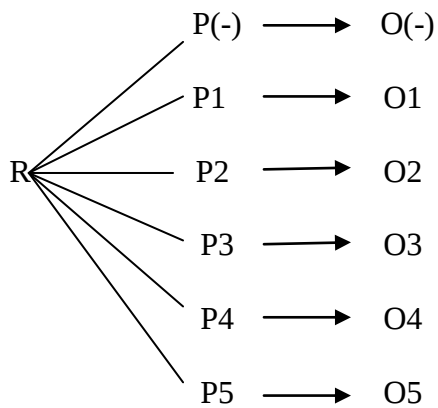


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan rancangan penelitian eksperimental laboratorium dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh air rebusan daun sambiloto terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Dengan rancangan penelitian sebagai berikut:



Gambar 3.1: Rancangan Penelitian (Zainuddin, 2003)

Keterangan:

R : Random

P(-) : Perlakuan tanpa pemberian air rebusan daun sambiloto

P1 : Perlakuan konsentrasi air rebusan daun sambiloto 100%

P2 : Perlakuan konsentrasi air rebusan daun sambiloto 95%

P3 : Perlakuan konsentrasi air rebusan daun sambiloto 90%

P4 : Perlakuan konsentrasi air rebusan daun sambiloto 85%

P5 : Perlakuan konsentrasi air rebusan daun sambiloto 80%

- O(-) : Observasi setelah perlakuan control
- O1 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 100%
- O2 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 95%
- O3 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 90%
- O4 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 85%
- O5 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 80%

3.2 Populasi Dan Sampel

3.2.1 Populasi

Dalam penelitian ini populasi yang diambil adalah daun tanaman sambiloto saat mulai berbunga dipilih langsung dari pohonnya di Desa Lemahbang, Kecamatan Singojuruh, Kabupaten Banyuwangi pada bulan Mei.

3.2.2 Sampel

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

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

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 15 + 4$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 19 / 4 = 4,75$$

$$n \sim 5 \text{ (Zainuddin, 2003)}$$

Keterangan:

n : Jumlah sampel

k : Perlakuan

Jadi jumlah pengulangan sebanyak 5 kali.

3.3 Lokasi dan Waktu penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Desa Lemahbang Kecamatan Singojuruh-Banyuwangi, sedangkan pemeriksaan dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Februari sampai Juli 2013, sedangkan Waktu pemeriksaan dilakukan pada bulan Mei 2013.

3.4 Variabel dan Definisi Oprasional

3.4.1 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Air rebusan daun sambiloto (*Andrographis paniculata nees*)
2. Variabel terikat : Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.
3. Variabel kontrol : Lama Inkubasi, suhu, jumlah suspensi kuman *Staphylococcus aureus*

3.4.2 Definisi Operasional

1. Air rebusan daun sambiloto didapatkan dari 100 gr daun sambiloto dengan 100 ml air, kemudian direbus selama 10 menit dan air rebusan daun sambiloto dikategorikan menjadi berbagai macam konsentrasi, yaitu: 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, dan 0% (kontrol).
2. Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ditetapkan berdasarkan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yang tumbuh setelah inkubasi selama 24 jam 37°C pada media MSA (Manitol Salt Agar).

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh dengan cara observasi tidak langsung, yaitu dengan melalui uji Laboratorium. Pemeriksaan pertumbuhan bakteri *S.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 dan diamati ada 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 MIC (*Minimum inhibition concentration*) (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, kaki tiga |
| 5. Mortar + Mortir | 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 sambiloto
2. Suspensi kuman *Staphylococcus aureus*
3. Aquades steril
4. Media NA
5. Pz steril
6. Media 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 *Staphylococcus aureus*

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:
 - a. Membuat perbandingan antara BaCl 1% : H₂SO₄ 1 % sebesar 1 : 9

- b. Memipet 0,1 ml BaCl 1 % + 9,9 ml H₂SO₄ 1 %
- c. Menghomogenkan dengan cara mengkocok pelan tabung

