

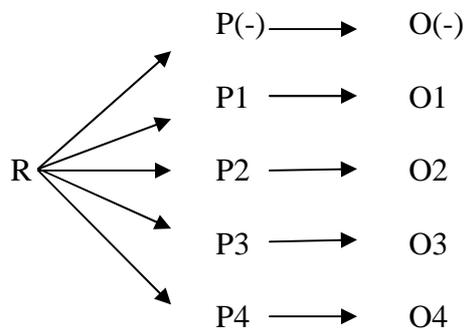
BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan rancangan penelitian eksperimental laboratorium dengan tujuan untuk mengetahui suatu gejala atau pengaruh yang timbul sebagai akibat dari adanya perlakuan tertentu (Notoatmodjo, 2005), dalam hal ini untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh antara air rebusan daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Desain penelitian sebagai berikut:



Gambar 3.1: Rancangan Penelitian (Zainuddin, 2003)

R : Random

P(-) : Perlakuan yang tidak diberi air rebusan daun binahong

P1 : Perlakuan konsentrasi air rebusan daun binahong 100%

P2 : Perlakuan konsentrasi air rebusan daun binahong 75%

P3 : Perlakuan konsentrasi air rebusan daun binahong 50%

P4 : Perlakuan konsentrasi air rebusan daun binahong 25%

- O(-) : Observasi setelah perlakuan kontrol
- O1 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 100%
- O2 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 75%
- O3 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 50%
- O4 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 25%

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi

Dalam penelitian ini populasi yang diambil adalah daun binahong yang berwarna hijau tua dalam keadaan segar (yang baru dipetik), dan dipilih langsung dari pohonnya di jalan Mojo pada bulan Mei 2012.

3.2.2 Sampel

Dalam penelitian ini sampel yang diambil adalah air rebusan daun binahong, sedangkan jumlah pengulangan sampelnya diperoleh dari rumus sebagai berikut :

$$(n-1)(k-1) \leq 15$$

$$(n-1)(4-1) \leq 15$$

$$(n-1)(3) \leq 15$$

$$3n - 3 \leq 15$$

$$3n \leq 15 + 3$$

$$3n \leq 18$$

$$n \leq 18/3 = 6$$

(Zainudin,2003)

Keterangan:

n: Jumlah sampel

k : Perlakuan

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya JL. Sutorejo 59 Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Februari sampai Juli 2012, sedangkan waktu pemeriksaan dilaksanakan pada bulan Mei 2012.

3.4 Variabel dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas : Air rebusan daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis)

Variabel terikat : Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

3.4.2 Definisi Operasional

1. Air rebusan daun binahong didapatkan dari 100gr daun binahong dengan 100ml air, kemudian direbus selama 15 menit dan air rebusan daun binahong tersebut dikategorikan menjadi berbagai macam konsentrasi, yaitu : 100%, 75%, 50%, 25%, dan 0% (kontrol).
2. Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* adalah ditetapkan berdasarkan kekeruhan atau kejernihan air rebusan daun binahong yang terdapat pada masing-masing

konsentrasi setelah di inkubasi pada inkubator selama 24 jam, suhu 37° C, pertumbuhan dikategorikan menjadi tumbuh dan tidak tumbuh. Karena air rebusan daun binahong merupakan larutan yang berwarna, maka kekeruhan dalam tabung yang seharusnya menunjukkan adanya pertumbuhan kuman agaknya sulit untuk dilihat secara visual. Untuk meyakinkan ada tidaknya pertumbuhan kuman perlu dilakukan pemeriksaan lebih lanjut yaitu dengan cara menanam pada media *Manitol Salt Agar* (MSA).

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 Pengenceran. Langkah-langkah pemeriksaannya diantaranya 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 pada inkubator dan diamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan terjadinya kekeruhan. Larutan uji senyawa antibakteri pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan bakteri uji, ditetapkan sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM) atau *Minimum Inhibition Concentration* (MIC) (Pratiwi, 2008).

3.5.2 Alat- Alat

1. Timbangan

9. Gelas arloji

- | | |
|------------------|-----------------------|
| 2. Tabung Reaksi | 10. Gelas ukur |
| 3. Pengaduk | 11. Rak tabung |
| 4. Pipet Pasteur | 12. Api spirtus |
| 5. Blender | 13. Filler |
| 6. Erlenmeyer | 14. Ose |
| 7. Autoclave | 15. Plate |
| 8. Pipet ukur | 16. Tabung sentrifuge |

3.5.3

Bahan Pemeriksaan

1. Air rebusan daun binahong
2. Suspensi kuman *Staphylococcus aureus*
3. Aquades steril
4. Media *Nutrient Agar* (NA)
5. Pz steril
6. Media *Manitol Salt Agar* (MSA)

