proses tindalisasi dan inkubasi dengan suhu 37° C selama 24 jam
5. Pembuatan konsentrasi rebusan daun balakacida (*Chromolaena odorata*)

Keterangan :

- a. Konsentrasi 100% : Tabung 1 di isi 1 ml rebusan (*Chromolaena odorata*) awal itu sebagai konsentrasi 100%
- b. Konsentrasi 80% : Tabung 2 di isi rebusan daun balakacida (*Chromolaena odorata*) sebanyak 0,8 dan ditambahkan Pz sebanyak 0,2 ml

- c. Konsentrasi 60% : Tabung 3 di isi rebusan daun balakacida (*Chromolaena odorata*) sebanyak 0,6 ml dan ditambahkan Pz sebanyak 0,4 ml
- d. Konsentrasi 40% : Tabung 4 di isi rebusan daun balakacida (*Chromolaena odorata*) sebanyak 0,4 ml dan ditambahkan Pz sebanyak 0,6 ml
- e. Konsentrasi 20% : Tabung 5 di isi rebusan daun balakacida (*Chromolaena odorata*) sebanyak 0,2 ml dan ditambahkan Pz sebanyak 0,8 ml

C Pembuatan Suspensi Kuman

1. Alat dan Bahan

Alat yang di gunakan dalam penelitian ini adalah Cawan petri, timbangan, pipet pastur, autoklaf, glass ukur 250, tabung reaksi, rak tabung, batang pengaduk, api spirtus, pipet ukur, erlenmeyer, ose bulat

Sedangkan bahan yang digunakan adalah NAS, MC, Media MHA (*Mueller Hinton agar*), Boillon, Aquadest, Pz, BaCl₂ 1%, dan H₂SO₄ 1%

2. Pembuatan Suspensi Kuman

Pembuatan Larutan Standar Mc. Farland 0,5 :

- a. Menyiapkan tabung steril kemudian membuat larutan standar Mc. Farland 0,5
- b. Membuat perbandingan antara BaCl₂ 1% : H₂SO₄ 1% 0,5: 9,5
- c. Memipet 0,05 ml BaCl₂ 1% + 9,95 ml H₂SO₄ 1%
- d. Menghomogenkan dengan cara mengocok pelan tabung.

Prosedur pembuatan suspensi kuman

- a) Biakan murni kuman diambil dengan menggunakan ose bulat kemudian dipindahkan kemedi boillon steril
- b) Media boilon diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C

- c) Setelah 24 jam kekeruhan suspensi kuman dibandingkan dengan standar Mc.Farland_{0,5}
- d) Apabila kurang keruh maka ditambahkan suspensi kuman dan apabila terlalu keruh maka tambahkan boilon sehingga kekeruhannya sama dengan Mc. Farland.

3.5.4 Prosedur Pemeriksaan Sampel

1. Hari Pertama

- a. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
- b. Menyiapkan media MHA (*Mueller Hinton Agar*)
- c. Suspensi kuman yang sudah disetarakan dengan standar Mc. Farland 0.5 diinokulasikan ke media MHA (*Mueller Hinton Agar*) dengan teknik *Street plate* dengan menggunakan lidi swab steril
- d. Membuat sumuran pada media menggunakan cork borer /silindre pelubang ukuran 5.
- e. Memipet masing masing konsentrasi perasan daun balakcida (*Chromolaena odorata*) dengan menggunakan mikropipet sebanyak 50 mikroliter (Riyana, 2016).
- f. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan posisi tidak dibalik.

2. Hari Kedua

Melakukan pengamatan dan pengukuran zona hambat yang terbentuk dengan menggunakan penggaris ukuran milimeter dan mencatat hasil yang diamati

3.6 Tabulasi Data

Data yang sudah diperoleh ditabulasikan dalam bentuk Tabel 3.2 sebagai berikut :

Tabel 3.2 Tabulasi Data Hasil Pengukuran Zona Hambat (mm) Bakteri

Pseudomonas aeruginosa

No	R	Hasil rata rata zona hambat bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> berdasarkan konsentrasi perasan daun balakacida dengan satuan (mm)					
		20%	40%	60%	80%	100%	K+
1.	R1						
2.	R2						
3	R3						
4	R4						
5	R5						
Jumlah							
Rata-rata							

Keterangan:**R = Replikasi****3.7 Metode Analisa Data**

Data yang sudah diperoleh dari hasil penelitian dijadikan dalam bentuk tabel dan narasi.