

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian ini mencakup bidang Ilmu Mikrobiologi.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada dua laboratorium yaitu Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang. Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Mei-Juni 2018.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental dengan desain penelitian *post test control group design*. Subjek penelitian dibagi menjadi enam kelompok yaitu satu kelompok kontrol negatif, satu kontrol positif dan empat kelompok perlakuan. Tiap kelompok terdiri dari 6 sampel. Kelompok kontrol positif merupakan bakteri yang diberi kertas disk antibiotik yang berespon positif terhadap *Staphylococcus aureus* resisten metisilin yakni tetrasiklin, kelompok kontrol negatif merupakan bakteri yang diberi kertas disk kosong dan kelompok percobaan ialah bakteri yang diberikan kertas disk yang telah ditetesi ekstrak daun kedondong laut dengan konsentrasi bertingkat. Data sensitifitas *Staphylococcus aureus* resisten metisilin terhadap ekstrak daun kedondong laut diperoleh dengan mengukur besarnya diameter zona hambat yang dihasilkan.

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini meliputi koloni *Staphylococcus aureus* resisten metisilin.

3.4.2 Sampel Penelitian

Isolat *Staphylococcus aureus* resisten metisilin yang berhasil diisolasi dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

3.4.2.1 Kriteria Inklusi

Koloni *Staphylococcus aureus* resisten metisilin yang tumbuh pada media agar Mueller Hinton dengan perlakuan dan inkubasi 34°C.

3.4.2.2 Kriteria Eksklusi

Adanya pertumbuhan jamur atau kontaminan lain pada media agar Mueller Hinton.

3.4.2.3 Kriteria Drop out

Adanya sampel yang zona hambatnya tidak dapat diukur dikarenakan batasnya yang tidak tegas ataupun tidak jernih sempurna.

3.4.3 Cara Sampling

Pada penelitian ini sampel homogen sehingga tidak dilakukan randomisasi.

3.4.4 Besar Sampel

Besar sampel dihitung dengan rumus Federer, dengan perhitungan sebagai berikut :

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

Keterangan :

t = Jumlah perlakuan

n = Jumlah sampel

Penelitian ini menggunakan 4 kelompok perlakuan terdiri dari:

- a. Kelompok I : bakteri+ ekstrak daun kedondong konsentrasi 25%
- b. Kelompok II : bakteri+ekstrak daun kedondong konsentrasi 50%
- c. Kelompok III : bakteri+ekstrak daun kedondong konsentrasi 75%
- d. Kelompok IV : bakteri+ekstrak daun kedondong konsentrasi 100%

Sehingga : $(t-1)(n-1) \geq 15$

$$(4-1)(n-1)$$

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

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Besar sampel minimal pada penelitian ini dengan menggunakan rumus Federer didapatkan jumlah minimal sampel per kelompok adalah 6 sampel. Pada penelitian ini menggunakan 9 sampel kertas disk tiap kelompok perlakuan untuk mengantisipasi *drop out* dengan jumlah kelompok perlakuan sebanyak 4 kelompok dan kelompok kontrol negatif dan kontrol positif sehingga jumlah seluruh sampel penelitian sebanyak 36 sampel kertas disk.

3.5 Variabel penelitian

3.5.1 Variabel bebas

Konsentrasi ekstrak daun kedondong laut (*Polyscias fruticosa*)

3.5.2 Variabel terikat

Zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus* resisten metisilin yang tercipta di sekeliling kertas disk.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Satuan	Skala
1	Ekstrak daun kedondong laut	Ekstrak berasal dari daun kedondong laut yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dengan metode maserasi. Konsentrasi yang digunakan adalah konsentrasi bertingkat 25%, 50%, 75%, dan 100% ekstrak daun kedondong laut yang yang diencerkan menggunakan NaCl 0,9% diteteskan pada kertas disk, diletakkan pada media Mueller Hinton yang telah diusapkan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> resisten metisilin.	Persen (%)	Ordinal
2	Diameter zona hambat (mm) pada pertumbuhan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> resisten metisilin.	Penghambatan terhadap pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i> resisten metisilin, yaitu zona hambatan akan terlihat sebagai daerah jernih di sekitar kertas cakram yang mengandung zat antibakteri.	Mm	Rasio

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan

- Daun kedondong laut (*Polyscias fructicosa*)
- Etanol 96%
- Isolat bakteri *Staphylococcus aureus* resisten metisilin.
- Media agar Mueller Hinton

3.7.2 Alat

- Cawan petri
- Evaporator
- Kertas disk
- Neraca analitik
- Blender
- Tabung reaksi
- Erlenmeyer
- Jarum ose
- Baskom plastik
- Lampu bunsen
- Pinset
- Inkubator
- Rak tabung reaksi
- Mikropipet
- *Blue tip* dan *yellow tip*
- Plate agar
- Mistar

- *Vortex*

- *Laminar air flow*

3.7.3 Cara Kerja

3.7.3.1 Sterilisasi Alat

1. Menyiapkan alat-alat yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri yang telah dicuci terlebih dahulu hingga bersih.
2. Membungkus alat-alat yang telah dicuci dengan kertas dan disterilkan dalam autoklaf selama kurang lebih 2 jam pada suhu 170 °C, sedangkan ose disterilkan dengan memanaskannya pada api sesaat sebelum digunakan.

