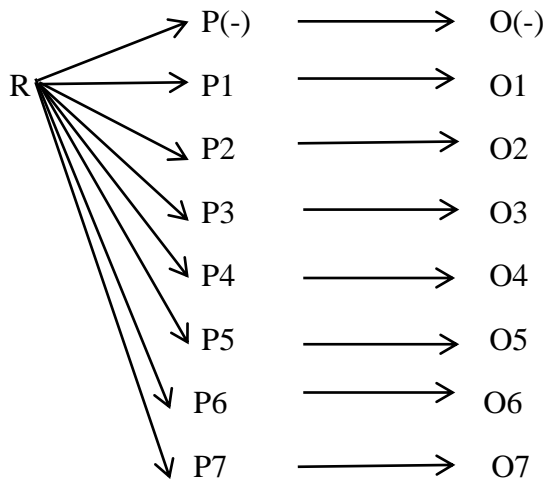


BAB 3
METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan rancangan penelitian eksperimental laboratorium dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi rebusan bunga belimbing wuluh terhadap pertumbuhan bakteri *staphylococcus aureus* dengan rancangan penelitian sebagai berikut :



Gambar 3.1 Rancangan Penelitian (Zainuddin, 2003).

Keterangan :

R : random

P(-) : perlakuan yang tidak diberi rebusan bunga belimbing wuluh

P1 : perlakuan konsentrasi rebusan bunga belimbing wuluh 70%

- P2 : perlakuan konsentrasi rebusan bunga belimbing wuluh 60%
- P3 : perlakuan konsentrasi rebusan bunga belimbing wuluh 50%
- P4 : perlakuan konsentrasi rebusan bunga belimbing wuluh 40%
- P5 : perlakuan konsentrasi rebusan bunga belimbing wuluh 30%
- P6 : perlakuan konsentrasi rebusan bunga belimbing wuluh 20%
- P7 : perlakuan konsentrasi rebusan bunga belimbing wuluh 10%
- O(-) : observasi setelah perlakuan control
- O1 : observasi setelah perlakuan konsentrasi 70%
- O2 : observasi setelah perlakuan konsentrasi 60%
- O3 : observasi setelah perlakuan konsentrasi 50%
- O4 : observasi setelah perlakuan konsentrasi 40%
- O5 : observasi setelah perlakuan konsentrasi 30%
- O6 : observasi setelah perlakuan konsentrasi 20%
- O7 : observasi setelah perlakuan konsentrasi 10%

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri *stapylococcus aureus* biakan murni pada media *Nutrient Agar Slant* (NAS) yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya (BBLK Surabaya).

3.2.2 Sampel Penelitian

Dalam penelitian ini terdapat 7 perlakuan konsentrasi yang diambil dari rebusan bunga belimbing wuluh dan 1 perlakuan sebagai kontrol, dalam penelitian ini setiap perlakuan dilakukan masing-masing 3 kali pengulangan yang diperoleh berdasarkan rumus replikasi yang ditentukan dengan rumus federer sebagai berikut :

$$(R-1) (T-1) \geq 15$$

$$(R-1) (8-1) \geq 15$$

$$(R-1) 7 \geq 15$$

$$7R - 7 \geq 15$$

$$7R \geq 15+7$$

$$R \geq 22/7 = 3,14$$

$$R \geq 3 \text{ (Pengulangan)}$$

(Federer, 2010)

Keterangan :

R : jumlah replikasi (Pengulangan)

T : banyak kelompok perlakuan

Sehingga seluruhnya ada 3 pengulangan x 8 perlakuan =24 sampel.

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 2017 sampai dengan bulan Juni 2017. Sedangkan waktu pemeriksaan dilakukan pada bulan Mei 2017.

3.4 Variabel dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel bebas : Rebusan bunga belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L*)

3.4.2 Variabel Terikat : Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.4.3 Variabel kontrol : Lama inkubasi, inokulasi, jumlah koloni, volume perasan, sterilisasi, dan suhu

3.4.4 Definisi Operasional

1. Rebusan bunga belimbing wuluh adalah bunga belimbing wuluh sebanyak 100 gram yang direbus dalam 100 ml aquades, yang dikategorikan menjadi berbagai macam konsentrasi, yaitu : 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% dan 0% (kontrol).
2. Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dalam penelitian ini ditetapkan berdasarkan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yang tumbuh setelah inkubasi 24 jam suhu 37°C pada media *Manitol Salt Agar* (MSA) dengan satuan CFU.

