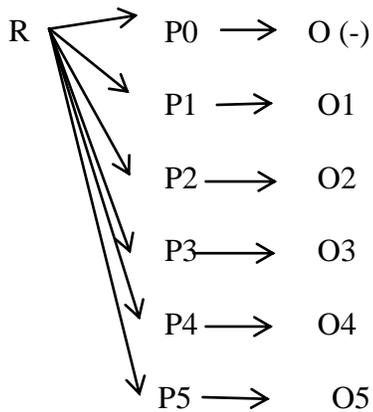


## BAB 3

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Rancangan penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan rancangan penelitian eksperimental untuk mengetahui adanya pengaruh perasan jeruk nipis sensitive terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan desain sebagai berikut :



(Zainuddin, 2003).

Keterangan:

R : random

P(0) : perlakuan yang tidak diberi krim perasan jeruk nipis

P1 : perlakuan konsentrasi krim perasan jeruk nipis 100%

P2 : perlakuan konsentrasi krim perasan jeruk nipis 80%

P3 : perlakuan konsentrasi krim perasan jeruk nipis 60%

P4 : perlakuan konsentrasi krim perasan jeruk nipis 40%

P5 : perlakuan konsentrasi krim perasan jeruk nipis 20%

- O(-) : observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan tanpa pemberian krim
- O1 : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian krim perasan jeruk nipis konsentrasi 100%
- O2 – O5 : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian krim perasan jeruk nipis konsentrasi 80% - 20%

## 3.2 Populasi dan Sampel

### 3.2.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* di dalam media pertumbuhan MSA yang ditumbuhkan berasal dari biakan murni, diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya

### 3.2.2 Sampel

Sampel diambil sebanyak 6 dalam penelitian, sedangkan jumlah pengulangan sampelnya diperoleh dari rumus sebagai berikut :

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

$$(n-1)(6-1) \geq 15$$

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n < 20$$

$$n < 20 : 5$$

$$n = 4$$

(Hidayat, 2010)

Keterangan:

n : jumlah replikasi

### **3.3. Lokasi dan Waktu Penelitian**

#### **3.3.1 Lokasi Penelitian**

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

#### **3.3.2 Waktu Penelitian**

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Juli 2017.

### **3.4. Variabel dan Definisi Operasional**

#### **3.4.1. Variabel penelitian**

Variabel bebas : konsentrasi perasan jeruk nipis

Variabel terikat : pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

Variabel kontrol : suhu, pH, lama inkubasi, jumlah suspensi, jenis kuman

#### **3.4.2. Definisi Operasional Variabel**

1. Konsentrasi pemberian krim perasan jeruk nipis dikategorikan menjadi berbagai konsentrasi yaitu: 100%, 80%, 60%, 40%, 20%
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* yang di beri perlakuan diperoleh 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 macam-macam konsentrasi ditambahkan suspensi uji dalam media cair. Mengamati ada dan tidaknya pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* setelah diberi perlakuan ekstrak bunga mawar 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**

##### **3.5.2.1. Alat yang digunakan adalah sebagai berikut :**

Tabung reaksi, rak tabung, pipet ukur, ose bulat, filler, spuit, Petridish steril, Erlenmeyer, pipet Pasteur, neraca triple beam balance, corong, gelas arloji, batang pengaduk, gelas ukur, api spiritus, incubator, kertas saring, mortar, tabung, kasa steril, rak tabung, labu ukur, inkubator, pipet pasteur

##### **3.5.2.2. Bahan dan Reagen yang digunakan adalah sebagai berikut :**

Suspensi kuman *Staphylococcus aureus* dan Pz steril, BaCl 1% dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% Media NA, aquadest, kertas indikator PH. HCl 0,1 N, NaOH 0,1 N. Media NA, Perasan jeruk nipis, Aquadest steril se cream , base cream (Cleansing milk), minyak zaitun

### **3.5.3. Prosedur pembuatan suspensi kuman *Staphylococcus aureus***

#### **3.5.3.1. Prosedur membuat standart Mac Farland I**

- a. Tabung steril disiapkan lalu membuat perbandingan antara BaCl 1% : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% sebesar 1:9
- b. Dipipet 0,1 ml BaCl 1% + 9,9ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%
- c. Dihomogenkan dengan cara kocok pelan tabung