3.7.3.2 Ekstraksi Bahan

1. Daun kedondong laut sebanyak 1 kilogram diekstraksi dengan 3 liter etanol 96% dalam bejana maserasi.
2. Kemudian didiamkan selama 3-10 hari di tempat yang sejuk dan terlindung dari cahaya sambil dilakukan pengadukan beberapa kali, hasil maserasi disaring menggunakan corong *Buchner*.
3. Mengambil filtrat hasil penyaringan, kemudian filtrat diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 60°C sampai etanol menguap dan tersisa ekstrak berair saja.
4. Untuk menghilangkan air, dilakukan pemanasan di atas *waterbath*, suhu dijaga kurang dari 60°C hingga didapatkan ekstrak kental. Selanjutnya ekstrak kental yang diperoleh ditimbang dan dihitung rendemennya.

3.7.3.3 Pembuatan Sediaan Ekstrak Konsentrasi Bertingkat

1. Untuk pembuatan ekstrak kedondong laut konsentrasi 100% (P4) menggunakan 5 ml ekstrak daun kedondong laut tanpa diberi larutan NaCl 0,9%. Kemudian meneteskan 2 μ L ekstrak pada setiap disk perlakuan sebanyak 6 disk.
2. Untuk pembuatan ekstrak kedondong laut konsentrasi 75% (P3) menggunakan 3,75 ml ekstrak daun kedondong laut dan diberi larutan NaCl 0,9% sebanyak 1,25 ml. Lalu dihomogenkan dengan menggunakan *vortex*. Kemudian meneteskan 2 μ L ekstrak pada setiap disk perlakuan sebanyak 6 disk.
3. Untuk pembuatan ekstrak kedondong laut konsentrasi 50% (P2) menggunakan 2,5 ml ekstrak daun kedondong laut dan diberi larutan NaCl 0,9% sebanyak 2,5 ml. Lalu dihomogenkan dengan menggunakan *vortex*. Kemudian meneteskan 2 μ L ekstrak pada setiap disk perlakuan sebanyak 6 disk.
4. Untuk pembuatan ekstrak kedondong laut konsentrasi 25% (P1) menggunakan 1,25 ml ekstrak daun kedondong laut dan diberi larutan NaCl 0,9% sebanyak 3,75 ml. Lalu dihomogenkan dengan menggunakan *vortex*. Kemudian meneteskan 2 μ L ekstrak pada setiap disk perlakuan sebanyak 6 disk.

3.7.3.4 Uji Sensitifitas : Metode Difusi Kirby Bauer

1. Larutan agar Mueller Hinton dituangkan pada cawan petri yang telah disterilkan terlebih dahulu kemudian ditunggu beberapa menit hingga

larutan agar Mueller Hinton mengeras.

