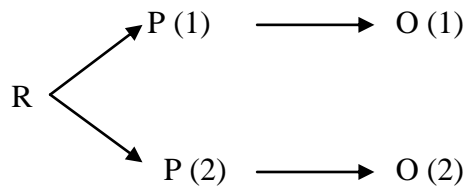


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah termasuk jenis penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui adanya perbedaan daya hambat antara antibiotik *Amoxicillin* dengan perasan daun pepaya terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* pada media MH. Adapun *design* penelitiannya adalah sebagai berikut :



Gambar 3.1 *design* atau rancangan penelitian

Keterangan :

R :Random

P (1) :Perlakuan dengan pemberian antibiotik *Amoxicillin*

P (2) :Perlakuan dengan pemberian perasan daun pepaya konsentrasi 100%

O (1) :Observasi pertumbuhan bakteri dengan adanya antibiotik *Amoxicillin*

O (2) :Observasi pertumbuhan bakteri dengan adanya perasan daun pepaya
100%

3.2 Populasi Sampel dan Sampling

3.2.1 Populasi penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* di dalam media pertumbuhan. *S.aureus* ATCC 25923 diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Klinik (BBLK).

3.2.2 Sampel penelitian

Sampel pada penelitian ini yaitu bakteri *S. aureus*. Untuk setiap perlakuan dalam penelitian dilakukan masing-masing sebanyak 2 perlakuan dan 16 pengulangan. Sehingga jumlah sampel yang digunakan yaitu 32 juta kuman. Berasal dari 1 mata ose (standart Mc Farland = 1 juta kuman/ml). Sehingga dalam 32 plate sampel yang digunakan sebanyak 32 juta kuman. Dilakukan 16 kali pengulangan didasarkan pada rumus $(r-1)(t-1) \geq 15$, maka akan diperoleh jumlah ulangan sebagai berikut :

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

$$(r-1)(2-1) \geq 15$$

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

$$r-1 \geq 15$$

$$r \geq 15+1$$

$$r \geq 16 \text{ (Federer, 1963)}$$

Keterangan :

r : Replikasi atau pengulangan

t : Perlakuan

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Prodi D3 Analisis Kesehatan, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.3.2 Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari – Juli 2018, sedangkan waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Maret – April 2018.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas : antibiotik *Amoxicillin* dan perasan daun pepaya.

Variabel terikat : zona hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

Variabel kontrol : suhu inkubator, lama inkubasi, sterilisasi, dll.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

1. *Antibiotik Amoxicillin* merupakan turunan dari penisilin semi sintetik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.
2. Perasan daun pepaya (*Carica papaya L.*) merupakan hasil proses penghancuran daun pepaya secara mekanik tanpa penambahan aquadest steril kemudian diperas dan siraring dengan kasa steril berlapis.
3. Zona hambat adalah daerah dimana terhambatnya pertumbuhan bakteri pada media gara oleh senyawa antibiotik ditandai dengan zona bening yang diukur dengan jangka sorong atau penggaris dalam satuan milimeter (mm).

4. Suhu inkubasi adalah suhu pada suatu tempat yang digunakan untuk menginkubasi atau menyimpan media yang telah ditanam bakteri *Staphylococcus aureus*. Suhu yang digunakan adalah suhu 37°C.
5. Lama inkubasi adalah waktu yang digunakan untuk mengetahui pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan melihat zona hambatnya. Lama waktu yang digunakan adalah 1x24 jam.
6. Sterilisasi adalah pemusnahan atau eliminasi semua mikroorganisme termasuk bakteri, spora, yang sangat resisten.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data zona hambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dikumpulkan dengan observasi atau pengamatan tidak langsung, yaitu melalui pengujian laboratorium. Pemeriksaan daya hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ini menggunakan *Disk Diffusion Test* yaitu Tes Difusi Agar dengan menggunakan disk. Langkah-langkah pemeriksaan adalah sebagai berikut:

