

BAB 3
METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak bunga mawar terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Dengan rancangan sebagai berikut :

Random	Perlakuan	Post test
Kelompok P(0) →	-	O(0)
Kelompok P(1) →	X	O(1)
Kelompok P(2) →	X	O(2)
Kelompok P(3) →	X	O(3)
Kelompok P(4) →	X	O(4)
Kelompok P(5) →	X	O(5)
Kelompok P(6) →	X	O(6)
Kelompok P(7) →	X	O(7)
Kelompok P(8) →	X	O(8)
Kelompok P(9) →	X	O(9)
Kelompok P(10) →	X	O(10)

Tabel 3.1 Rancangan Penelitian (Notoatmojo,2010)

Keterangan :

Kelompok P(0) : Tidak diberi perlakuan

Kelompok P(1) : Perlakuan konsentrasi perasan bunga mawar 10 %

Kelompok P(2) : Perlakuan konsentrasi perasan bunga mawar 20%

Kelompok P(3) : Perlakuan konsentrasi perasan bunga mawar 0 %

Kelompok P(4) : Perlakuan konsentrasi perasan bunga mawar 40%

Kelompok P(5) : Perlakuan konsentrasi perasan bunga mawar 50%

Kelompok P(6) : Perlakuan konsentrasi perasan bunga mawar 60%

Kelompok P(7) : Perlakuan konsentrasi perasan bunga mawar 70%

Kelompok P(8) : Perlakuan konsentrasi perasan bunga mawar 80%

Kelompok P(9) : Perlakuan konsentrasi perasan bunga mawar 90%

Kelompok P(10): Perlakuan konsentrasi perasan bunga mawar 100%

3.2 Populasi Dan Sampel

3.2.1 Populasi

Bakteri *Staphylococcus aureus* yang ditumbuhkan, berasal dari biakan murni yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK).

3.2.2 Sampel

Sampel diambil dari bakteri *Staphylococcus aureus* yang ditumbuhkan dari biakan murni, sedangkan jumlah sampel diperoleh dari rumus sebagai berikut:

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

$$(r - 1) (11 - 1) \leq 15$$

$$(r - 1) (10) \leq 15$$

$$10r - 10 \leq 15$$

$$10r \geq 15 + 10$$

$$r \geq 3$$

$$r \sim 3$$

jadi jumlah pengulangannya sebanyak 3 kali

(Hidayat,2010)

Keterangan:

r : Jumlah replikasi (pengulangan) adalah jumlah sampel

t : banyak kelompok perlakuan

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan (FIK) Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2017 sampai dengan bulan Juli 2017. Sedangkan waktu pemeriksaan dilaksanakan pada bulan Mei 2017.

3.4 Variabel dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas : Konsentrasi perasan bunga mawar

Variabel terikat : Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

Variabel kontrol : Lama inkubasi, suhu, jumlah suspensi kuman
Staphylococcus aureus, volume perasan

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

1. Konsentrasi perasan bunga mawar dikategorikan menjadi 100%,90%,80%,70%,60%,50%,40%,30%,20%,10%,0% (Kontrol).
2. Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dalam penelitian ini ditetapkan berdasarkan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yang tumbuh setelah inkubasi 24 jam dalam suhu 37°C pada media *Manitol Salt Agar* (MSA).

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh dengan cara observasi atau pengamatan melalui pengujian laboratorium. Langkah-langkah pemeriksaannya diantaranya sebagai berikut :

3.5.1 Prinsip Pemeriksaan

Senyawa antibakteri diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi. Kemudian macam-macam konsentrasi ditambahkan suspensi uji dalam media cair.

Mengamati ada dan tidaknya pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* setelah diberi perlakuan perasan bunga mawar dengan berbagai konsentrasi dan ditanam di media MSA. Pertumbuhan dilihat setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.5.2 Prosedur

3.5.2.1 Prosedur Pembuatan Standart Mac Farland 1

1. Alat

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

1. Bahan

Bahan yang digunakan adalah : BaCl 1% , H₂SO₄ 1%, HCl, NaOH, Aquadest steril.