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

3. Prosedur membuat suspensi kuman, yaitu:

- a. Mengisi tabung steril dengan pz $\pm$ 5 ml.
- b. Mengambil kuman dari biakan *Staphylococcus aureus* murni yang sudah ditanam di media NAS dengan lidi kapas steril.
- c. Menyelupkan lidi kapas steril yang sudah ada kumannya pada tabung yang berisi pz.
- d. Membandingkan warna suspensi kuman dengan Mc Farlan I.
- e. 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 150 juta, maka dilakukan pengenceran dengan cara:

- 1. Menyiapkan tabung steril.
- 2. Memipet 5 ml Pz steril dan 5 ml suspensi kuman Mc Farlan I tadi.
- 3. Menghomogenkan tabung dengan cara dikocok perlahan-lahan.
- 4. Suspensi kuman dengan jumlah kuman tiap ml nya 150 juta siap digunakan (Soemarno, 2000).

Menstandartkan ose yang akan dipakai dalam penelitian:

- 1. Menyiapkan pipet 0.1 ml dan filer serta tabung
- 2. Memipet aquadest 0.1 ml, kemudian menuangnya kedalam tabung

3. Menyalakan api spiritus
4. Mengambil 1 mata ose air yang sudah dituang kedalam tabung dan kemudian memanaskan ose tersebut di atas api spiritus, lakukan berulang- ulang sampai air dalam tabung habis.
5. Didapatkan 71 mata ose air tersebut habis.

$$\frac{0,1 \text{ ml}}{71} = \frac{1}{710}$$

1 mata ose = 211.267 kuman (bila suspense kuman permililiternya 150 juta kuman).

1 mata ose = 297 kuman (bila suspense kuman 211.267)

3.5.6 Prosedure Pembuatan Media NAP

1. Melakukan perhitungan media NAP (Nutrient Agar)

Membuat NAP 6 plate, @ plate $\pm$ 17 ml

$$\text{Komposisi NA } 20 \text{ gr per } 1 \text{ liter} \rightarrow \frac{20 \text{ gr} \times 102 \text{ ml}}{1000} = 2,04 \text{ gr}$$

2. Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan.
3. Menimbang bahan (media NA) sesuai dengan perhitungan menggunakan timbangan.
4. Mengukur volume aquadest 102 ml menggunakan gelas ukur.
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest yang sudah diukur volumenya dalam Erlenmeyer.
6. Memanaskan larutan diatas api spiritus 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 atm selama 15 menit.
10. Setelah turun dari autoclave, menuangkannya ke dalam plate yang steril sampai rata.
11. Didiarkannya sampai terlihat padat dan menyimpannya ke almari es.

3.5.7 Prosedure Pembuatan Konsentrasi Air Rebusan Daun Sambiloto

1. Memetik daun tanaman sambiloto saat mulai berbunga dari pohonnya.
2. Mencuci daun sampai bersih dan yang terakhir dicuci dengan aquadest steril.
3. Menimbang daun sesuai dengan kebutuhan.
4. Merebus daun sambiloto selama 10 menit.
5. Menyaring air rebusan daun sambiloto 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 sambiloto tadi sudah benar – benar steril. Namun jika pada media NAP terdapat pertumbuhan kuman berarti perlu dilakukan proses tindalisasi, yaitu:

- a. Memanaskan air rebusan daun sambiloto dengan waterbath pada suhu 90°C selama 30 menit.
 - b. Kemudian meletakkannya di inkubator selama 24 jam pada suhu 37° C.
 - c. Mengulangi perlakuan tersebut sampai 3 kali.
10. Menanam kembali air rebusan daun sambiloto yang sudah melalui proses tindalisasi di media NAP dan menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37°C.
11. Membuat konsentrasi 100%, 95%, 90%, 85%, dan 80% Pz steril, yaitu :
- Konsentrasi 100% : Pada tabung 1 mengisi 1 ml air rebusan daun sambiloto awal, itu sebagai konsentrasi 100%.
- Konsentrasi 95% : Pada tabung 2 mengisi 0,05 ml Pz steril menambahkan air rebusan daun sambiloto konsentrasi 100% sebanyak 0,95 ml, menghomogenkan.
- Konsentrasi 90% : Pada tabung 3 mengisi 0,1 ml Pz steril menambahkan air rebusan daun sambiloto konsentrasi 100% sebanyak 0,9 ml, menghomogenkan
- Konsentrasi 85% : Pada tabung 4 mengisi 0,15 ml Pz steril menambahkan air rebusan daun sambiloto konsentrasi 100% sebanyak 0,85 ml, menghomogenkan
- Konsentrasi 80% : Pada tabung 5 mengisi 0,2 ml Pz steril menambahkan air rebusan daun sambiloto konsentrasi 100% sebanyak 0,8 ml, menghomogenkan
- Konsentrasi 0% : Pada tabung 11 mengisi 1 ml Pz steril.
- (Sumber : Rendy, 2012)