3.5.1 Prinsip pemeriksaan

Media Muller Hilton ditanami dengan bakteri biakan murni *S. aureus* setelah melalui proses perhitungan standart Mac Farland 0,5 kemudian disk kosong direndam selama 2 jam agar disk tersebut menyerap senyawa antimikroba pada perasan daun pepaya yang sudah steril dengan proses perendaman dengan larutan desinfektan, disk perasan daun pepaya dan disk yang berisi antibiotik *Amoxicilin* ditempelkan sedikit menekan agar menempel kuat pada media Muller Hilton, setelah proses inkubasi diobservasi kemudian dibandingkan zona hambat antara disk perasan daun pepaya dengan disk antibiotik *Amoxicillin*.

3.5.2 Persiapan alat dan bahan

Alat yang digunakan meliputi; plate, pipet ukur, disk kosong, pH indikator, penggaris atau jangka sorong, neraca analitik, gelas arloji, tabung reaksi, gelas ukur, batang pengaduk, rak tabung, pipet pasteur, bunsen, kaki tiga, kasa asbes, hot plate, tabung centrifuge, filler, erlenmeyer, ose, pinset steril, dan autoclave.

Bahan yang digunakan adalah perasan daun pepaya 100%, antibiotik *Amoxicillin*, suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*, media Nutrien Agar Slant (NAS), media Muller Hilton Agar (MHA), media Manitol Salt Agar (MSA), aquadest steril, dan Pz steril. Serta reagen untuk pemeriksaan meliputi; NaOH 0,1N, HCL 0,1N, BaCl 1%, dan H₂SO₄ 1%, serta larutan Natrium Hipoklorid/NaClO dengan konsentrasi 1% atau Bayclin (NaClO 5%) dan larutan Alkohol 70 %.

3.5.3 Prosedur Pemeriksaan

3.5.3.1 Prosedur pembuatan suspensi kuman

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

1. Dua tabung, satu tabung untuk suspensi dan satu tabung untuk membuat standart Mc Farlan 0,5 disiapkan.
2. Prosedur pembuatan standart Mc Farland 0,5 yaitu:
 - a. Dibuat perbandingan antara BaCl 1% : H₂SO₄.
 - b. 0,05 ml BaCl 1% + 0,95 ml H₂SO₄ dipipet masukkan ke dalam tabung.

- c. Homogenkan dengan cara mengocok pelan tabung.
 - d. Setiap 1 ml Standart Mc Farland mengandung 150 juta kuman.
3. Prosedur pembuatan suspensi kuman, yaitu:
- a. Tabung steril di isi dengan PZ \pm 5 ml.
 - b. Kuman dari biakan *S.aureus* murni yang sudah ditanam pada media NAS umur 24 jam diambil dengan lidi kapas steril.
 - c. Lidi kapas steril yang sudah ada kumannya dicelupkan pada tabung yang berisi PZ steril.
 - d. Kekeruhan suspensi kuman dibandingkan dengan Mc Farland 0.5.
 - e. Apabila suspensi kurang keruh, maka ditambahkan Pz hingga kekeruhannya sama dengan standart Mc. Farland 0.5.

Standarisasi Ose yang akan dipakai dalam penelitian (Tera Ose) :

1. Pipet 0,1 ml, filler, dan tabung disiapkan.
2. Aquadest 0,1 ml dipipet, kemudian menuanginya kedalam tabung.
3. Api spirtus dinyalakan.
4. Satu mata ose aquadest yang sudah dituang kedalam tabung diambil, kemudian memanaskan ose tersebut di atas api spirtus, lakukan berulang-ulang sampai aquadest di dalam tabung habis.
5. Didapatkan 15 mata ose air tersebut habis.

$$1 \frac{nl}{150} = \frac{1}{150} / ml$$

Jumlah kuman setiap 1 mata ose :

$$\frac{000.000}{150} = 1.000.000 \quad \text{kuman} \quad (\text{bila} \quad \text{suspensi} \quad \text{kuman}$$

permiliternya 150 juta kuman) (Soemarno, 2005)

