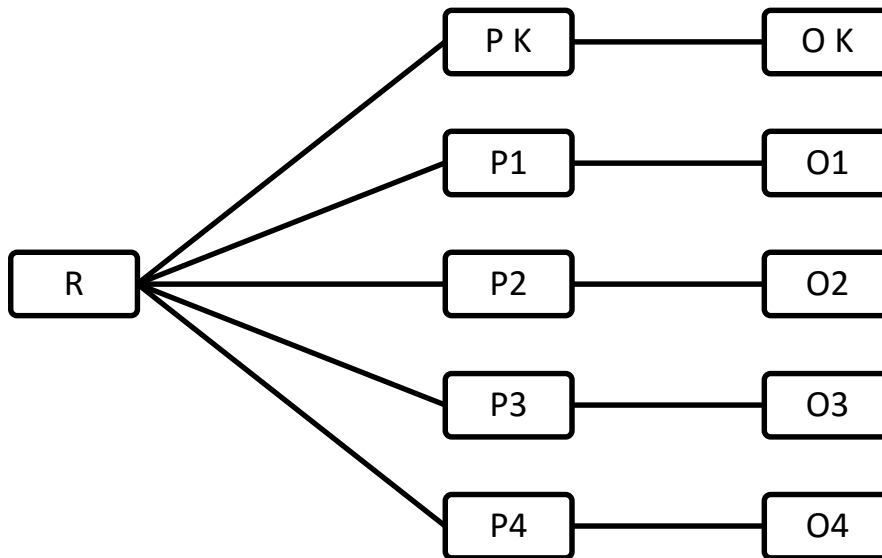


**BAB 3**  
**METODE PENELITIAN**

**3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental, yaitu untuk mengetahui pengaruh rebusan kayu secang (*Caesalpinia sappan* L) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

**Desain penelitian eksperimental sebagai berikut:**



**Gambar 3.1: Rancangan Penelitian (Zainuddin, 2003)**

Keterangan :

- R : Random
- PK : Perlakuan tanpa diberi rebusan Kayu secang ( Kontrol )
- P1 : Perlakuan rebusan Kayu secang konsentrasi 100%
- P2 : Perlakuan rebusan Kayu secang konsentrasi 75%
- P3 : Perlakuan rebusan Kayu secang konsentrasi 50%
- P4 : Perlakuan rebusan Kayu secang konsentrasi 25%
- OK : 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 Penelitian**

### **3.2.1 Populasi Penelitian**

Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* murni pada media *Nutrian Agar Slant* (NAS)

### **3.2.2 Sampel Penelitian**

Sampel dalam penelitian ini adalah kayu secang (*Caesalpinia sappan* L) kering yang dibuat rebusan digunakan untuk 25 sampel yang dibuat dalam 5 stok konsentrasi (Soenarto, 1990). Besar replikasi atau pengulangan dalam penelitian ini adalah 5 yang ditentukan dengan rumus berikut (Zainuddin, 2003) :

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

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 15 + 4$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 19 : 4$$

$$n \geq 4,7$$

$$n \sim 5$$

Keterangan :

n : jumlah sampel

k : Jumlah kelompok

### 3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

**3.3.1** Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2016 sampai dengan bulan Juli 2017, sedangkan waktu pemeriksaan dilaksanakan pada bulan Juli 2017.

**3.3.2** Lokasi pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

### **3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel**

#### **3.4.1 Variabel penelitian**

1. Variabel Bebas : Konsentrasi rebusan kayu secang (*Caesalpinia sappan* L)
2. Variabel Terikat : Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*
3. Variabel Kontrol : Suhu, pH, lama inkubasi, jumlah koloni, volume perasan, jenis media, dan sterilisasi

#### **3.4.2 Definisi operasional variable**

1. Rebusan kayu secang dikategorikan menjadi berbagai konsentrasi yaitu : 100%, 75%, 50%, 25% dan 0% (kontrol).
2. Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ditetapkan berdasarkan jumlah koloni dalam media *Manitol Salt Agar* (MSA). Pertumbuhan *Staphylococcus* dalam penelitian ini berupa angka yang menunjukkan banyaknya koloni *Staphylococcus aureus*. Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ditetapkan berdasarkan metode Angka Lempeng Total (ALT).
3. Pada perlakuan sampel lama inkubasi 24 jam, inokulasi menggunakan ose yang sudah ditera, jumlah koloni kuman yang akan diperiksa sesuai dengan standart *Mac*

*Farlan I*, tiap konsentrasi rebuan kayu secang harus, dan suhu inkubasi 37°C selama 24 jam.