3.5.8 Prosedure pembuatan media MSA (Manitol Salt Agar)

1. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
2. Melakukan perhitungan terhadap jumlah bahan / media MSA yang dibutuhkan

Membuat MSA 15 plate, @ plate 17 ml

$$\text{Komposisi MSA 108 gr per 1 liter} \longrightarrow \frac{108 \text{ gr} \times 255 \text{ ml}}{1000} = 27,54$$

3. Melakukan penimbangan bahan sesuai dengan yang diperlukan menggunakan timbangan.
4. Mengukur volume aquadest yang di butuhkan yaitu sebanyak 255 ml dengan gelas ukur.
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang tadi dengan aquadest yang sudah diukur volumenya ke dalam Erlenmeyer.
6. Memanaskannya diatas api spiritus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih.
7. Mengangkat larutan yang sudah larut sempurna dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam – suam kuku.
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 7.2- 7.4.
9. Menutup larutan yang ada di erlenmeyer dengan kapas berlemak dan koran serta mengikatnya
10. Menyeterilisasi larutan tersebut bersama dengan plate yang dibutuhkan di autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
10. Setelah turun dari autoclave, menuangkannya ke dalam plate yang steril sampai rata.

11. Menuang larutan tadi ke dalam plate. Masing – masing plate $\pm$ 17 ml secara steril dekat dengan api (Sumber : Rendy,2012).

3.5.9 Prosedur Pemeriksaan Sampel

Hari pertama :

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%, 95%, 90%, 85%, 80%, 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 ose didinding permukaan media cair sebanyak 3 kali. Kemudian mengambil lagi 1 mata ose kuman *Staphylococcus aureus* pada suspensi kuman dan membiakkannya pada tabung berlabel 90%, begitu seterusnya sampai pada tabung Control. Semua perlakuan dilakukan secara steril dekat dengan api.
5. Menutup kembali tabung dengan kapas berlemak.
6. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Sumber : Rendy, 2012).

Hari kedua :

1. Mengamati masing-masing tabung, apakah terjadi kekeruhan atau tidak.
2. Karena kekeruhan sulit dilihat secara visual maka menguji kembali ke media padat (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 masing – masing konsentrasi.

4. Menanam di media padat dengan cara menggoreskannya dipermukaan media.
5. Inkubasi kembali pada suhu 37°C selama 24 jam (Sumber : Rendy,2012).

Hari ketiga :

1. Mengamati hasilnya pada media padat apakah terbentuk koloni yang mengidentifikasi kuman tersebut adalah *Staphylococcus aureus*.
2. Mencatat konsentrasinya terkecil tadi sebagai daya hambat pertumbuhan kuman dengan menghitung koloni.
3. Mencatat hasil yang di amati sebagai data (Sumber: Rendy, 2012).

3.6 Tabulasi Data

Data yang diperoleh ditabulasikan sebagai berikut:

Tabel 3.1 : Contoh tabulasi data

No	Kode Sampel	Jumlah Koloni <i>Staphylococcus aureus</i> dari konsentrasi air rebusan daun sambiloto yang tumbuh pada media MSA					
		100%	95%	90%	85%	80%	Kontrol (+)
1.	U ₁						
2.	U ₂						
3.	U ₃						
4.	U ₄						
5.	U ₅						
Jumlah							
Rata-rata							

3.7 Metode Analisis Data

Data yang diperoleh diuji menggunakan uji Kruskal-Wallis dengan tingkat kesalahan 5% (0,05).