3.5.3.2 Prosedur pembuatan media Nutrient Agar Plate (NAP)

Prosedur pembuatan media NAP adalah sebagai berikut :

1. Perhitungan media *Nutrient Agar* (NA)
 Dibuat NAP (5 plate @plate ± 17 ml → 102 ml)
 Komposisi NA 20 gram per liter → $\frac{20 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times 102 \text{ ml} = 2,04 \text{ gram}$
2. Alat dan bahan yang akan digunakan disiapkan.
3. Reagen NA ditimbang dengan perhitungan 2,04 gram dengan menggunakan timbangan triple beam balance.
4. Volume aquadest 102 ml diukur dengan gelas ukur yang sudah diukur volumenya ke dalam erlenmeyer.
5. Media yang telah ditimbang, dituang kedalam beaker glass dan ditambahkan aquadest yang telah di ukur volumenya, aduk hingga larut
6. Larutan tersebut dipanaskan diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih.
7. Larutan yang sudah dipanaskan, diangkat dan didinginkan dengan air yang telah disiapkan dibaskom sampai benar-benar hangat kuku.
8. pH media diukur sampai didapatkan pH 7,4 jika terlalu asam di tambahkan NaOH 0,1 N jika terlalu basa ditambahkan HCL 0,1 N.
9. Erlenmeyer yang berisi larutan media ditutup dengan kapas berlemak dan menyeterilkannya dengan autoclave, pada suhu 121°C selama 15 menit.
10. Media dikeluarkan dari autoclave dan dituangkan kedalam plate steril sebanyak 17 ml, hingga merata.

11. Media yang telah dituang, didiamkan sampai terlihat mengeras kemudian disimpan ke dalam lemari pendingin (Soewarsono, 1993).

3.5.3.3 Prosedur pembuatan media Manitol Salt Agar (MSA)

Prosedur pembuatan media MSA adalah sebagai berikut:

1. Perhitungan media *Manitol Salt Agar* (MSA) yang dibutuhkan :
 Dibuat MSA (4 plate, @ ±17 ml → 68 ml)
 Komposisi MSA gram per 1 liter → $\frac{7,344 \text{ gram}}{1 \text{ liter}} \times 68 \text{ ml} = 7,344 \text{ gram}$
2. Alat dan bahan yang akan digunakan disiapkan.
3. Reagen MSA ditimbang dengan perhitungan 7,344 gram menggunakan timbangan triple beam balance.
4. Volume aquadest 68 ml diukur dengan gelas ukur, yang sudah diukur volumenya ke dalam erlenmeyer.
5. Media yang telah ditimbang, dituang kedalam beaker glass dan ditambahkan aquadest yang telah di ukur volumenya, aduk hingga larut.
6. Larutan tersebut dipanaskan diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih.
7. Larutan yang sudah dipanaskan, diangkat dan didinginkan dengan air yang telah disiapkan dibaskom sampai benar-benar hangat kuku.
8. pH media diukur sampai didapatkan pH 7,4 jika terlalu asam di tambahkan NaOH 0,1 N jika terlalu basa ditambahkan HCL 0,1 N.
9. Erlenmeyer yang berisi larutan media ditutup dengan kapas berlemak dan menyeterilkannya dengan autoclave, pada suhu 121°C selama 15 menit.

10. Media dikeluarkan dari autoclave dan dituangkan kedalam plate steril sebanyak 17 ml, hingga merata.
11. Media yang telah dituang, didiamkan sampai terlihat mengeras kemudian disimpan ke dalam lemari pendingin (Soewarsono, 1993).