#### **3.5.3.2. Prosedur membuat suspensi kuman *Staphylococcus aureus***

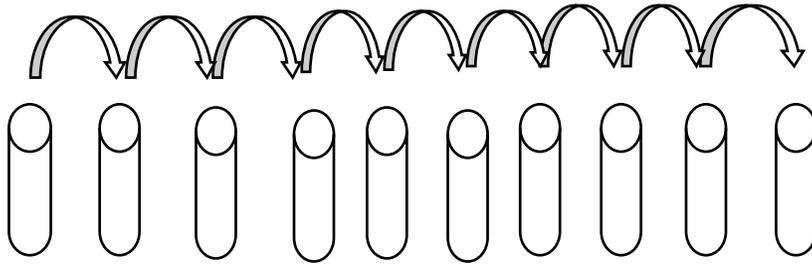
- a. Disiapkan tabung tabung steril lalu masukkan Pz (NaCl 0,85%) steril.
- b. Diambil kuman dari biakan *Staphylococcus aureus* murni yang sudah ditanam dimedia *Nutrient Agar Slant* (NAS) dengan ose steril.
- c. Dichelupkan ose steril yang sudah ada kumannya pada tabung yang berisi Pz.
- d. Dibandingkan warna suspensi kuman dengan standart Mac Farland I.
- e. Apabila warna kurang keruh, maka Ditambahkan kuman dengan ose steril dan apabila terlalu keruh ditambahkan Pz hingga warnanya sama dengan standart Mac Farland I.

#### **3.5.3.3. Pengenceran suspensi kuman**

- a. Setelah didapatkan kuman yang sesuai standart Mac Farland I didapatkan hasil 1: 300.000.000 ( $3 \times 10^8$  CFU/ml)
- b. Diencerkan suspensi kuman hingga mendapatkan hasil 1: 1000 ( $3 \times 10^3$ CFU/ml)

Prosedur pengenceran

Diambil 1 ml Diambil 1 ml Diambi 1 ml Diambil 1 ml Diambil I ml



Tab.1 Tab.2 Tab.3 Tab.4 Tab.5 Tab.6 Tab.7 Tab.8 Tab.9 Tab.10

1. Diambil suspensi kuman pada tabung pertama sebanyak 1 ml dari standart Mac Farland I , Dimasukkan ke dalam tabung kedua dan Ditambahkan 9 ml Pz, itu setara dengan  $3 \times 10^9$  CFU/ml.
2. Diambil suspensi kuman pada tabung kedua 1 ml dari pengenceran suspensi kuman  $3 \times 10^8$  CFU/ml, Dimasukkan ke dalam tabung ketiga dan ditambahkan 9 ml Pz, melanjutkan pengenceran seperti diatas sampai tabung terakhir (tabung 10). Sehingga tabung terakhir diperoleh hasil pengenceran  $3 \times 10^1$  CFU/ml.
3. Menstandartkan ose yang akan dipakai dalam penelitian:
  - a. Disiapkan pipet 0,1 ml dan filler serta tabung.
  - b. Dipipet aquadest 0,1 ml, kemudian dituang ke dalam tabung.
  - c. Api spirtus dinyalakan
  - d. Diambil 1 mata ose air yang sudah dituang ke dalam tabung dan kemudian dipanaskan ose tersebut diatas api spirtus, lakukan berulang-ulang sampai air didalam tabug habis.
  - e. Didapatkan 10 mata ose air tersebut habis.

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

### 3.5.4. Pembuatan Media *Nutrient Agar Plate* (NAP)

#### 3.5.4.1. Prosedur pembuatan *Nutrien Agar Plate* (NAP)

1. Dilakukan perhitungan Media *Nutrien Agar* (NA)

Dibuat NAP 4 plate, @plate ±20ml

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

2. Alat dan bahan yang digunakan disiapkan
3. Ditimbang bahan (media NA) sesuai dengan perhitungan menggunakan timbangan
4. Volume aquadest 120 ml diukur menggunakan gelas ukur
5. Bahan yang sudah ditimbang dilarutkan 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 didinginkan dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam – suam kuku
8. Diukur pH nya sampai 7.4, jika terlalu asam ditambahkan dengan NaOH 0.1 N, sedangkan jika terlalu basa ditambahkan dengan HCL 0.1 N sampai pH nya 7.4
9. Erlenmeyer ditutup dengan kapas berlemak dan disteril dengan autoclave pada suhu 121 atm selama 15 menit
10. Setelah turun dari autoclave, dituangkan ke dalam plate yang steril sampai rata
11. Di diamkan sampai terlihat padat dan menyimpannya ke lemari es.

### 3.5.4.2. Pembuatan Media *Manitol Salt Agar* (MSA)

### 3.5.4.3. Prosedur pembuatan Media MSA

1. Disiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
2. Dilakukan perhitungan media MSA sesuai yang dibutuhkan

Dibuat MSA 24 plate, @plate 20 ml

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

3. Dilakukan penimbangan bahan sesuai dengan yang diperlukan menggunakan timbangan
4. Diukur volume aquadest yang di butuhkan yaitu sebanyak 480ml dengan gelas ukur
5. Bahan yang sudah ditimbang tadi dilarutkan dengan aquadest yang sudah diukur volumenya ke dalam Erlenmeyer
6. Dipanaskan diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih
7. Larutan yang sudah larut sempurna diangkat dan didinginkan dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam – suam kuku
8. Diukur pH dengan cara menambahkan NaOH 0.1 N jika terlalu asam dan ditambahkan HCL 0.1 N jika terlalu basa sampai pH nya 7,2 – 7,4
9. Larutan yang ada di erlenmeyer ditutup dengan kapas berlemak dan koran serta mengikatnya. Kemudian larutan tersebut disterilisasi bersama dengan plate yang dibutuhkan di autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit
10. Setelah turun dari autoclave, Dituang ke dalam plate yang steril sampai rata
11. Larutan tadi dituang ke dalam plate. Masing – masing plate  $\pm$  15 ml secara steril dekat dengan api.