2. Prosedur

Prosedur membuat standart Mac Farland I, yaitu:

1. Menyiapkan tabung steril lalu membuat perbandingan antara BaCl 1% :

H₂SO₄ 1% sebesar 1:9

2. Memipet 0,1 ml BaCl 1% + 9,9ml H₂SO₄ 1%

3. Menghomogenkan dengan cara kocok pelan tabung

3.5.2.2 Prosedur pembuatan suspense kuman

1. Alat

Alat yang digunakan adalah Tabung steril, Ose bulat.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah Pz steril, biakan murni *Staphylococcus aureus*

3. Prosedur

Prosedur pembuatan suspense kuman, yaitu :

1. Menyiapkan tabung steril lalu masukkan pz (NaCL 0,85%) steril.
2. Mengambil kuman dari biakan *Staphylococcus aureus* murni yang sudah ditanam di media NAS dengan ose steril
3. Menyelupkan ose steril yang sudah ada kumannya pada tabung yang berisi Pz
4. Membandingkan warna suspense kuman dengan standart Mc Farland 1
5. Apabila warna keruh, maka menambahkan kuman dengan ose steril dan apabila terlalu keruh menambahkan Pz hingga warnanya sama dengan standart Mc Farland 1.

3.5.2.3 Prosedur standarisasi ose yang akan dipakai dalam penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan adalah : Ose bulat, push ball, tabung, Bunsen

2. Bahan

Bahan yang digunakn adalah : Aquadest

3. Prosedur

Prosedur standarisasi ose yaitu :

1. Menyiapkan pipet 0,1 ml dan push ball serta tabung
2. Memipet aquadest 0,1 kkemudian menuangnya ke dalam tabung dan kemudian memanaskan ose tersebut dengan api spirtus, lakukan berulang-ulang sampapi air dalam tabung habis
3. Didapatkan 47 mata ose air tersebut habis.

3.5.2.4 Prosedur Pembuatan Media Nutrient Agar Plate (NAP)

1. Alat

Alat yang digunakan adalah plate, timbangan analitik, cawan petri, pipet Pasteur, autoclave, kain kasa steril (penyaring), pemanas air (waterbath), incubator, gelas ukur, pengaduk, rak tabung, api spirtus, kaki tiga, push ball, enlemeyer, ose, pipet ukur dan kertas PH

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah reagen NAP, aquadest steril, NaOH, HCl

3. Prosedur

Prosedur pembuatan media nutrient agar plate (NAP), yaitu :

1. Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan
2. Melakukan perhitungan media NA (nutrient agar)
3. Menimbang media NA menggunakan timbangan analitik
4. Melakukan perhitungan Media *Nutrien Agar* (NA)

Membuat NAP 4 plate, @plate ± 20 ml

$$\text{Komposisi NA 20 gr per 1 liter} \rightarrow \frac{20 \text{ gr} \times 80 \text{ ml}}{1000} = 1,6 \text{ gr}$$

5. Memasukkan sampel NA ke beaker glass lalu ditambahkan aquadest kemudian
6. Melarutkan sampel dengan cara dipanaskan sampai larut sempurna
7. Diamkan larutan hingga suam-suam

8. Mengukur pH sampai 7,4, jika terlalu asam menambahkannya dengan NaOH 0,1 N, sedangkan jika terlalu basa menambahkannya dengan HCl 0,1 N sampai pH 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
11. Mendinginkannya sampai terlihat padat dan menyimpannya ke lemari es.

3.5.2.5 Prosedur Pembuatan Media Manitol Salt Agar (MSA)

1. Alat

Alat yang digunakan adalah plate, timbangan analitik, cawan petri, pipet Pasteur, autoclave, kain kasa steril (penyaring), pemanas air (waterbath), incubator, gelas ukur, pengaduk, rak tabung, api spirtus, kaki tiga, push ball, enlemeyer, ose, pipet ukur dan kertas PH

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah reagen MSA, aquadest steril, NaOH, HCl

3. Prosedur

Prosedur pembuatan media manitol salt agar yaitu :

1. Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan
2. Melakukan perhitungan media MSA (manitol salt agar)
3. Menimbang media MSA menggunakan timbangan analitik
4. Membuat MSA 24 plate, @plate 20 ml

$$\text{Komposisi MSA 108 gr per 1 liter} \rightarrow \frac{108 \text{ gr} \times 480 \text{ ml}}{1000} = 51.84\text{gr}$$

5. Memasukkan sampel MSA ke beaker glass lalu ditambahkan aquadest
6. Melarutkan sampel dengan cara dipanaskan sampai larut sempurna
7. Diamkan larutan hingga suam-suam
8. Mengukur pH 7,2 - 7,4, jika terlalu asam menambahkannya dengan NaOH 0,1 N, sedangkan jika terlalu basa menambahkannya dengan HCl 0,1 N sampai pH 7,2 - 7,4 Menutup Erlenmeyer dengan kapas berlemak dan menyeterikannya dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit
9. Setelah turun dari autoclave, menuangkannya ke dalam plate yang steril
10. Mendinginkannya sampai terlihat padat dan menyimpannya ke lemari es.

