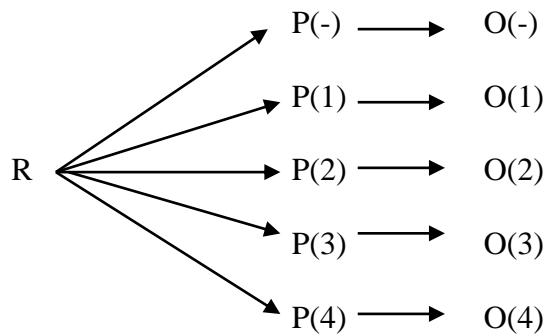


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh perasan daun ciplukan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan rancangan penelitian sebagai berikut :



Gambar 3.1 Desain Penelitian (Sholehah, 2014).

Keterangan :

R : Random

P (-) : Perlakuan yang tidak diberi perasan daun ciplukan

P (1) :Perlakuan dengan pemberian perasan daun ciplukan konsentrasi 100%

P (2) : Perlakuan dengan pemberian perasan daun ciplukan konsentrasi 75%

P (3) : Perlakuan dengan pemberian perasan daun ciplukan konsentrasi 50%

- P (4) : Perlakuan dengan pemberian perasan daun ciplukan konsentrasi 25%
- O (-) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan tanpa pemberian perasan daun ciplukan
- O (1) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian perasan daun ciplukan konsentrasi 100%
- O (2) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian perasan daun ciplukan konsentrasi 75%
- O (3) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian perasan daun ciplukan konsentrasi 50%
- O (4) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian perasan daun ciplukan konsentrasi 25%

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi Penelitian

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

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 Aziz (2012), hasil pengulangan sebagai berikut :

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

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 15 + 4$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 19 : 4$$

$$n \geq 4,75 \sim 5$$

Keterangan :

n : Jumlah pengulangan

k : Perlakuan

3.3 Lokasi dan Waktu penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Universitas Muhammadiyah Surabaya Jalan Sutorejo 59 Surabaya, sedangkan pemeriksaan dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2016 sampai bulan Juli 2017, sedangkan waktu pemeriksaan dilaksanakan pada bulan Juni 2017.

3.4 Variabel dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Perasan daun ciplukan
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 Variabel

1. Perasan daun ciplukan dikategorikan menjadi berbagai konsentrasi yaitu : 100%, 75%, 50%, 25%, dan 0% (sebagai kontrol).
2. Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ditetapkan berdasarkan jumlah koloni dalam media MSA. Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dalam penelitian ini berupa angka yang menunjukkan banyaknya koloni *Staphylococcus aureus* (pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ditetapkan berdasarkan metode 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 Farland I*, tiap konsentrasi volume perasan daun ciplukan 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 perhitungan Angka Lempeng Total (ALT). Langkah - langkah pemeriksaanya 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 ciplukan 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 I

1. Alat

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

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah : HCl, H₂SO₄ 1%, BaCl₂ 1%, NaOH, Aquadest steril.

3. Prosedur

1. Tabung steril disiapkan kemudian membuat perbandingan antara BaCl 1% : H₂SO₄ 1 % sebesar 1 : 9

2. Pipet 0,1 ml BaCl 1% kemudian ditambah 9,9 ml H₂SO₄ 1%
3. Dihomogenkan dengan cara kocok pelan tabung

3.5.2.2 Prosedur Pembuatan Suspensi Kuman

1. Alat

Alat yang digunakan adalah tabung steril dan ose bulat.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah Pz steril dan biakan murni *Staphylococcus aureus*.

3. Prosedur

1. Tabung steril disiapkan lalu masukkan Pz (NaCl 0,85%) steril.
2. Kuman diambil dari biakan *Staphylococcus aureus* murni yang sudah ditanam di media NAS dengan ose steril.
3. Ose steril yang sudah ada kumannya dicelupkan pada tabung yang berisi Pz.
4. Warna suspensi kuman dibandingkan dengan standart Mc Farlan I.
5. Apabila warna kurang keruh, maka menambahkan kuman dengan ose steril dan apabila terlalu keruh menambahkan Pz hingga warnanya sama dengan standar Mc Farlan I.

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 digunakan adalah : Aquadest

3. Prosedur

1. Pipet 0.1 ml dan filler disiapkan serta tabung.
2. Aquadest 0.1 ml dipipet, kemudian menuangnya ke dalam tabung.
3. Api spirtus dinyalakan.
4. 1 mata ose air yang sudah dituang ke dalam tabung diambil kemudian ose tersebut dipanaskan diatas api spirtus, lakukan berulang-ulang sampai air dalam tabung habis.
5. Didapatkan 48 mata ose air tersebut habis.