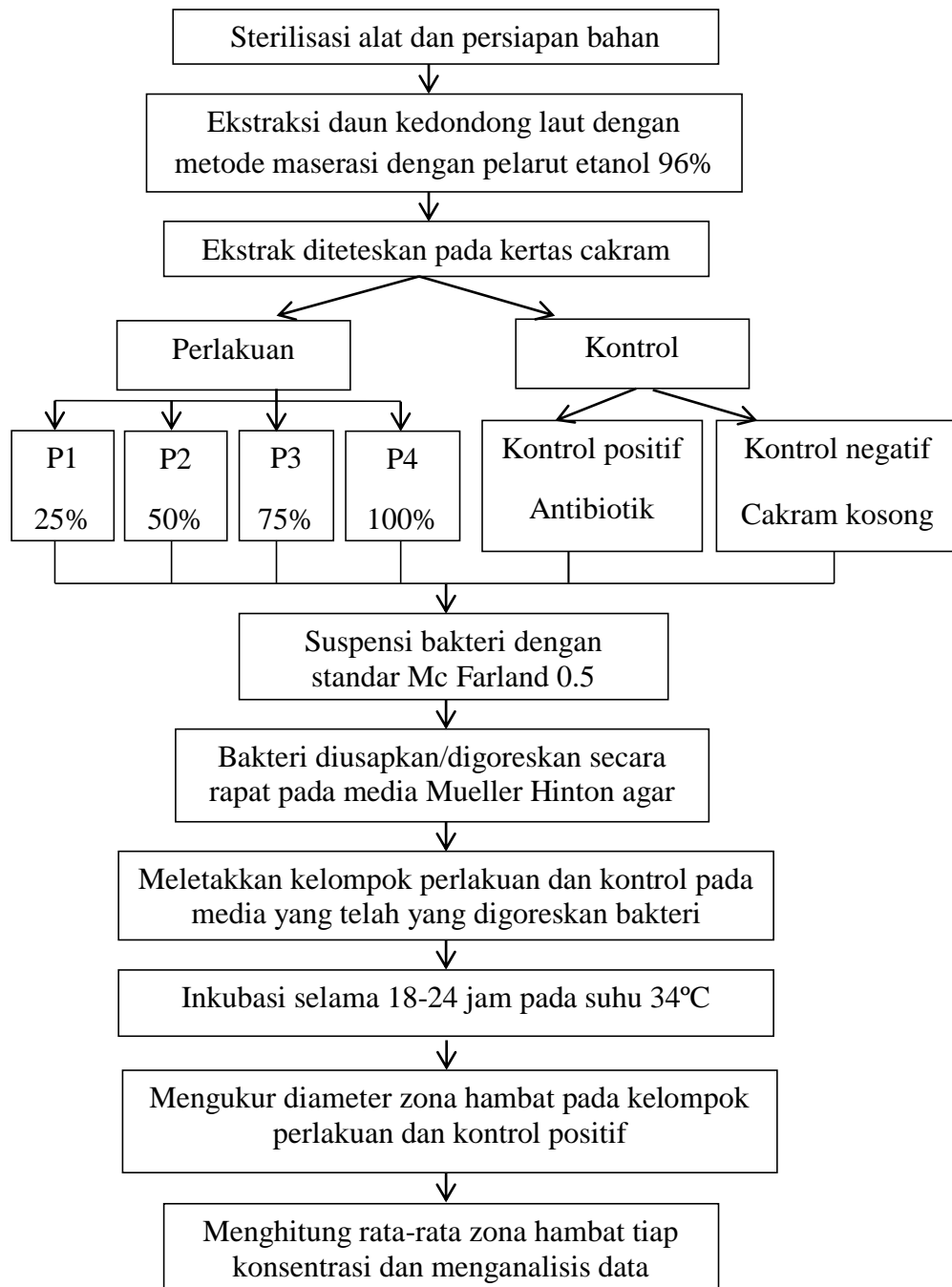
2. Bakteri diambil dengan menggunakan ose, kemudian dibuat suspensi dalam larutan NaCl 0,9%.
3. Suspensi bakteri disesuaikan dengan standar kekeruhan Mc Farland 0,5.
4. Suspensi bakteri diambil menggunakan kapas steril.
5. Kemudian bakteri tersebut diusapkan ke seluruh permukaan agar Mueller Hinton dengan menggunakan kapas steril.
6. Lalu diletakkan disk antibiotik dan disk yang telah ditetesi ekstrak daun kedondong laut dengan konsentrasi yang berbeda pada media yang telah ditanami *Staphylococcus aureus* resisten metisilin.
7. Sediaan ini diinkubasi ke dalam inkubator pada suhu 34°C selama 18 jam.
8. Setelah inkubasi, daerah bening yang terbentuk di sekitar kertas disk diukur diameternya, sebagai diameter zona hambat ekstrak daun kedondong laut terhadap pertumbuhan bakteri uji.
9. Diameter zona hambat ekstrak daun kedondong laut dan antibiotik kontrol.

3.7.3.5 Pengambilan Data

Data dikumpulkan berdasarkan hasil uji eksperimental di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Data sensitifitas *Staphylococcus aureus* resisten metisilin terhadap ekstrak daun

kedondong laut diperoleh dengan mengukur besarnya diameter zona hambat yang tercipta.

3.8 Alur Penelitian



3.9 Analisa Data

Pengolahan data dilakukan dengan berbagai tahap yaitu : 1) *Coding* yaitu data diberi kode yang sesuai dengan kriteria masing-masing variabel. 2) *Entry* yaitu memasukkan data ke dalam program komputer SPSS versi 24 for Windows. 3) *Editing* atau koreksi meliputi kelengkapan jawaban dan tulisan yang kurang jelas. 4) *Cleaning*

Analisis data menggunakan uji komparatif dan uji analisis *post-hoc*. Uji Saphiro Wilk untuk menguji apakah distribusi normal atau tidak. Uji Kruskal Wallis dapat digunakan untuk menguji hipotesis dengan distribusi tidak normal. Dilanjutkan dengan uji *post-hoc*, uji analisis Mann Whitney U digunakan untuk membandingkan perbedaan antar kelompok perlakuan. Setelah itu dilakukan interpretasi, yaitu mengartikan hasil analisis yang diperoleh.

3.10 Etika Penelitian

Penelitian dilaksanakan setelah mendapat *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro-RSUP Dr. Kariadi Semarang pada tanggal 9 Juli 2018 dengan No. 70/EC/H/FK-RSDK/VI/2018.

3.11 Jadwal Penelitian

Tabel 3. Jadwal penelitian

No	Kegiatan	Maret				April				Mei				Juni				Juli				
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
1	Studi Literatur																					
2	Penyusunan Proposal																					
3	Seminar Proposal																					
4	Ethical Clearance																					
5	Penelitian																					
6	Penulisan Laporan																					
7	Seminar Hasil																					