### **3.5 Metode pengumpulan data**

Data pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh dengan cara observasi langsung, yaitu melalui uji Laboratorium. Pemeriksaan jumlah koloni pada bakteri *Staphylococcus aureus* ini menggunakan metode Perhitungan Angka Lempeng Total (ALT). Langkah-langkah pemeriksaannya 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 atau tidaknya pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* setelah diberi perlakuan rebuan kayu secang (*Caesalpinia sappan* L) dengan berbagai konsentrasi dan ditanam pada media *Manitol Salt Agar* (MSA). Pertumbuhan dilihat setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

#### **3.5.2 Alat Pemeriksaan**

Cawan Petri, Autoclave, Kain kasa steril, Inkubator, Tabung reaksi, Gelas ukur, Pengaduk, Rak tabung, Api spiritus, Filler, Erlenmeyer, Ose, Pipet ukur.

#### **3.5.3 Bahan Pemeriksaan**

Kayu secang (*Caesalpinia sappan* L), Media *Manitol Salt Agar* (MSA), Media *Nutrient Agar Plate* (NAP), Aquadest steril, Pz steril, Suspensi kuman *Staphylococcus aureus*

#### **3.5.4 Reagen Pemeriksaan**

NaOH 0.1 N, HCL 0,1 N, Bacl 1%, H2So4 1%

### 3.5.5 Prosedur Sterilisasi alat

Semua alat yang akan digunakan dimasukkan dalam Autoclave disterilisasi pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit.

### 3.5.6 Prosedur pembuatan standart *Mac.Farlan I* (Soemarno, 2000) :

1. Disiapkan 2 tabung steril, 1 untuk suspensi kuman dan yang 1 untuk standar .
2. Buat perbandingan antara BaCl 1% : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% sebesar 1 : 9
3. Dipipet 0,1 ml BaCl 1% + 9,9 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%
4. Dihomogenkan dengan cara kocok pelan tabung.

### 3.5.7 Prosedur pembuatan suspensi kuman :

1. Diisi tabung steril dengan pz steril (NaCl 0,85%).
2. Diambil kuman dari biakan *Staphylococcus aureus* murni yang sudah ditanam di media *Nutrient Agar Slant* (NAS) dengan ose steri.
3. Dichelupkan ose steril yang sudah ada kumannya pada tabung yang berisi pz steril (NaCl 0,85%).
4. Dibandingkan warna suspensi kuman dengan *Mac. Farlan I*
5. Apabila warna kurang keruh, maka tambahkan kuman dengan ose steril dan apabila terlalu keruh tambahkan pz hingga warnanya sama dengan standart *Mc Farlan I*

### 3.5.8 Prosedur Pembuatan Media *Nutrient Agar Plate* (NAP)

Berikut adalah prosedur pembuatan media *Nutrient Agar Plate* (NAP) (Soewarsono, 1993)

1. Dilakukan perhitungan media *Nutrient Agar* (NA)
2. Disiapkan alat dan bahan yang digunakan

3. Ditimbang bahan (media NA) sesuai dengan perhitungan :  
NA 20 garm/ liter, membuat NA sebanyak 2 plate @ 20 ml  
NA yang akan ditimbang = ( 20 gram x 40 ml ) / 1000 ml = 0,8 gram.
4. Diukur volume aquadest sebanyak 40 ml menggunakan gelas ukur
5. Dilarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest yang sudah diukur volumenya dalam erlenmeyer
6. Dipanaskan larutan diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih
7. Diangkat larutan yang sudah dipanaskan dan dinginkan dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam – suam kuku
  8. Diukur pH nya sampai 7.4, jika terlalu asam ditambahkannya dengan NaOH 0.1 N, sedangkan jika terlalu basa ditambahkannya dengan HCl 0.1 N sampai pH nya 7.4
  9. Ditutup erlenmeyer dengan kapas berlemak dan disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit
  10. Setelah turun dari autoclave, dituang ke dalam plate yang steril sampai rata
  11. Didiamkan sampai terlihat padat dan disimpan di lemari es.  
(Sumarsono, 1996)

### **3.5.9 Prosedur pembuatan konsentrasi rebusan kayu secang (*Caesalpinia sappan* L)**

1. Serutan kayu secang (*Caesalpinia sappan* L) kering ditimbang sebanyak 25 gram

2. Serutan kayu secang dicuci dengan aquadest steril
3. Aquadest steril ditambahkan sebanyak 25 ml , kemudian didihkan selama 20 menit pada suhu 95-100°C sambil sesekali diaduk (Kumala *at al.* 2009)
4. Konsentrasi rebusan kayu secang didapat 100%
5. Disaring dan panaskan kembali sampai diperoleh volume 25 ml
6. Dibuat konsentrasi rebusan kayu secang (*Caesalpinia sappan L*) (tabel 3.1|)

**Tabel 3.1 Pembuatan Larutan konsentrasi rebusan kayu secang (*Caesalpinia sappan L*)**

<b>Konsentrasi</b>	<b>PZ Steril</b>	<b>Rebusan kayu secang (<i>Caesalpinia sappan L</i>)</b>
100 %	-	1 ml
75 %	0,25 ml	0,75 ml
50 %	0,50 ml	0,50 ml
25 %	0,75 ml	0,25 ml
0 %	1 ml	-

Keterangan :



Konsentrasi 100% : Tabung 1 di isi 1 ml rebusan awal, itu sebagai konsentrasi 100%