3.5.2.4 Prosedur Pembuatan Media Nutrient Agar Plate (NAP)

1. Alat

Alat yang digunakan adalah :

- Plate
- Timbangan neraca analitik
- Cawan petri
- Pipet pasteur
- Autoclave
- Kain kasa steril (penyaring)
- Pemanas air (water bath)
- Inkubator
- Gelas ukur
- Rak tabung

- Api spirtus
- Kaki tiga
- Erlenmeyer
- Ose bulat dan jarum
- Kertas Ph

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah :

- Media NAP
- Aquadest steril
- NaOH
- HCl

3. Prosedur

1. Media NA (Nutrien Agar) dihitung.
2. Alat dan bahan yang digunakan disiapkan.
3. Bahan (media NA) ditimbang sesuai dengan perhitungan menggunakan timbangan.
4. Sampel NA dimasukkan ke beaker glass kemudian ditambahkan dengan aquades.
5. Sampel dilarutkan dengan cara dipanaskan sampai larut sempurna.
6. Larutan yang sudah dipanaskan diangkat kemudian mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam – suam.

7. PH diukur sampai 7.4, jika terlalu asam ditambahkan dengan NaOH 0.1 N, sedangkan jika terlalu basa ditambahkan dengan HCL 0.1N sampai pH nya 7.4.
8. Erlenmeyer ditutup dengan kapas berlemak dan disteril dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
9. Setelah turun dari autoclave, dituang ke dalam plate yang steril.
10. Didiamkan sampai terlihat padat dan menyimpannya ke almari es. (sumber: Sumarsono, 1996)

3.5.2.5 Prosedur Pembuatan Media Manitol Salt Agar (MSA)

1. Alat

Alat yang digunakan adalah : plate, timbangan neraca analitik, cawan petri, pipet pasteur, autoclave, kain kasa steril (penyaring), pemangas air (water bath), inkubator, gelas ukur, pengaduk, rak tabung, api spirtus, kaki tiga, filler, erlenmeyer, ose, pipet ukur, dan kertas Ph.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah : Media MSA, aquadest steril, NaOH, HCl.

3. Prosedur

1. Alat dan bahan yang dibutuhkan disiapkan.
2. Perhitungan dilakukan terhadap jumlah bahan/media MSA yang dibutuhkan:

Membuat MSA (25 plate, @ ± 20 ml → 500 ml)

$$\text{Komposisi MSA } 108 \text{ gr per } 1 \text{ liter} \longrightarrow 108 \text{ gr} \times \frac{500 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 90 \text{ ml}$$

3. Penimbangan bahan dilakukan sesuai dengan yang diperlukan yaitu 90 gr menggunakan timbangan.
4. Volume aquadest yang dibutuhkan diukur yaitu sebanyak 500 ml menggunakan 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 kemudian didinginkan dengan air yang sudah disiapkan di baskom sampai suam – suam.
8. PH diukur yaitu 7.2 -7.4, jika pH terlalu asam ditambahkan NaOH 0.1 N jika terlalu basa ditambahkan HCL 0.1 N sampai pH yang telah ditentukan.
9. Larutan yang ada di erlenmeyer ditutup dengan kapas berlemak dan bungkus dengan koran serta mengikatnya dengan karet.
10. Sterilisasi di autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit bersama dengan plate yang dibutuhkan serta alat – alat yang perlu disteril.
11. Setelah turun dari autoclave, dituangkan ke dalam plate yang steril sampai rata ± 17 ml secara steril dan dekat dengan api.

