

BAB 3

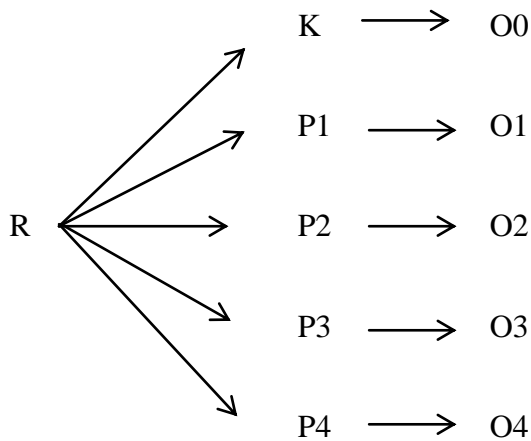
METODE PENELITIAN

3.1 Rancang Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh perasan daun yodium (*Jatropha multifida* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.1.1 Desain penelitian

Dalam penelitian ini desain penelitian yang digunakan adalah desain eksperimental, yaitu dengan menempatkan sasaran atau obyek pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Pengamatan dilakukan setelah ada perlakuan.



Gambar 3.1 Desain penelitian (Sholehah, 2014).

Keterangan :

- R : Random
- K : Pemberian perasan daun yodium dengan konsentrasi 0%
- P₁ : Pemberian perasan daun yodium dengan konsentrasi 100%
- P₂ : Pemberian perasan daun yodium dengan konsentrasi 50%
- P₃ : Pemberian perasan daun yodium dengan konsentrasi 75%
- P₄ : Pemberian perasan daun yodium dengan konsentrasi 25%
- O₀ : Hasil observasi pertumbuhan kuman tanpa adanya perlakuan 0%
- O₁ : Observasi setelah pemberian perasan daun yodium 100%
- O₂ : Observasi setelah pemberian perasan daun yodium 50%
- O₃ : Observasi setelah pemberian perasan daun yodium 75%
- O₄ : Observasi setelah pemberian perasan daun yodium 25%

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian**3.2.1 Populasi Penelitian**

Dalam penelitian ini, populasi yang diambil adalah dari biakan murni *Staphylococcus aureus* yang ditanam di media.

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* murni yang dipindah dari biakan murni di media NAS. Dalam penelitian terdapat 5 perlakuan. Setiap perlakuan dilakukan masing-masing 5 kali perlakuan yang diperoleh berdasarkan rumus Anggraeni (2008), hasil pengulangan sebagai berikut :

$$\begin{aligned}
 (r - 1) (t - 1) &\geq 15 \\
 (r - 1) (5 - 1) &\geq 15 \\
 (r - 1) 4 &\geq 15 \\
 4r - 4 &\geq 15 \\
 4r &\geq 15 + 4 \\
 r &\geq 4,75 \approx 5 \text{ (pengulangan)}
 \end{aligned}$$

keterangan :

r : jumlah replikasi (pengulangan)

t : banyak kelompok perlakuan

Sehingga seluruhnya terdapat 5 pengulangan x 5 perlakuan = 25 unit percobaan.

Setiap satu unit percobaan membutuhkan sampel sebanyak 1 mata ose suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*, setara dengan standart neflometer Mac Farland 1 yang mengandung bakteri 3×10^8 CFU/ml. Maka jumlah total bakteri dibutuhkan 3×10^8 CFU/ml x 25 plate.

3.3 Lokasi dan Waktu penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya, Jalan Sutorejo No.59 Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Januari sampai Mei 2015, sedangkan waktu pemeriksaan dilakukan pada bulan April 2015.

3.4 Variabel dan Definisi Oprasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas : Pemberian perasan daun yodium (*Jatropha multifida* L.)

Variabel terikat : Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Variabel kontrol : Lama inkubasi, suhu, jumlah suspensi kuman *Staphylococcus aureus*.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

1. Konsentrasi perasan daun yodium dikategorikan menjadi 100%, 75%, 50%, 25% dan 0% (kontrol).
2. Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yang tumbuh di media MSA (*Manitol Salt Agar*) dengan satuan CFU.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh dengan cara observasi tidak langsung, yaitu dengan melalui uji Laboratorium. Pemeriksaan jumlah koloni pada bakteri *Staphylococcus aureus* ini menggunakan metode perhitungan Angka Lempeng Total (ALT). 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. Mengamati ada dan tidaknya pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* setelah diberi perlakuan perasan daun yodium dengan berbagai konsentrasi dan ditanam di media MSA. Pertumbuhan dilihat setelah inkubasi pada suhu 37⁰ C selama 24 jam.

