

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah deskriptif, yaitu mencari gambaran kuman *Staphylococcus aureus* pada sikat gigi penderita karies gigi yang dipakai berulang.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi

Populasi adalah keseluruhan atau himpunan obyek dengan ciri yang sama (Zainuddin, 2000 dalam Pratiwi, 2015). Pada penelitian ini populasinya adalah sikat gigi penderita karies gigi di RT 003 RW 010 Kelurahan Pejagan Kota Bangkalan yang berjumlah 33 orang.

3.2.2 Sampel

Sampel adalah bagian dari populasi yang dipilih dengan sampling tertentu untuk bisa memenuhi atau mewakili populasi. Sampel pada penelitian ini adalah sikat gigi sebanyak 30 sampel diambil secara acak (Random).

Besar sampel adalah banyaknya anggota yang akan dijadikan sampel (Nursalam, 2008). Pada penelitian ini mengacu pada populasi kecil atau kurang dari 10.000, maka rumus yang digunakan adalah sebagai berikut :

$$n = \frac{N}{1 + N(d)^2}$$

Keterangan :

n = Besar sampel

N = Besar Populasi

d = Ketetapan yang diinginkan

(Nursalam, 2008)

Untuk penelitian ini jumlah N = 33 dengan nilai kemaknaan 0,05 perhitungan sampel sebagai berikut :

$$n = \frac{33}{1 + 33 (0,05)^2}$$

$$n = \frac{33}{1 + 0,0825}$$

$$n = \frac{33}{1,0825}$$

$$n = 30,48499$$

$$n = 30 \text{ sampel}$$

Berdasarkan hasil perhitungan diatas maka besarnya sampel kurang lebih 30 sampel.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Lokasi pengambilan sampel dilakukan di RT 003 RW 010 Kelurahan Pejagan Kota Bangkalan. Sedangkan lokasi pemeriksaan sampel penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analis Kesehatan, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2017 sampai dengan bulan Juli 2018. Sedangkan waktu pemeriksaan sampel penelitian dilaksanakan pada bulan April 2018.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini adalah pertumbuhan kuman *Staphylococcus aureus* pada sikat gigi penderita karies gigi.

3.4.2 Definisi Operasional

Pertumbuhan kuman *Staphylococcus aureus* adalah ditetapkan berdasarkan ada atau tidaknya kuman *Staphylococcus aureus* pada sikat gigi melalui pemeriksaan laboratorium yang dibedakan menjadi :

Positif, (+) : terdapat kuman *Staphylococcus aureus* apabila pada media MSA terjadi perubahan warna, pada media NAS terjadi pigmen kuning emas, pada tes katalase terjadi gelembung udara gas (O₂), dan pada tes koagulase terjadi aglutinasi.

Negatif, (-) : tidak terdapat kuman *Staphylococcus aureus* apabila pada media MSA tidak terjadi perubahan warna, pada media NAS tidak terjadi pigmen kuning emas, pada tes katalase tidak terjadi gelembung udara gas (O₂), dan pada tes koagulase tidak terjadi aglutinasi.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data tentang pertumbuhan kuman *Staphylococcus aureus* pada sikat gigi diperoleh melalui observasi/ pengamatan melalui uji laboratorium dengan tahapan-tahapan sebagai berikut :

3.5.1 Perizinan Penelitian

1. Menyerahkan surat izin kepada Ketua RT 003 Kelurahan Pejagan Kota Bangkalan
2. Membuat data nama responden penelitian
3. Setiap warga yang menderita karies gigi diminta untuk mengisi questioner.
4. Setelah warga mengisi questioner dan bersedia, sikat gigi warga yang telah dipakai berulang, diambil peneliti. Dan diganti dengan sikat gigi yang baru.
5. Setelah sikat gigi terkumpul, maka sikat gigi segera dimasukkan ke kantong plastik steril dan dibawa ke laboratorium untuk diperiksa.