3. Pada perlakuan sampel lama inkubasi 24 jam, inokulasi menggunakan ose yang sudah ditera, jumlah koloni kuman yang akan diperiksa sesuai dengan standart *Mac Farland I*, tiap konsentrasi volume rebusan bunga belimbing wuluh harus sama, dan suhu inkubasi 37°C.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh dengan cara observasi langsung, yaitu dengan melalui uji Laboratorium. Pemeriksaan jumlah koloni pada bakteri *Staphylococcus aureus* ini menggunakan metode **Dilusi**. dengan mengamati pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada rebusan bunga belimbing wuluh yang ditandai dengan adanya koloni yang tumbuh pada media *Manitol salt agar* (MSA). Langkah - langkah pemeriksaanya diantaranya sebagai berikut :

3.5.1 Prinsip Pemeriksaan

Senyawa antibakteri diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi. Kemudian masing-masing konsentrasi ditambahkan suspense bakteri uji dalam media cair. Mengamati ada dan tidaknya pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* setelah diberi perlakuan rebusan bunga belimbing wuluh dengan berbagai konsentrasi dan ditanam di media MSA. Pertumbuhan dilihat setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.5.2 Alat dan Bahan

a. Alat-alat

- | | |
|------------------|----------------------------|
| 1. Timbangan | 10. Rak tabung |
| 2. Tabung reaksi | 11. Api spirtus, kaki tiga |

- | | |
|------------------|-----------------------|
| 3. Pengaduk | 12. filler |
| 4. Pipet pasteur | 13. ose |
| 5. Erlenmeyer | 14. plate |
| 6. Autoclave | 15. Tabung sentrifuge |
| 7. Pipet ukur | 16. Kain kasa steril |
| 8. Gelas arloji | 17. Water bath |
| 9. Gelas ukur | 18. Inkubator |

b. Bahan

1. Rebusan bunga belimbing wuluh
2. Aquades steril
3. Media MSA
4. Media NA
5. Pz steril
6. Suspensi kuman *Staphylococcus aureus*

c. Reagen

- | | |
|---------------|--------------------------------------|
| 1. Pz steril | 4. BaCL 1% |
| 2. NaOH 0,1 N | 5. H ₂ SO ₄ 1% |
| 3. HCL 0,1 N | |

3.5.3 Prosedur Pemeriksaan

3.5.3.1 Prosedur Pembuatan Standart Mac Farland I

1. Disiapkan 2 tabung steril, satu untuk suspensi kuman dan 1 untuk standart Mac Farland 1.
2. Dibuat perbandingan antara BaCl 1% : H₂SO₄ 1 % sebesar 1 : 9

3. Dipipet 0,1 ml BaCl 1% +9,9 ml H₂SO₄ 1%
4. Dihomogenkan dengan cara kocok pelan tabung (Masyudi, 2012)

3.5.3.2 Prosedur Pembuatan Suspensi Kuman

Langkah kerja :

1. Disiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
2. Dipipet PZ steril \pm 2 ml dan masukkan kedalam tabung reaksi
3. Diambil satu mata ose biakan murni stapylococcus aureus yang sudah ditanam di media NAS dengan ose bulat kemudian memasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi Pz steril
4. Dihomogenkan tabung reaksi tersebut dan dibandingkan kekeruhan dengan standart *Mac Farland* 1 yang sudah dibuat
5. Apabila didapat kekeruhan suspensi bakteri stapylococcus aureus yang melebihi standart *mac Farland* 1 maka perlu ditambahkan PZ steril, tapi jika kekeruhan kurang dari standart *mac farlad* 1 maka perlu ditambahkan dengan biakan bakteri *stapylococcus aureus* dilakukan terus menerus sampai sesuai dengan standart *Mac Farland* 1 dimana sama dengan jumlah bakteri 3×10^8 CFU/ml

3.5.3.3 Prosedur standarisasi ose yang akan dipakai dalam penelitian :

1. Disiapkan pipet 0.1 ml dan filler serta tabung.
2. Dipipet aquadest 0.1, kemudian menuangnya ke dalm tabung.
3. Dinyalakan api spirtus.

