

BAB 3

METODE PENELITIAN

1.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam penelitian jenis eksperimen. Penelitian eksperimen adalah penelitian yang bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya akibat dari “sesuatu” yang dikenakan pada subjek selidik (Arikunto,2009). Tujuan dari penelitian eksperimen untuk menemukan pengaruh dari rebusan kulit batang kamboja merah (*Plumeria rubra*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

1.2 Desain Penelitian

Penelitian ini adalah eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh rebusan kulit batang kamboja terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan rancangan penelitian sebagai berikut.

Random :

P(-)	→	O(-)
P(1)	→	O(1)
P(2)	→	O(2)
P(3)	→	O(3)
P(4)	→	O(4)



Keterangan :

- P(-) : Perlakuan tidak diberi rebusan kulit batang kamboja merah (*Plumeria rubra*)
- P(1) : Perlakuan dengan pemberian rebusan kulit batang kamboja merah (*Plumeria rubra*) konsentrasi 100%
- P(2) : Perlakuan dengan pemberian rebusan kulit batang kamboja merah (*Plumeria rubra*) konsentrasi 75%
- P(3) : Perlakuan dengan pemberian rebusan kulit batang kamboja merah (*Plumeria rubra*) konsentrasi 50%
- P(4) : Perlakuan dengan pemberian rebusan kulit batang kamboja merah (*Plumeria rubra*) konsentrasi 25%
- O(-) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan tanpa pemberian rebusan kulit batang kamboja merah (*Plumeria rubra*)
- O(1) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian rebusan kulit batang kamboja merah (*Plumeria rubra*) konsentrasi 100%
- O(2) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian rebusan kulit batang kamboja merah (*Plumeria rubra*) konsentrasi 75%

O(3) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian rebusan kulit batang kamboja merah (*Plumeria rubra*) konsentrasi 50%

O(4) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian rebusan kulit batang kamboja merah (*Plumeria rubra*) konsentrasi 25%

1.3 Populasi dan Sampel Penelitian

1.3.1 Populasi Penelitian

Populasi yang dimaksud dalam penelitian ini adalah macam – macam bakteri pada media penyimpanan di laboratorium.

1.3.2 Sampel Penelitian

Adapun sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus*.

1.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

1.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya, tepatnya di Jalan Karang Menjangan No.18, Airlangga, Kec. Gubeng, Kota Surabaya, Jawa Timur.

1.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini akan diagendakan sekitar bulan Mei 2020 di Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya, tepatnya di Jalan Karang Menjangan No.18, Airlangga, Kec. Gubeng, Kota Surabaya, Jawa Timur.

1.5 Variabel Penelitian dan Definisi Oprasional

1.5.1 Variabel Penelitian

Pada umumnya, variabel penelitian dibedakan menjadi dua yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Dalam penelitian ini, variabel yang digunakan adalah variabel bebas dan variabel terikat dan tidak melibatkan variabel yang lain. Adapun variabel-variabel dalam penelitian ini adalah:

- a. Variabel bebas: Pemberian konsentrasi rebusan kulit batang kamboja merah (*Plumeria rubra*) pada media pertumbuhan
- b. Variabel terikat: Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

1.5.2 Definisi Operasional Variabel

Pemberian konsentrasi rebusan kulit batang kamboja merah (*Plumeria rubra*) pada media pertumbuhan terjadinya zona jernih akibat tidak adanya pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada sekitar paper disk rebusan kulit batang kamboja sesuai konsentrasinya.

Membuktikan *Staphylococcus aureus* tidak tumbuh pada media NAP yang telah di tambahkan paper disk yang berisi rebusan kulit batang kamboja merah (*Plumeria rubra*) dalam konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%.

1.6 Metode Analisis Data

Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dianalisis dengan uji Anova dilakukan terhadap diameter zona hambat pertumbuhan bakteri uji menunjukkan bahwa perbedaan konsentrasi berpengaruh nyata terhadap diameter zona hambat.

1.7 Metode Pengumpulan Data

Data pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh dengan cara observasi langsung, yaitu dengan melalui uji Laboratorium. Uji daya hambat pada *Staphylococcus aureus* ini menggunakan metode perhitungan sensitivitas test.