3.5.2 Tahapan Pemeriksaan Sampel

1. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan dalam pemeriksaan ini adalah Kantong Plastik Steril, Mikroskop, Tabung centrifuge(besar), Autoclave, Lampu spirtus, Neraca analitik, Cawan petri, Objek glass, minyak imersi, incubator, rak tabung, tabung reaksi, Pengaduk, Ose bulat, Pipet ukur, Pipet pasteur, Jembatan Pewarnaan.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam pemeriksaan ini adalah Sikat Gigi, Pz/NaCl, H₂O₂ 3%, Plasma citrat, Media *Blood Agar Plate* (BAP), Media *Manitol Salt*

Agar (MSA), Media *Nutrient Agar Sland* (NAS), Pewarnaan Kristal violet, Lugol, Alcohol, Safranin.

2. Prosedur Kerja

a. Hari Pertama

1) Perlakuan Sampel Sikat Gigi

- a) Memasukkan sikat gigi kedalam larutan NaCl yang telah disediakan pada tabung reaksi besar sebanyak 10cc, sehingga semua bulu sikat gigi terendam.
- b) Membiarkan sikat gigi terendam sambil gerak-gerakkan agar mikroorganisme yang ada pada sikat gigi berpindah ke larutan NaCl.
- c) Mengambil sikat gigi setelah ± 10 menit.
- d) Mengambil larutan NaCl pada tabung reaksi besar 0,1 ml dengan pipet yang steril kemudian menuang ke media agar dan menyebarkan dengan ose bulat yang sudah steril.

(Hasibuan, 2015).

2) Penanaman Pada Media BAP (*Blood Agar Plate*)

Prosedur kerja :

- a) Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
- b) Menyalakan api spirtus dengan korek api.
- c) Kemudian steril ose bulat dan dinginkan
- d) Mengambil larutan NaCl pada tabung reaksi besar, kemudian memasukkan ose bulat kedalam NaCl. Lalu menyebarkan kuman dari NaCl dengan ose bulat ke media BAP. Jangan lupa beri tanda bagian bawahnya kemudian strikkan pada seluruh media dengan metode T

- e) Melakukan semua perlakuan secara steril dekat dengan api
- f) Menginkubasi media BAP yang telah ditanami, selama 24 jam dengan suhu 37°C

b. Hari Kedua

1) Identifikasi Kuman *Staphylococcus*

Hasil : Pada media BAP (+) Kuman Menghemolisa Darah

Prosedur kerja :

- a) Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
- b) Mewarnai media BAP yang telah diinkubasi dan terdapat koloni dengan pewarnaan gram untuk mencari kuman *Staphylococcus*.
- c) Menyiapkan obyek glass, Pz, ose, reagen, dan api spirtus
- d) Menyalakan api spirtus dengan korek api.
- e) Memanaskan ose bulat diatas nyala api spirtus dan teteskan Pz lalu memasukkan ose ke dalam tabung Pz lalu menempelkan ose diatas obyek glass
- f) Kemudian memflaming ose dan tabung Pz
- g) Lalu memasukkan ose ke dalam media BAP dan menempelkan pada bakteri (jangan cari yang bergerombol)
- h) Menyebarkan diatas obyek glass yang terdapat Pz, diamkan pada suhu kamar
- i) Setelah kering, memfiksasi preparat sebanyak 3x
- j) Setelah memfiksasi, lakukan pewarnaan pada preparat
- k) Menggenangi preparat dengan Carbol Gentian Violet selama 1 menit

- l) Membilas preparat dengan air secukupnya, kemudian menggenangi dengan Lugol selama 1 menit
- m) Lalu menggenangi preparat dengan Alkohol selama ± 30 detik, setelah itu membilas preparat dengan air mengalir secukupnya, lalu genangi dengan Safranin selama 1 menit
- n) Mengamati dengan mikroskop pembesaran 10x lensa okuler 100x lensa obyektif (preparat ditetesi dengan oil imersi).

Hasil : Pada pewarnaan gram positif kuman berbentuk Coccus (bulat) susunan seperti Anggur (*Staphylococcus*).

2) Penanaman Pada Media NAS (*Nutrient Agar Sland*) dan MSA (*Manitol Salt Agar*)

Prosedur kerja NAS :

- a) Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
- b) Memanaskan ose bulat diatas nyala api spirtus agar ose steril.
- c) Kemudian memasukkan ose kedalam BAP.
- d) Kemudian menempelkan pada koloni yang sama/ koloni sisa dari pewarnaan.
- e) Flamming NAS, kemudian memiringkan NAS lalu masukkan ose dan menempelkan ose pada bagian dasar NAS kemudian menggoreskan ose dari dasar tabung ke atas tabung.
- f) Kemudian menutup kembali tabung NAS dengan kapas berlemak.
- g) Menginkubasi media NAS yang telah ditanami kuman, selama 24 jam dengan suhu 37°C.