3.5.4 Reagen Pemeriksaan

1. NaOH 0.1 N
2. HCl 0.1 N
3. BaCl 1%
4. H₂SO₄ 1%

3.5.5 Prosedur Pembuatan Suspensi Kuman

Pembuatan suspensi kuman sesuai dengan metode Mc.Farlan I:

1. Menyiapkan 2 tabung steril, 1 untuk suspensi dan yang 1 untuk standart Mc Farlan I.
2. Prosedur membuat standart Mc Farlan I, yaitu:
 - 1) Membuat perbandingan antara BaCl 1% : H₂SO₄ 1 % sebesar 1 : 9
 - 2) Memipet 0,1 ml BaCl 1 % + 9,9 ml H₂SO₄ 1 %
 - 3) Menghomogenkan dengan cara kocok pelan tabung.

Standart Mc Farlan I ini sama dengan tiap 1 ml nya mengandung 300 juta kuman.

3. Prosedur membuat suspensi kuman, yaitu:

- 1) Mengisi tabung steril dengan Pz ± 5 ml.
- 2) Mengambil kuman dari biakan *Staphylococcus aureus* murni yang sudah ditanam di media NAS dengan lidi kapas steril.
- 3) Menyelupkan lidi kapas steril yang sudah ada kumannya pada tabung yang berisi Pz.
- 4) Membandingkan warna suspensi kuman dengan Mc Farlan I.
- 5) Apabila warna kurang keruh, maka tambahkan kuman dengan lidi kapas dan apabila terlalu keruh tambahkan Pz hingga warnanya sama dengan standart Mc Farlan I.

Untuk mendapatkan kuman tiap ml nya 1 juta, maka dilakukan pengenceran dengan cara:

- 1) Menyiapkan tabung steril.
- 2) Memipet 9,97 ml Pz steril dan 0,033 ml suspensi kuman Mc Farlan I tadi
- 3) Menghomogenkan tabung dengan cara dikocok perlahan-lahan.

- 4) Suspensi kuman dengan jumlah kuman tiap ml nya 1 juta siap digunakan (Soemarno, 2000).

3.5.6 Prosedur Pembuatan Media *Nutrient Agar Plate* (NAP)

- 1) Melakukan perhitungan media *Nutrient Agar* (NA)
- 2) Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan.
- 3) Menimbang bahan (media NA) sesuai dengan perhitungan menggunakan timbangan.
- 4) Mengukur volume aquadest 80 ml menggunakan gelas ukur.
- 5) Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest yang sudah diukur volumenya dalam erlenmeyer.
- 6) Memanaskan larutan diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih.
- 7) Mengangkat larutan yang sudah dipanaskan dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam – suam kuku.
- 8) Mengukur pH nya sampai 7.4, jika terlalu asam menambahkannya dengan NaOH 0.1 N, sedangkan jika terlalu basa menambahkannya dengan HCl 0.1 N sampai pH nya 7.4.
- 9) Menutup erlenmeyer dengan kapas berlemak dan menyeterilkannya dengan autoclave, pada suhu 121°C selama 15 menit.
- 10) Setelah turun dari autoclave, menuangkannya ke dalam plate yang steril sampai rata.
- 11) Mendinginkannya sampai terlihat padat dan menyimpannya ke almari es.

3.5.7 Prosedur Pembuatan Konsentrasi Air Rebusan Daun Binahong

1. Memetik daun binahong yang berwarna hijau tua dari pohonnya.
2. Mencuci daun sampai bersih dan yang terakhir dicuci dengan aquadest steril.
3. Menimbang daun sesuai dengan kebutuhan.
4. Rebus daun binahong selama 15 menit setelah air mendidih.
5. Menyaring air rebusan daun binahong dengan menggunakan kertas saring steril.
Menyaring sampai benar-benar jernih.
6. Menyentrifuge kembali air rebusan tadi ditabung sentrifuge yang steril sehingga didapatkan perasan yang benar-benar jernih.
7. Mengambil 1 mata ose air rebusan yang sudah jernih secara steril, kemudian menanamnya ke media NAP, dengan cara menggoreskannya dipermukaan media.
8. Inkubasi di inkubator selama 24 jam, suhu 37° C.
9. Mengamati hasilnya, jika tidak terjadi pertumbuhan kuman berarti air rebusan daun binahong tadi sudah benar – benar steril. Namun jika pada media NAP terdapat pertumbuhan kuman berarti perlu dilakukan proses tindalisasi, yaitu:
 - 1) Memanaskan air rebusan daun binahong dengan waterbath pada suhu 90° C selama 15 menit.
 - 2) Kemudian meletakkannya di inkubator selama 24 jam pada suhu 37° C.
 - 3) Mengulangi perlakuan tersebut sampai 3 kali.
10. Menanam kembali air rebusan daun binahong yang sudah melalui proses tindalisasi di media NAP dan menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37° C.
11. Membuat konsentrasi 100%, 75%, 50%, 25%, dan 10% Pz steril, yaitu