3.5.2 Pembuatan suspensi kuman *Staphylococcus aureus*

a. Alat yang digunakan untuk membuat suspensi kuman

Tabung reaksi, rak tabung, pipet ukur, ose bulat, api spirtus, filler, spuit.

b. Bahan yang digunakan untuk membuat suspensi kuman

Suspensi kuman *Staphylococcus aureus* dan Pz steril

c. Reagen yang digunakan untuk standart Mc Farlan I

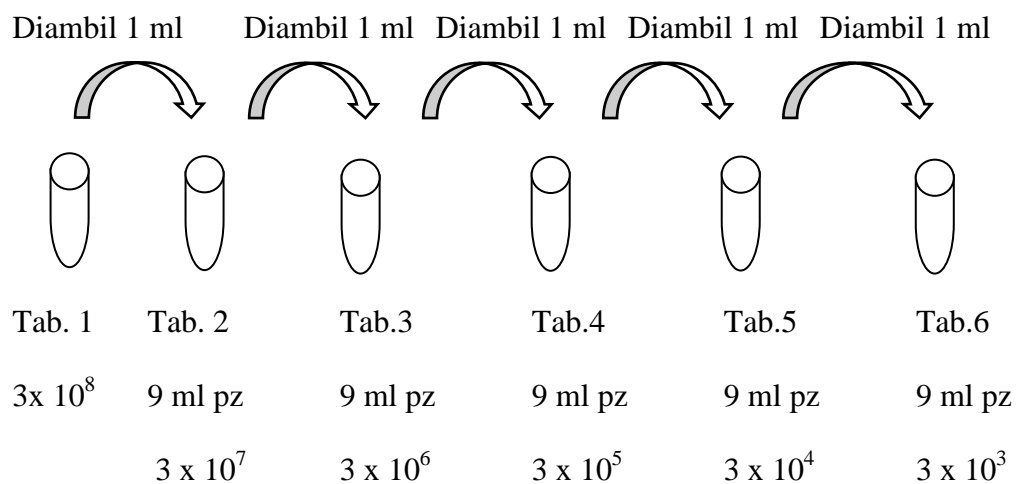
BaCl 1% dan H₂SO₄ 1%

d. Prosedur suspense kuman sesuai dengan metode Mc Farlan I:

1. Prosedur membuat standart Mc Farlan I yaitu:
 - a. Menyiapkan tabung steril lalu membuat perbandingan antara BaCl 1% : H₂SO₄ 1 % sebesar 1 : 90
 - b. Memipet 0,1 ml BaCl 1 % + 9,9 ml H₂SO₄ 1 %
 - c. Menghomogenkan dengan cara kocok pelan tabung

2. Prosedur membuat suspensi kuman, yaitu:
 - a. Menyiapkan tabung steril lalu masukkan pz (NaCl 0,85%) steril.
 - b. Mengambil kuman dari biakan *Staphylococcus aureus* murni yang sudah ditanam di media NAS dengan ose steril.
 - c. Menyelupkan ose steril yang sudah ada kumannya pada tabung yang berisi pz.
 - d. Membandingkan warna suspensi kuman dengan Mc Farlan 1.
 - e. Apabila warna kurang keruh, maka menambahkan kuman dengan ose steril dan apabila terlalu keruh menambahkan pz hingga warnanya sama dengan standart Mc Farlan I.
3. Pengenceran suspensi kuman
 - a. Setelah didapatkan kuman yang sesuai standart Mc Farlan I didapatkan hasil 1 : 300.000.000 (3×10^8 CFU/ml)
 - b. Mengencerkan suspensi kuman sehingga mendapatkan hasil 1 : 1000 (3×10^3 CFU/ml)

Prosedur pengenceran :