Prosedur kerja MSA :

- a) Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
- b) Memanaskan ose bulat diatas nyala api spirtus agar ose steril
- c) Kemudian memasukkan ose kedalam BAP.
- d) Kemudian menempelkan ose pada koloni yang sama/ koloni sisa dari pewarnaan.
- e) Menempelkan Ose yang berisi kuman pada media MSA yang telah diberi tanda pada bagian bawah, kemudian menggoreskan ose pada media dengan metode T.
- f) Menginkubasi media MSA yang telah ditanami kuman selama 24 jam dengan suhu 37°C.

c. Hari Ketiga

- 1) Identifikasi *Staphylococcus aureus*

Prosedur kerja :

- a) Pengamatan hasil media MSA dan NAS

Pengamatan ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan kuman memfermentasi karbohidrat dan kemampuan hidup pada kadar garam yang tinggi.

Hasil : Pada media MSA (+) kuman memecah Manitol terjadi perubahan warna pada media dari merah menjadi kuning.
--

Hasil : Pada media NAS (+) kuman dengan pigmen kuning emas.

2) Test Katalase :

Test Katalase bertujuan untuk membedakan *Staphylococcus* dan *Streptococcus*.

Prinsip : Kuman mampu menghasilkan enzim katalase dengan memecah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 .

Prosedur :

- a) Menyiapkan reagen H_2O_2 3%
- b) Menyiapkan obyek glass yang bebas dari lemak dan steril ose bulat kemudian dinginkan
- c) Mengambil 1 tetes H_2O_2 3% dan teteskan pada obyek glass
- d) Mengambil bakteri pada NAS secara steril, campurkan H_2O_2 3% dengan kuman

Hasil : (+) Apabila terjadi gelembung udara gas (O_2), kuman merupakan genus *Staphylococcus*.

3) Test Koagulase

Test Koagulase bertujuan untuk membedakan kuman *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus* lain yang bukan pathogen. *Staphylococcus aureus* menghasilkan enzim koagulase sedangkan *Staphylococcus* lainnya tidak.

Prinsip : Protein yang menyerupai enzim yang apabila ditambahkan dengan sitrat mampu menggumpalkan plasma akibat adanya suatu faktor yang terdapat didalam serum. Faktor serum bereaksi

dengan koagulase untuk menghasilkan enterase dan menyebabkan aktivitas pembekuan.

Prosedur :

- a) Mengencerkan plasma citrat 1:5, yaitu 1ml plasma citrat kemudian ditambah 4ml pz/ NaCl
- b) Menyiapkan pz steril dan plasma yang sudah diencerkan dengan pz (1:5)
- c) Menyiapkan obyek glass yang bebas dari lemak dan steril ose bulat kemudian dinginkan
- d) Mengambil pz steril dengan ose bulat dan meletakkan pada obyek glass
- e) Mengambil plasma yang sudah diencerkan 1:5 dengan ose bulat
- f) Mengambil kuman secara steril pada media NAS dan mencampurkan sampai rata

Hasil : (+) Apabila terjadi aglutinasi, kuman bersifat Patogen.

(Tim Mikrobiologi 2, 2016).

3.5.3 Tabulasi Data

Data yang diperoleh ditabulasikan sebagai berikut :

Tabel 3.1 Contoh tabulasi data hasil pemeriksaan sikat gigi

No	Kode Sampel	Hasil pertumbuhan kuman <i>Staphylococcus aureus</i>				Kesimpulan
		MSA	NAS	Katalase	Koagulase	
1						
2						
3						
4						
5						
s/d						
30						

Keterangan :

Positif (+) : Terdapat kuman *Staphylococcus aureus*

Negatif (-) : Tidak terdapat kuman *Staphylococcus aureus*

3.6 Metode Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian kuman *Staphylococcus aureus* dikumpulkan kemudian ditabulasikan dalam bentuk tabel dan disajikan secara persen (%).