3.5.3.4. Prosedur pembuatan media Mueller Hilton (MH)

Prosedur pembuatan media MH adalah sebagai berikut :

1. Perhitungan media *Muller Hilton* (MH) yang dibutuhkan :

Dibuat MH (15 plate, @ plate ±17 ml → 225 ml)

Komposisi MH 20 gram per liter → $\frac{20 \text{ gram}}{1 \text{ liter}} \times 68 \text{ ml} = 7,344 \text{ gram}$

2. Alat yang akan digunakan disiapkan.
3. Reagen MH ditimbang dengan perhitungan 7,344 gram menggunakan timbangan triple beam balance.
4. Volume aquadest 225 ml diukur dengan gelas ukur, yang sudah diukur volumenya ke dalam erlenmeyer.
5. Media yang telah ditimbang, dituang kedalam beaker glass dan ditambahkan aquadest yang telah di ukur volumenya, aduk hingga larut.
6. Larutan tersebut dipanaskan diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih.
7. Larutan yang sudah dipanaskan, diangkat dan didinginkan dengan air yang telah disiapkan dibaskom sampai benar-benar hangat kuku.
8. pH media diukur sampai didapatkan pH 7,4 jika terlalu asam di tambahkan NaOH 0,1 N jika terlalu basa ditambahkan HCL 0,1 N.

9. Erlenmeyer yang berisi larutan media ditutup dengan kapas berlemak dan menyeterilkannya dengan autoclave, pada suhu 121°C selama 15 menit.
10. Media dikeluarkan dari autoclave dan dituangkan kedalam plate steril sebanyak 17 ml, hingga merata.
11. Media yang telah dituang, didiamkan sampai terlihat mengeras kemudian disimpan ke dalam lemari pendingin (Soewarsono, 1993).

3.5.3.5 Uji sterilisasi perasan daun pepaya

Prosedur uji sterilisasi perasan daun pepaya yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Daun pepaya ditimbang sebanyak 100 gram.
2. Daun pepaya yang telah ditimbang, dicuci dengan aquadest sampai benar-benar bersih, dibilas dengan aquadest steril.
3. Daun pepaya dihaluskan sampai benar-benar halus dengan menggunakan mortal yang sebelumnya telah dibakar dengan alkohol.
4. Daun pepaya yang telah halus, disaring dengan menggunakan kasa steril berlapis sampai jernih.
5. Perasan daun yang telah disaring dimasukan ke dalam tabung yang steril sehingga di dapatkan perasan daun pepaya konsentrasi 100%. (10 ml)
6. Satu mata ose bulat diambil pada perasan daun pepaya konsentrasi 100% secara steril, kemudian ditanam ke media NAP dengan cara menggoreskannya dipermukaan media. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

7. Pada media NAP diidentifikasi, jika hasilnya tidak terjadi pertumbuhan kuman menandakan bahwa perasan daun pepaya 100% sudah benar-benar steril. Namun, jika pada media NAP terdapat pertumbuhan kuman menandakan bahwa perasan daun pepaya 100% belum steril, maka perlu dilakukan proses perendaman dengan menggunakan larutan desinfektan, yaitu :
 - a. Daun pepaya direndam pada larutan Natrium Hipoklorid/ NaClO dengan konsentrasi 1% atau Bayclin (NaClO 5%) pada konsentrasi 20%. Dengan cara 200 ml larutan Bayclin diukur pada gelas ukur, lalu dituangkan pada labu ukur 1000 ml add kan sampai garis miniskus, direndam selama 10 menit, bilas dengan aquadest steril.
 - b. Daun pepaya direndam pada alkohol dengan konsentrasi 70%, selama 10 menit, dibilas dengan aquadest steril (Anis, 2010).

3.5.3.6 Uji Sterilisasi Antibiotik *Amoxicillin*

Prosedur uji sterilisasi antibiotik *Amoxicillin* yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Satu tablet antibiotik *Amoxicillin* (250 mg) dihaluskan, dengan menggunakan mortal yang telah dibakar dengan alkohol.
2. Aquadest steril dilarutkan sama dengan volume perasan daun pepaya 100% (10 ml), dituang dalam tabung steril.
3. Satu mata ose bulat diambil pada larutan antibiotik *Amoxicillin* secara steril, kemudian ditanam ke media NAP dengan cara menggoreskannya di permukaan media. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C .