12. Didiamkan sampai terlihat padat dan kemudian disimpan ke dalam lemari es.

### **3.6. Pembuatan Konsentrasi Perasan Jeruk Nipis**

1. Konsentrasi 20% : Tabung 1 diisi 0,2 ml perasan awal (konsentrasi 100%) ditambahkan 0,80 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
2. Konsentrasi 40% : Tabung 2 diisi 0,4 ml perasan awal (konsentrasi 100%), ditambahkan 0,60 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
3. Konsentrasi 60% : Tabung 3 diisi 0,6 ml perasan awal (konsentrasi 100%) ditambahkan 0,40 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
4. Konsentrasi 80% : Tabung 4 diisi 0,8 ml perasan awal (konsentrasi 100%) ditambahkan 0,20 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
5. Konsentrasi 100% : Tabung 5 diisi 1 ml perasan awal (konsentrasi 100%), kemudian dihomogenkan.

#### **3.6.1. Pembuatan Krim Perasan Jeruk Nipis**

Teknik pengolahan krim jeruk nipis dalam penelitian :

1. Perasan jeruk nipis di pipet sesuai konsentrasi yang dibutuhkan
2. Perasan yang telah di pipet di letakkan pada mortir yang steril
3. Base cream ditimbang sebanyak 250 g
4. Base cream dimasukkan pada mortir sedikit demi sedikit dan aduk perlahan
5. Minyak zaitun ditambahkan sebanyak 5 tetes lalu di aduk hingga homogen

6. Sediaan krim yang telah jadi dipindah kedalam wadah
7. Pembuatan krim dilanjutkan dengan konsentrasi lainnya
8. Diambil 1 mata ose krim yang sudah jadi secara steril, kemudian ditanam ke media NAP, dengan cara menggoreskannya dipermukaan media.
9. Diinkubasi 24 jam 37°C
10. Diamati hasilnya, jika tidak terjadi pertumbuhan kuman berarti krim perasan jeruk nipis tadi sudah benar-benar steril.

### **3.6.2. Pemberian Perlakuan Pada Media**

Hari Pertama Pemeriksaan:

1. Disiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
2. Dinyalakan api spirtus dengan korek api
3. Masing-masing tabung dilabeli sesuai dengan konsentrasinya, yaitu konsentrasi 100%, 80%, 60%, 40%, 20%. Ose bulat dipanaskan diatas nyala api spirtus, suspensi kuman *Staphylococcus aureus* diambil pada satandart Mac Farland I sebanyak 1 mata ose dan dicampurkan suspensi ke dalam masing-masing konsentrasi secara acak.
4. Tabung ditutup kembali dengan kapas berlemak
5. Dinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Hari Kedua Pemeriksaan:

1. Masing-masing tabung diamati , apakah terjadi kekeruhan atau tidak.

2. Konsentrasi terkecil diambil yang mulai terlihat keruh, dan diuji kembali ke media padat *Manitol Salt Agar* (MSA) dengan tujuan memastikan apakah kuman tersebut adalah *Staphylococcus aureus*.
3. Ose bulat dipanaskan diatas nyala api spirtus, diambil 1 mata ose kuman yang ada pada konsentrasi terkecil tadi.
4. Media padat ditanam dengan cara digoreskan dipermukaan media.
5. Diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 24 jam.

Hari Ketiga Pemeriksaan:

1. Diamati hasil pada media padat apakah terbentuk koloni yang mengidentifikasi kuman tersebut adalah *Staphylococcus aureus*.
2. Konsentrasasi terkecil dicatat dan jumlah koloni dihitung
3. Hasil yang di amati sebagai data. dicatat

### 3.7. Tabulasi Data

Data yang diperoleh ditabulasikan sebagai berikut:

**Tabel 3.1. Contoh tabulasi data hasil pemeriksaan**

Pengulangan	Konsentrasi (%)				
	100%	80%	60%	40%	20%
1					
2					
3					
4					
Total					
Rata-rata					
SD					

### **3.7.1. Metode Analisis Data**

Data yang diperoleh diuji menggunakan uji Anova dengan tingkat kesalahan  $\alpha$  (0,05) uji statistik menggunakan SPSS 16.