1. Mengambil suspensi kuman pada tabung pertama sebanyak 1 ml dari Stdandart Mc. Farland I (3×10^8 CFU/ml), memasukkan ke dalam tabung kedua dan menambahkan 9 ml Pz, itu setara dengan 3×10^7 CFU/ml
2. Mengambil suspensi kuman pada tabung kedua 1 ml dari pengenceran suspensi kuman 3×10^7 CFU/ml, memasukkan ke dalam tabung ketiga dan menambahkan 9 ml Pz, itu setara dengan 3×10^6 CFU/ml. Melanjutkan pengenceran seperti di atas sampai tabung terakhir (tabung 6). Sehingga tabung terakhir diperoleh hasil pengenceran 3×10^3 CFU/ml.
4. Menstandartkan ose yang akan dipakai dalam penelitian:
 - a. Menyiapkan pipet 0.1 ml dan filler serta tabung.
 - b. Memipet aquadest 0.1 ml, kemudian menuangnya ke dalam tabung.
 - c. Menyalakan api spirtus.
 - d. Mengambil 1 mata ose air yang sudah dituang ke dalam tabung dan kemudian memanaskan ose tersebut di atas api spirtus, lakukan berulang- ulang sampai air dalam tabung habis.
 - e. Didapatkan 10 mata ose air tersebut habis.

$$\frac{0,1ml}{10} = \frac{1}{100}$$

3.5.3 Prosedur pembuatan Media NAP (*Nutrien Agar Plate*)

a. Alat yang digunakan untuk membuat media NAP

Petridish steril, erlenmeyer, pipet pasteur, neraca triple beam balance, corong, gelas arloji, batang pengaduk, gelas ukur, api spirtus, inkubator.

b. Bahan yang digunakan untuk membuat media NAP

Media NA, aquadest, dan kertas indikator pH.

c. Reagen yang digunakan untuk penetral media

HCl 0,1 N dan NaOH 0,1 N.

d. Prosedur pembuatan NAP

1. Melakukan perhitungan media NA
2. Membuat media NAP 5 plate, @ plate \pm 17 ml
 Komposisi NA 20 gr per 1 liter $\rightarrow \frac{20 \text{ gr}}{1000} \times 85 \text{ ml} = 1.7 \text{ gr}$
3. Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan
4. Menimbang bahan (media NA) sesuai dengan perhitungan menggunakan timbangan neraca analitik
5. Mengukur volume aquadest 85 ml menggunakan gelas ukur
6. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest yang sudah diukur volumenya dalam erlenmeyer
7. Memanaskan larutan di atas api spiritus sampai larut sempurna, tidak sampai mendidih
8. Mengangkat larutan yang sudah dipanaskan dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan di baskom sampai suam – suam kuku
9. 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
10. Menutup Erlenmeyer dengan kapas berlemak dan menyeterilkannya dengan autoclave pada suhu 121 atm selama 15 menit

11. Setelah turun dari autoclave, menuangkannya ke dalam plate yang steril sampai rata
12. Mendinginkan sampai terlihat padat dan menyimpannya ke almari es.

3.5.4 Prosedur pembuatan Media MSA (*Manitol Agar Slant*)

a. Alat yang digunakan untuk membuat media MSA

Petridish steril, erlenmeyer, pipet pasteur, neraca triple beam balance, corong, gelas arloji, batang pengaduk, gelas ukur, api spirtus, inkubator.

b. Bahan yang digunakan untuk membuat media MSA

Media MSA, aquadest, dan kertas indikator pH.

c. Reagen yang digunakan untuk penetral media

HCl 0,1 N dan NaOH 0,1 N.

e. Prosedure pembuatan MSA

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

MSA 25 plate, @ plate 15 ml

Komposisi MSA 108 gr per 1 liter $\rightarrow \frac{108 \text{ gr}}{1000} \times 375 \text{ ml} = 40,5 \text{ gram}$

Melakukan penimbangan bahan sesuai dengan yang diperlukan menggunakan timbangan

3. Mengukur volume aquadest yang dibutuhkan yaitu sebanyak 375 ml dengan gelas ukur

4. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang tadi dengan aquadest yang sudah diukur volumenya ke dalam erlenmeyer
5. Memanaskan di atas api spiritus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih
6. Mengangkat larutan yang sudah larut sempurna dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan di baskom sampai suam – suam kuku
7. 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
8. Menutup larutan yang ada di erlenmeyer dengan kapas berlemak dan menyeterilisasi larutan tersebut bersama dengan plate yang dibutuhkan di autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit
9. Setelah turun dari autoclave, menuangkannya ke dalam plate yang steril sampai rata. Masing – masing plate 15 ml secara steril dekat dengan api.
10. Mendiampkannya sampai terlihat padat dan kemudian menyimpannya ke almari es

3.5.5. Prosedur pembuatan perasan daun yodium.

a. Alat yang digunakan untuk membuat perasan daun yodium

Erlenmeyer, blender, corong, kertas saring, mortar, tabung, kasa steril, rak tabung, inkubator.