1.7.1 Prosedur Pembuatan Standart Mac Farland 0,5

1. Alat dan Reagen

Alat yang digunakan adalah : Tabung, Pipet ukur, Push ball, dan Rak tabung.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah : H₂SO₄ 1%, BaCl₂ 1%, Aquadest steril.

3. Prosedur

1. Tabung steril disiapkan, kemudian membuat perbandingan antara BaCl 1% : H₂SO₄ 1% sebesar 1:9
2. Pipet 0,05 ml BaCl 1% kemudian menambahkan 9,95 ml H₂SO₄ 1%
3. Dihomogenkan dengan cara kocok pelan tabung.

1.7.2 Prosedur Pembuatan Suspensi Kuman

1. Alat

Alat yang digunakan adalah tabung steril dan ose bulat.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah Pz steril dan biakan murni *Staphylococcus aureus*.

3. Prosedur

1. Tabung steril disiapkan lalu masukkan Pz (NaCl 0,85%) steril.
2. Kuman diambil dari biakan *Staphylococcus aureus* murni yang sudah ditanam di media NAS dengan ose steril.
3. Ose steril yang sudah ada kumannya dicelupkan pada tabung yang berisi Pz.
4. Kekeruhan suspensi kuman disamakan dengan standar Mc Farland 0,5.
5. Apabila kurang keruh, maka menambahkan kuman dengan ose steril dan apabila terlalu keruh menambahkan Pz hingga kekeruhan sama dengan standar Mc Farland 0,5.

1.7.3 Prosedur Pembuatan Media Nutrient Agar Plate (NAP) 5 Plate.

1. Alat

Alat yang digunakan adalah :

Plate, Timbangan neraca analitik, Cawan petri, Pipet Pasteur, Autoclave, Pemanas air (water bath), Incubator, Gelas ukur, Api spiritus, Kaki tiga, Erlenmeyer, Kertas Ph

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah :

Media NAP, Aquadest steril, NaOH & HCl 0,1 N

3. Prosedur

- 1) Media NA (Nutrien Agar) lakukan perhitungan.
- 2) 5 plate (20 ml / plate) = $5 \times 20 = 100$ ml Aquadest
- 3) Bahan $100 \div 1000 \times 20 = 2$ gram media NAP.
- 4) Alat dan bahan yang digunakan disiapkan.
- 5) Bahan (Media Nutrien Agar) ditimbang sebanyak 2 gram.
- 6) Sampel Nutrien Agar dimasukkan ke erlenmeyer kemudian ditambahkan dengan aquades sebanyak 100 ml.
- 7) Sampel dilarutkan dengan cara dipanaskan sampai larut sempurna.
- 8) Larutan yang sudah dipanaskan diangkat, kemudian mendinginkannya dengan air yang sudah disisapkan di baskom sampai suam suam.
- 9) PH diukur sampai 7,2 jika terlalu asam ditambahkan dengan NaOH 0,1N, sedangkan jika terlalu basa ditambahkan dengan HCL 0,1N sampai PHnya 7,2.
- 10) Erlenmeyer ditutup dengan kapas berlemak dan di steril dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
- 11) Setelah turun dari autoclave, dituang kedalam plate yang steril sebanyak 20 ml tiap plate sebanyak 5 plate dengan cara flaming.
- 12) Didiamkan sampai terlihat padat dan menyimpannya ke almari es.