3.5.3 Pembuatan Perasan Bunga Mawar

- a. Alat yang digunakan untuk membuat perasan bunga mawar
Erlenmeyer, corong, kertas saring, mortar, tabung, kasa steril, rak tabung, labu ukur, inkubator.
- b. Bahan yang digunakan untuk membuat ekstrak bunga mawar
Bunga mawar, Aquadest steril
- c. Teknik pengolahan perasan bunga mawar dalam penelitian
 1. Bunga mawar dicuci bersih, kemudian dibilas dengan aquadest steril
 2. Menimbang bunga mawar 100 gr
 3. Setelah itu ditumbuk sampai benar-benar halus.
 4. Menyaring bunga mawar yang sudah ditumbuk tadi dengan kasa berlapis yang steril, disaring sampai benar-benar jernih.

5. Mengambil 1 mata ose perasan yang sudah jernih secara steril, kemudian menanamnya ke media NAP, dengan cara menggoreskannya dipermukaan media.
6. Inkubasi 24 jam 37°C
7. Mengamati hasilnya, jika tidak terjadi pertumbuhan kuman berarti perasan bunga mawar tadi sudah benar-benar steril. Oleh karena terjadi pertumbuhan, maka dilanjutkan proses tidalisasi. yaitu :
 - a. Memanaskan perasan bunga mawar dengan waterbath pada suhu 90° C selama 15 menit
 - b. Kemudian meletakkannya di inkubator selama 24 jam pada suhu 37°
 - c. Mengulangi perlakuan tersebut sampai 3 kali
 - d. Menanam kembali perasan bunga mawar yang sudah melalui proses tidalisasi di media NAP dan menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37C
8. Membuat konsentrasi 10%, 20%,30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, dan Pz steril (0%), yaitu:

Konsentrasi 10% :Tabung 1 diisi 0,1 ml perasan awal (konsentrasi 100%)
ditambahkan 0,90 ml Pz steril kemudian
dihomogenkan.

Konsentrasi 20% :Tabung 2 diisi 0,2 ml perasan awal (konsentrasi 100%)
ditambahkan 0,80 ml Pz steril kemudian
dihomogenkan.

- Konsentrasi 30% :Tabung 3 diisi 0,3 ml perasan awal (konsentrasi 100%) ditambahkan 0,70 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
- Konsentrasi 40% :Tabung 4 diisi 0,4 ml perasan awal (konsentrasi 100%), ditambahkan 0,60 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
- Konsentrasi 50% :Tabung 5 diisi 0,5 ml perasan awal (konsentrasi 100%), ditambahkan 0,50 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
- Konsentrasi 60% :Tabung 6 diisi 0,6 ml perasan awal (konsentrasi 100%) ditambahkan 0,40 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
- Konsentrasi 70% :Tabung 7 diisi 0,7 ml perasan awal (konsentrasi 100%) ditambahkan 0,30 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
- Konsentrasi 80% :Tabung 8 diisi 0,8 ml perasan awal (konsentrasi 100%) ditambahkan 0,20 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
- Konsentrasi 90% :Tabung 9 diisi 0,9 ml perasan awal (konsentrasi 100%), ditambahkan 0,10 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
- Konsentrasi 100% :Tabung 10 diisi 1 ml perasan awal (konsentrasi 100%), kemudian dihomogenkan.

Konsentrasi 0% : Pada tabung k diisi 10 ml Pz steril tanpa diberi tambahan ekstrak bunga mawar.

3.5.4 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%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% dan 0% atau K (Kontrol).
4. Memanaskan ose bulat diatas nyala api spirtus, mengambil suspensi kuman *Staphylococcus aureus* pada satandard Mac Farland I sebanyak 1 mata ose dan mencampurkan suspensi ke dalam masing-masing konsentrasi secara acak.
5. Menutup kembali tabung dengan kapas berlemak
6. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Hari Kedua Pemeriksaan:

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*.

3.6 Metode Analisis Data

Data yang diperoleh diuji menggunakan uji Anova dengan tingkat kesalahan α (0,05).