b. Bahan yang digunakan untuk membuat perasan daun yodium

Daun yodium dan aquadest steril.

c. Teknik pengolahan daun yodium yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mencuci daun yodium sampai bersih dan terakhir dicuci dengan aquadest steril
2. Menimbang daun yodium 100 gram
3. Menghaluskan daun sampai halus menggunakan mortir atau blender
4. Menyaring 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. Menginkubasi selama 24 jam 37°C
7. Mengamati hasilnya, jika tidak terjadi pertumbuhan kuman berarti perasan daun yodium tadi sudah benar – benar steril. Oleh karena terjadi pertumbuhan, maka dilanjutkan proses tinalisasi.
 - a. Memanaskan perasan daun yodium dengan waterbath pada suhu 90° C selama 15 menit
 - b. Kemudian meletakkannya di inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C
 - c. Mengulangi perlakuan tersebut sampai 3 kali
 - d. Menanam kembali perasan daun yodium yang sudah melalui proses tinalisasi di media NAP dan menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37°C

3.5.6 Prosedur Pembuatan Konsentrasi Perasan Daun Yodium

- Konsentrasi 100% : Tabung 1 mengisi 1 ml perasan awal, itu sebagai konsentrasi 100%
- Konsentrasi 75% : Pada tabung 2 mengisi 0,25 ml aquadest steril menambahkan perasan daun yodium konsentrasi 100% sebanyak 0,75 ml, menghomogenkan.
- Konsentrasi 50% : Pada tabung 3 mengisi 0,5 ml aquadest steril menambahkan perasan daun yodium konsentrasi 100% sebanyak 0,5 ml, menghomogenkan.
- Konsentrasi 25% : Pada tabung 4 mengisi 0,75 ml aquadest steril menambah perasan daun yodium konsentrasi 100% sebanyak 0,25 ml, menghomogenkan
- Konsentrasi 0% : Pada tabung 5 mengisi 1 ml aquadest steril tanpa memberi tambahan perasan daun yodium..

3.5.7 Pemberian Perlakuan pada Media

Hari pertama :

1. Pemberian suspensi kuman pada masing-masing konsentrasi

Alat yang digunakan untuk pemberian suspensi kuman pada masing-masing konsentrasi

Bunsen, korek api dan ose bulat

Prosedur pemberian suspensi kuman pada masing-masing konsentrasi

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 di atas nyala api spirtus, mengambil suspensi kuman *Staphylococcus aureus* pada standart Mc Farland I sebanyak 1 mata ose dan mencampurkan suspensi ke dalam masing-masing konsentrasi secara acak.
5. Menutup kembali tabung dengan kapas berlemak.
6. Menginkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam.

Hari kedua :

2. Pemberian perlakuan perasan pada media

Alat yang digunakan untuk pemberian perlakuan perasan pada media

Bunsen, korek api dan ose bulat

Prosedur pemberian perlakuan perasan pada media

1. Mengamati masing- masing tabung, apakah terjadi kekeruhan atau tidak.
2. Mengambil konsentrasi terkecil yang mulai terlihat keruh, dan menguji kembali pada media padat MSA dengan tujuan memastikan apakah kuman tersebut adalah *Staphylococcus aureus*.
3. Memanaskan ose bulat di atas nyala api spirtus, mengambil 1 mata ose kuman yang ada pada konsentrasi terkecil tadi.
4. Menanam pada media padat dengan cara menggoreskan pada permukaan media.
5. Menginkubasi kembali pada suhu 37⁰C selama 24 jam

Hari ketiga :

3. Proses pengamatan

Alat yang digunakan untuk proses pengamatan

Bulpoint dan buku

Prosedur proses pengamatan

1. Mengamati hasilnya pada media padat apakah terbentuk koloni yang mengidentifikasi kuman tersebut adalah *Staphylococcus aureus*.
2. Mencatat konsentrasi terkecil dan menghitung jumlah koloni
3. Mencatat hasil yang diamati sebagai data.

3.6 Tabulasi Data

Data yang diperoleh ditabulasikan sebagai berikut :

Tabel 3.1. Contoh tabulasi data

No	Pengulangan	Jumlah koloni pada perlakuan konsentrasi,				
		100%	75%	50 %	25%	0% Kontrol
1	1					
2	2					
3	3					
4	4					
5	5					
Jumlah						
Rata-rata						

3.7 Metode Analisis Data

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