3.5.3.7 Standart Diameter Zona Resistensi Antibiotik *Amoxicillin*

Tabel 3.1 Standart Diameter Zona Resistensi Antibiotik *Amoxicillin*

Diameter zona setiap kategori		
Resistensi (mm)	Intermediet (mm)	Sensitif (mm)
≤ 28	-	≥ 29

3.5.4 Prosedur Pemeriksaan Sampel

Hari Pertama Pemeriksaan:

1. Alat dan bahan yang dibutuhkan disiapkan.
2. Api spirtus dinyalakan dan diletakkan disekitar alat dan bahan yang akan digunakan.
3. Bakteri *S.aureus* diambil dengan menggunakan catton swab steril, kemudian ditanam diatas permukaan media MH dengan cara digoreskan secara perlahan dan merata ke semua media, biarkan 3-5 menit.
4. Paper disk diletakkan diatas media dengan diameter yang sama, yang sebelumnya paper disk telah direndam terlebih dahulu dengan perasan daun pepaya 100%, juga pada paper disk yang telah direndam pada larutan antibiotik *Amoxicilin*. Masing- masing direndam selama dua jam.
5. Paper disk ditekan sedikit diatas permukaan media, supaya merekat dengan media dan tidak jatuh saat dibalik. Melakukan secara steril.

6. Media Muller Hilton diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C (Miawan, 2014).

Hari Kedua Pemeriksaan:

1. Daerah hambatan perumbuhan bakteri yang terjadi pada petri disk diamati, daerah hambatan tersebut nampak sebagai daerah yang tidak ditumbuhi kuman dari bagian media yang lain dalam petri disk, dapat dilihat dengan terbentuknya zona bening disekitar paper disk.
2. Diameter daerah hambatan pertumbuhan diukur dengan menggunakan jangka sorong atau penggaris dalam satuan milimeter.
3. Ditentukan pada perlakuan mana yang menunjukkan sensitifitas terhadap bakteri *S.aureus* dengan melihat daerah hambat bakteri (Miawan, 2014).

3.5.5 Prosedur Pengumpulan Data

Data pertumbuhan bakteri *S. aureus* diperoleh melalui uji laboratorium dengan menggunakan metode *disc diffusion*. Data dikumpulkan dengan cara mengukur diameter daerah atau zona hambatan pertumbuhan *S.aureus* dengan menggunakan alat ukur jangka sorong atau penggaris dengan satuan milimeter (mm).

**Tabel 3.2 Hasil Pengukuran Perbedaan Zona Hambat antara
Antibiotik *Amoxicilin* dengan Perasan Daun Pepaya (*Carica papaya L.*)
Terhadap Bakteri *S.aureus***

No	Pengulangan ke	Hasil Pemeriksaan Perbedaan Diameter Zona Hambat pada Antibiotik <i>Amoxicilin</i> dan Perasan Daun Pepaya (mm)	
		Amoxicillin	Daun Pepaya
1	P1		
2	P2		
3	P3		
4	P4		
5	P5		
6	P6		
7	P7		
8	P8		
9	P9		
10	P10		
11	P11		
12	P12		
13	P13		
14	P14		
15	P15		
16	P16		
Jumlah			
Rata-rata			
Standar Deviasi			

3.6 Analisa Data

Data yang diperoleh dari uji laboratorium kemudian ditabulasi selanjutnya data di uji dengan menggunakan Uji Normalitas dan Homogenitas pada uji Kolomogorov-Sminrnov test, apabila data berdistribusi normal dilanjutkan pada uji Two Way Anova dengan tingkat kesalahan 5%, dan apabila data tidak

berdistribusi normal maka dilanjutkan pada uji Kruskal Wallis dengan tingkat kesalahan 5%.