1.7.4 Prosedur Pembuatan Rebusan Kulit Batang Kamboja Merah (*Plumeria rubra*)

Prosedur pembuatan konsentrasi rebusan kulit batang kamboja merah (*Plumeria rubra*) yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Cuci bersih batang kamboja, setelah itu kuliti batang kamboja merah (*Plumeria rubra*) sampai kulit benar benar terkuliti semua.
2. Kulit batang kamboja merah (*Plumeria rubra*) ditimbang sebanyak 100 gram
3. Dimasukan kulit batang kamboja merah (*Plumeria rubra*) 100 gram kedalam beaker glass dan tambahkan 100 ml aquadest rebusan dengan dianggap konsentrasi 100 %
4. Saat proses perebusan suhu distabil yaitu 75°C selama 15 menit.
5. Rebusan diencerkan menjadi konsentrasi 75%, 50%, 25%.
 - a) Diambil rebusan murni sebanyak 7,5 ml dan ditambahkan aquadest sebanyak 2,5 ml dianggap konsentrasi 75% sebanyak 10 ml.
 - b) Diambil rebusan murni sebanyak 5 ml dan ditambahkan aquadest 5 ml dianggap konsentrasi 50% sebanyak 10 ml.
 - c) Diambil rebusan murni sebanyak 2,5 ml dan ditambahkan aquadest 7,5 ml dianggap konsentrasi 25% sebanyak 10 ml.
6. Setelah semua konsentrasi rebusan jadi. Memastikan rebusan sudah benar benar steril.
7. 1 mata ose rebusan diambil, kemudian ditanam ke media NAP, dengan cara menggoreskannya di permukaan media.
8. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C

9. Setelah itu diamati, jika tidak terjadi pertumbuhan kuman berarti rebusan kulit batang kamboja tadi sudah benar benar steril. Namun jika pada media NAP terdapat pertumbuhan kuman berarti perlu dilakukan proses tindalisasi, yaitu :

- a) Rebusan kulit batang kamboja dipanaskan pada waterbath pada suhu 90°C Selma 15 menit.
- b) Kemudian diletakkan di incubator selama 24 jam pada suhu 37°C.
- c) Ditanam kembali rebusan kulit batang kamboja yang sudah melalui proses tindalisasi di media NAP dan menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37°C.
- d) Jika rebusan sudah benar- benar steril, rebusan ditunggu hingga dingin.
- e) Jika rebusan sudah dingin dipipet 1-2 ml rebusan diletakkan pada plate steril yang telah berlabelkan tiap konsentrasi yaitu 100%, 75%, 50%, 25% dan 0%, lalu dimasukkan paper disk blank pada plate yang telah berisikan rebusan sesuai dengan konsentrasinya.
- f) Inkubasi selama kurang lebih 2 jam
- g) Paper disk diangkat dan dikeringkan pada suhu ruang.

1.7.5 Prosedur Pemeriksaan Sample.

1. Hari pertama pemeriksaan :

1. Alat dan bahan disiapkan
2. Api spiritus dinyalakan dengan korek api.
3. Masing – masing plate yang berisikan media NAP diberi label sesuai dengan konsentrasi rebusan, yaitu konsentrasi 100%, 75%, 50%, 25% dan 0% (sebagai kontrol).
4. Mengambil suspensi kuman *Staphylococcus aureus* menggunakan swab steri (kapas lidi) dan digoreskan pada media NAP secara merata perlakuan dilakukan berulang sesuai dengan jumlah media NAP.
5. Diletakkan paper disk yang telah direndam pada rebusan kulit batang kamboja sesuai dengan konsentrasi rebusan.
6. Inkubasi media yang telah ditanami kuman *Staphylococcus aureus* selama 24 jam pada suhu 37°C

2. Hari kedua :

1. Masing – masing plate NAP diamati apakah terbentuk zona pada masing masing area paper disk yang berbeda konsentrasi.
2. Amati menggunakan alat coloni counter
3. Diukur diameter zona hambat bakteri
4. Diameter >12 mm termasuk kategori sensitive, diameter $4 > \phi \leq 12$ mm termasuk kategori intermediet, diameter < 4 mm termasuk kategori resisten.

5. Catat diameter zona hambat bakteri pada tiap tiap konsentrasi.

1.8 Tabulasi Data

Tabel 3.1 : Contoh tabulasi data

NO.	Kode sampel	Diameter zona hambat bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dengan penambahan rebusan kulit batang kamboja merah (<i>Plumeria rubra</i>)				
		Control 0%	25%	50%	75%	100%
1	P1					
2	P2					
3	P3					
4	P4					
5	P5					
Jumlah						
Rata – Rata						

1.9 Analisa Data

Data yang diperoleh menggubakan uji anova dengan tingkat kesalahan 5% (0,05).