- Konsentrasi 100% :Pada tabung 1 di isi 1 ml air rebusan daun binahong awal, itu sebagai konsentrasi 100% .
- Konsentrasi 75% :Pada tabung 2 di isi 0,25 ml Pz steril ditambahkan air rebusan daun binahong konsentrasi 100% sebanyak 0,75 ml, dihomogenkan.
- Konsentrasi 50% :Pada tabung 3 diisi 0,50 ml Pz steril ditambahkan air rebusan daun binahong konsentrasi 100% sebanyak 0,50 ml, dihomogenkan.
- Konsentrasi 25% :Pada tabung 4 diisi 0,75 ml Pz steril ditambahkan air rebusan daun binahong konsentrasi 100% sebanyak 0,25 ml, dihomogenkan.

3.5.8 Prosedur pembuatan media *Manitol Salt Agar* (MSA)

1. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
2. Melakukan perhitungan terhadap jumlah bahan atau media MSA yang dibutuhkan.
3. Melakukan penimbangan bahan sesuai dengan yang diperlukan menggunakan timbangan.
4. Mengukur volume aquadest yang di butuhkan yaitu sebanyak 300 ml dengan gelas ukur.
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang tadi dengan aquadest yang sudah diukur volumenya ke dalam erlenmeyer.
6. Memanaskannya diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih.

7. Mengangkat media yang sudah larut sempurna dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suhunya hangat.
8. Mengukur pH nya dengan cara menambahkan NaOH 0,1 N jika terlalu asam dan menambahkan HCl 0,1 N jika terlalu basa sampai pH nya 7,4.
9. Menutup media yang ada di erlenmeyer dengan kapas berlemak dan koran serta mengikatnya. Menyeterilisasi larutan tersebut bersama dengan plate yang dibutuhkan di autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
10. Setelah turun dari Autoclave, tuang media ke dalam plate \pm 15ml (Laporan praktikum media, 2009)

3.5.9 Prosedur Pemeriksaan Sampel

Hari pertama pemeriksaan :

1. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
2. Menyalakan api spirtus dengan korek api.
3. Melabeli masing-masing tabung sesuai dengan konsentrasinya, yaitu konsentrasi 100%, 75%, 50%, 25% dan 0% atau C (Control).
4. Memanaskan ose bulat diatas nyala api spirtus, mengambil suspensi kuman *Staphylococcus aureus* sebanyak 1 mata ose dan membiakkannya di tabung berlabel 100% dengan cara menggesekkan (Streaking) ose di dinding permukaan media cair sebanyak 3 kali. Kemudian mengambil lagi 1 mata ose kuman *Staphylococcus aureus* pada suspensi kuman dan membiakkannya pada tabung berlabel 75%, begitu seterusnya sampai pada tabung C. Semua perlakuan dilakukan secara steril dekat dengan api.
7. Menutup kembali tabung dengan kapas berlemak.
8. Inkubasi di inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

Hari kedua :

1. Mengamati masing-masing tabung, apakah terjadi kekeruhan atau tidak.
2. Mengambil Konsentrasi terkecil yang mulai terlihat keruh, dan menguji kembali ke media padat *Manitol Salt Agar* (MSA), dengan tujuan memastikan apakah kuman tersebut adalah *Staphylococcus aureus*.
3. Memanaskan ose bulat diatas nyala api spirtus, mengambil 1 mata ose kuman yang ada pada konsentrasi terkecil tadi.
4. Menanamnya di media padat dengan cara menggoreskannya dipermukaan media.
5. Inkubasi kembali di inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

Hari ketiga :

1. Mengamati hasilnya pada media padat apakah terbentuk koloni yang mengidentifikasi kuman tersebut adalah *Staphylococcus aureus*.
2. Mencatat konsentrasasi terkecil tadi sebagai daya hambat pertumbuhan kuman.
3. Mencatat hasil yang di amati sebagai data (Anonim, 1996).

3.6 Metode Analisis Data

Data yang diperoleh ditabulasikan sebagai berikut:

Tabel 3.1. Contoh tabulasi data

NO	KODE SAMPEL	KONSENTRASI				
		100%	75%	50%	25%	C
1	U1					
2	U2					
3	U3					
4	U4					
5	U5					
6	U6					

Dengan keterangan :

Posistif (+) : Mampu menghambat pertumbuhan kuman (jernih)

Negatif (-) : Tidak mampu menghambat pertumbuhan kuman (keruh)

Data yang diperoleh diuji menggunakan uji chi – square dengan tingkat kesalahan 5% (0,05).