12. Didiamkan sampai terlihat padat dan menyimpannya ke lemari es.

3.5.3 Prosedur Pembuatan Konsentrasi Perasan Daun Ciplukan

Prosedur pembuatan konsentrasi perasan daun ciplukan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Daun ciplukan di timbang sebanyak 100 gram.
2. Daun ciplukan di cuci hingga bersih, setelah itu ditumbuk atau di blender sampai benar – benar halus.
3. Daun ciplukan yang sudah halus tadi disaring dengan kasa berlapis yang steril, menyaring sampai benar – benar bersih.
4. Dicentrifuge kembali perasan tadi ditabung yang steril sehingga didapatkan perasan yang benar – benar jernih.
5. 1 mata ose perasan yang sudah jernih secara steril diambil, kemudian ditanam ke media NAP, dengan cara menggoreskannya di permukaan media.
6. Inkubasi selama 24 jam 37° C.
7. Setelah itu diamati, jika tidak terjadi pertumbuhan kuman berarti perasan daun ciplukan tadi sudah benar – benar steril. Namun jika pada media NAP terdapat pertumbuhan kuman berarti perlu dilakukan proses tindalisasi, yaitu :
 - a. Perasan daun ciplukan dipanaskan dengan waterbath pada suhu 90°C selama 15 menit.
 - b. Kemudian diletakkan di inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.

- c. Ditanam kembali perasan daun ciplukan yang sudah melalui proses tindalisasi di media NAP dan menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37°C.
8. Membuat konsentrasi 100%, 75%, 50%, 25%, dan Pz steril (0%), yaitu Konsentrasi 100% : Tabung 1 mengisi 1 ml perasan awal, sebagai konsentrasi 100%
- Konsentrasi 75% : Pada tabung 2 mengisi 0,25 ml Pz steril kemudian menambahkan perasan daun ciplukan dari konsentrasi 100% sebanyak 0,75 ml, menghomogenkan.
- Konsentrasi 50% : Pada tabung 3 mengisi 0,5 ml Pz steril menambahkan perasan daun ciplukan dari konsentrasi 100% sebanyak 0,5 ml, menghomogenkan.
- Konsentrasi 25% : Pada tabung 4 mengisi 0,75 ml Pz steril menambahkan perasan daun ciplukan dari konsentrasi 100% sebanyak 0,25 ml, menghomogenkan.
- Konsentrasi 0% : Pada tabung 5 mengisi 1 ml Pz steril tanpa memberi tambahan perasan daun ciplukan.

3.5.4 Prosedur pemeriksaan sampel :

3.5.4.1 Hari pertama pemeriksaan :

1. Alat dan bahan disiapkan.
2. Api spirtus dinyalakan dengan korek api.
3. Masing-masing tabung diberi label sesuai dengan konsentrasinya, yaitu konsentrasi 100%, 75%, 50%, 25%, dan 0% (sebagai kontrol).

4. Ose bulat dipanaskan diatas nyala api spirtus, mengambil suspensi kuman *Staphylococcus aureus* sebanyak 1 mata ose dan membiakkannya di tabung berlabel 100% dengan cara menggesekkan ose ke dinding permukaan media cair sebanyak 3 kali. Kemudian mengambil lagi 1 mata ose kuman *Staphylococcus aureus* pada suspensi kuman dan membiakkannya pada tabung berlabel 75%, begitu seterusnya sampai pada tabung kontrol. Semua perlakuan dilakukan secara steril dekat dengan api, kemudian kekeruhan disamakan dengan standart mac farland I.
5. Tabung ditutup kembali dengan kapas berlemak
6. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.5.4.2 Hari kedua :

1. Masing – masing tabung diamati, apakah terjadi kekeruhan atau tidak.
2. Setelah itu diambil konsentrasi terkecil yang mulai terlihat keruh, dan menguji kembali ke media padat (MSA) dengan tujuan memastikan apakah kuman tersebut adalah *Staphylococcus aureus*.
3. Ose bulat dipanaskan diatas nyala api spirtus, mengambil 1 mata ose kuman yang ada pada konsentrasi terkecil tadi.
4. Ditanam di media padat dengan cara meggoreskannya dipermukaan media.
5. Inkubasi kembali pada suhu 37°C. Selama 24 jam.

3.5.4.3 Hari ketiga :

1. Hasil diamati pada media padat apakah terbentuk koloni yang mengidentifikasi kuman tersebut adalah *Staphylococcus aureus*.
2. Konsentrasi terkecil dicatat dan menghitung jumlah koloni dengan cara menggunakan alat koloni counter.
3. Hasil yang diamati dicatat sebagai data.

3.5.5 Tabulasi Data

Tabel 3.1 : Contoh tabulasi data

No	Kode Sampel	Jumlah Koloni Bakteri Stapylococcus aureus pada Perasan Daun Ciplukan (<i>Physalis angulate</i>)				
		Kontrol 0% (tanpa perasan)	25%	50%	75%	100%
1	P1					
2	P2					
3	P3					
4	P4					
5	P5					
Jumlah						
Rata – rata						

3.6 Metode Analisis Data

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