Diambil 1 mata ose air yang sudah dituang ke dalam tabung dan kemudian memanaskan ose tersebut diatas api spirtus, lakukan berulang-ulang sampai air dalam tabung habis.

3.5.3.4 Prosedur Pembuatan Media *Nutrien Agar Plate* (NAP).

1. Dilakukukan perhitungan media NAP

Membuat media NAP 5 plate, @ plate \pm 17 ml

Komposisi NA 20 gr per I liter \rightarrow $\frac{20 \text{ gr}}{1000} \times 85 \text{ ml} = 1,7 \text{ gr}$

2. Disiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
3. Ditimbang bahan (media NA) sesuai dengan perhitungan menggunakan timbangan neraca analitik
4. Diukur volume aquadest 85 ml menggunakan gelas ukur
5. Dilarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest yang sudah diukur volumenya dalam erlenmeyer
6. Dipanaskan larutan di atas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih
7. Diangkat larutan yang sudah dipanaskan dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan baskom sampai suam-suam kuku
8. Diukur pH nya sampai 7.4, jika terlalu asam dapat menambahkan NaOH 0.1 N, sedangkan jika terlalu basa menambakkannya dengan HCl 0.1 N sampai pH nya 7.4
9. Ditutup 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 lemari es.

3.5.3.5 Proseder Pembuatan Media MSA (*Manitol Salt Agar*)

1. Disiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
2. Dilakukan perhitungan terhadap jumlah media MSA yang dibutuhkan
MSA 24 plate, @ plate \pm 17 ml
Komposisi MSA 108 gr per liter \longrightarrow $\frac{108\text{gr}}{1000} \times 408 \text{ ml} = 44,06\text{gr}$
3. Dilakukan penimbangan bahan sesuai dengan yang diperlukan menggunakan timbangan
4. Diukur volume aquadest yang dibutuhkan yaitu sebanyak 44,06 ml dengan gelas ukur
5. Dilarutkan bahan yang sudah ditimbang tadi dengan aquadest yang sudah diukur volumenya ke dalam Erlenmeyer
6. Dipanaskan di atas api spiritus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih
7. Diangkat larutan yang sudah larut sempurna dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam-suam kuku
8. Diukur 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. Ditutup larutan yang ada di erlenmeyer dengan kapas berlemak dan menyeterilasi 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. Masing – masing plate berisi 15 ml, dituang secara steril dekat dengan api spiritus(**Masyhudi, 2012**)

3.5.3.6 Prosedur Pembuatan rebusan bunga belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L)

1. Dipetik bunga belimbing wuluh dari pohonnya
2. Dicuci bunga belimbing wuluh terakhir dicuci dengan aquadest steril, dikeringkan pada suhu ruang
3. Ditimbang bunga belimbing wuluh sebanyak 100 gram
4. Dicuci bunga belimbing wuluh terakhir dicuci dengan aquadest steril
5. Ditambah aquades 100 ml, kemudian direbus bunga belimbing wuluh selama 15 menit (15 menit dihitung ketika air rebusan mendidih)
6. Air rebusan disaring dengan kasa steril
7. Disentrifuge air rebusan tadi menggunakan tabung sentrifuge yang steril sehingga didapatkan rebusan yang benar-banar jernih.
8. Diambil satu mata ose rebusan yang sudah jernih secara steril, kemudian menanamnya ke media NAP, dengan cara menggoreskannya di permukaan media
9. Diinkubasi selama 24 jam 37°C

10. Diamati hasilnya, jika tidak terjadi pertumbuhan kuman berarti rebusan bunga belimbing wuluh tadi sudah benar-benar steril. namun apabila masih ditumbuhi maka harus dilakukan proses tindalisasi.
- a. Dipanaskan rebusan bunga belimbing wuluh dengan waterbath pada suhu 90°C selama 15 menit
 - b. Diletakkan di inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C
 - c. Diulangi perlakuan tersebut sampai 3 kali
 - d. Ditanam kembali rebusan bunga belimbing wuluh yang sudah melalui proses tindalisasi di media NAP dan menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37°C
 - e. Dibuat konsentrasi 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% dan 0% (kontrol), yaitu :