Konsentrasi 75% : Pada tabung 2 diisi 0.25 ml Pz steril ditambahkan rebusan kayu secang (*Caesalpinia sappan* L) konsentrasi 100% sebanyak 0.75 ml, dihomogenkan

Konsentrasi 50% : Pada tabung 3 diisi 0.50 ml Pz steril ditambahkan rebusan kayu secang (*Caesalpinia sappan* L) konsentrasi 100% sebanyak 0.50 ml, dihomogenkan

Konsentrasi 25% : Pada tabung 4 diisi 0.75 ml Pz steril ditambahkan rebusan kayu secang (*Caesalpinia sappan* L) konsentrasi 100% sebanyak 0.25 ml, dihomogenkan

Konsentrasi 0% : Pada tabung 5 diisi 1 ml Pz steril tanpa diberi tambahan rebusan kayu secang (*Caesalpinia sappan* L).

### **3.5.10 Prosedur Pembuatan Media *Manitol Salt Agar* (MSA)**

Berikut adalah prosedur pembuatan media *Manitol Salt Agar* (MSA) (Soewarsono, 1993)

1. Disiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
2. Dilakukan perhitungan terhadap jumlah bahan atau media *Manitol Salt Agar* (MSA) yang dibutuhkan
3. Dilakukan penimbangan bahan media *Manitol Salt Agar* (MSA) dengan perhitungan :

MSA 108 garm/ liter, membuat NA sebanyak 1 plate @ 20 ml

MSA yang akan ditimbang = ( 108 gram x 20 ml ) / 1000 ml = 2,16 gram

4. Diukur volume aquadest yang di butuhkan yaitu sebanyak 20 ml dengan gelas ukur
5. Dilarutkan bahan yang sudah ditimbang tadi dengan aquadest yang sudah diukur volumenya ke dalam erlenmeyer
6. Dipanaskan diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih
7. Diangkat larutan yang sudah larut sempurna dan dinginkan dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam – suam kuku
8. Diukur pH dengan cara ditambahkan NaOH 0.1 N jika terlalu asam dan ditambahkan HCl 0.1 N jika terlalu basa sampai pH nya 7.2
9. Ditutup larutan yang ada di erlenmeyer dengan kapas berlemak dan koran serta mengikatnya
10. Larutan tersebut disterilkan bersama dengan plate yang dibutuhkan di autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit
11. Setelah turun dari autoclave, larutan dituang ke dalam plate yang steril sampai rata, setelah dingin simpan di lemari es.

### **3.5.11 Prosedur Pemeriksaan Sampel (Anonim, 1996)**

#### **a. Hari pertama pemeriksaan :**

1. Disiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
2. Dinyalakan api spirtus dengan korek api.
3. Dilabeli masing-masing tabung sesuai dengan konsentrasinya, yaitu konsentrasi 100%, 75%, 50%, 25% dan 0% atau C (Control).

4. Dipanaskan ose bulat diatas nyala api spirtus, ambil 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 ambil lagi 1 mata ose kuman *Staphylococcus aureus* pada suspensi kuman dan membiakkannya pada tabung berlabel 57%, begitu seterusnya sampai pada tabung C. Semua perlakuan dilakukan secara steril dekat dengan api.
5. Ditutup kembali tabung dengan kapas berlemak
6. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

**b. Hari kedua :**

1. Diamati masing-masing tabung, apakah terjadi kekeruhan atau tidak.
2. Diambil Konsentrasi Rebusan kayu secang (*Caesalpinia sappan* L) terkecil yang mulai terlihat keruh, dan diuji kembali ke media padat *Manitol Salt Agar* (MSA) dengan tujuan memastikan apakah kuman tersebut adalah *Staphylococcus aureus*.
3. Dipanaskan ohse bulat diatas nyala api spirtus, ambil 1 mata ose kuman yang ada pada konsentrasi terkecil tadi.
4. Ditanam di media padat dengan cara menggoreskannya dipermukaan media.
5. Diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 24 jam.

**c. Hari ketiga :**

1. Dimati hasilnya pada media padat apakah terbentuk koloni yang mengidentifikasi kuman tersebut adalah *Staphylococcus aureus*.
2. Dicatat konsentrasi terkecil dan dihitung jumlah koloni.
3. Dicatat hasil yang di amati sebagai data.

### 3.6 Tabulasi Data

Data yang diperoleh ditabulasikan sebagai berikut :

Tabel 3.2 Contoh tabulasi data hasil pemeriksaan Pengaruh Rebusan Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

No	Kode Sampel	KONSENTRASI				
		100%	75%	50%	25%	0%
1.	U1					
2.	U2					
3.	U3					
4.	U4					
5.	U5					
Jumlah						

**Keterangan :**

**U1** : pengulangan pertama

**U2** : pengulangan kedua

**U3** : pengulangan ketiga

**U4** : pengulangan keempat

**U5** : pengulangan kelima

### **3.6.1 Metode Analisis Data**

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