3.5.3.7 Pembuatan konsentrasi rebusan bunga belimbing wuluh

1. Konsentrasi 70% : Tabung 1 diisi 0,3 ml pz steril ditambah rebusan bunga belimbing wuluh konsentrasi 100% sebanyak 0,7ml dan homogenkan.
2. Konsentrasi 60% : Tabung 2 diisi 0,4 ml pz steril ditambah rebusan bunga belimbing wuluh konsentrasi 100% sebanyak 0,6 ml dan homogenkan
3. Konsentrasi 50% : Tabung 3 diisi 0,5 ml pz steril ditambah rebusan bunga belimbing wuluh konsentrasi 100% sebanyak 0,5 ml dan homogenkan.

4. Konsentrasi 40% : Tabung 4 diisi 0,6 ml pz steril ditambah rebusan bunga belimbing wuluh konsentrasi 100% sebanyak 0,4 ml dan homogenkan.
5. Konsentrasi 30% : Tabung 5 diisi 0,7 ml pz steril ditambah rebusan bunga belimbing wuluh konsentrasi 100% sebanyak 0,3 ml dan homogenkan.
6. Konsentrasi 20% : Tabung 6 diisi 0,8 ml pz steril ditambah rebusan bunga belimbing wuluh konsentrasi 100% sebanyak 0,2 ml dan homogenkan
7. Konsentari 10% : Tabung 7 diisi 0,9 ml pz steril ditambah rebusan bunga belimbing wuluh konsentrasi 100% sebanyak 0,1 ml dan homogenkan
8. Konsentrasi 0% : Tabung 8 diisi 1 ml pz steril tanpa diberi tambahan rebusan bunga belimbing wuluh (**Puspitasari,2013**)

3.5.3.8 Prosedur pemeriksaan sampel

Hari pertama : (pemberian suspensi kuman pada masing-masing konsentrasi)

1. Disiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
2. Dinyalakan api spirtus dengan korek api
3. Dilabeli pada masing-masing tabung sesuai dengan konsentrasi, yaitu konsentrasi 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% dan 0% (Control).
4. Dipanaskan ose bulat diatas nyala api spirtus, mengambil suspensi kuman *Stapylococcus aureus* sebanyak 1 mata ose dan membiakkannya ditabung berlabel 70% dengan cara menggesekkan ose didinding permukaan media

cair sebanyak 3 kali. Kemudian mengambil lagi satu mata ose kuman *staphylococcus aureus* pada suspensi kuman dan membiakkannya pada tabung berlabel 60% begitu seterusnya pada tabung Control. Semua perlakuan dilakukan secara steril dekat dengan api.

5. Ditutup kembali tabung dengan kapas berlemak
6. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Hari kedua : (prosedur pemberian perlakuan rebusan pada Media)

1. Diamati masing-masing tabung, apakah terjadi kekeruhan apa tidak.
2. Bila kekeruhan sulit diamati secara visual maka menguji kembali ke media *Manitol Salt Agar* (MSA) dengan tujuan untuk memastikan apakah kuman tersebut adalah *Staphylococcus aureus*.
3. Dipanaskan ose bulat di atas nyala api spirtus, mengambil satu mata ose kuman yang ada pada masing-masing konsentrasi.
4. Ditanam pada media padat dengan cara menggoreskan pada permukaan media.
5. Diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 24 jam. (Masyudi, 2012)

Hari ketiga : (pengamatan)

1. Diamati hasilnya pada media padat apakah terbentuk koloni yang mengidentifikasikan kuman tersebut adalah *Staphylococcus aureus*.
2. Dihitung jumlah koloni *Staphylococcus aureus* pada masing- masing media MSA menggunakan koloni counter. (Masyhudi, 2012)

3.5.4 Tabulasi Data

Data yang diperoleh ditabulasikan sebagai berikut :

Tabel 3.1: Contoh tabulasi data

No.	Replikasi	Konsentrasi Rebusan bunga belimbing wuluh (%)							
		0	10	20	30	40	50	60	70
1	R1								
2	R2								
3	R3								
Jumlah									
Rata-rata									
SD									

3.6 Metode Analisis Data

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