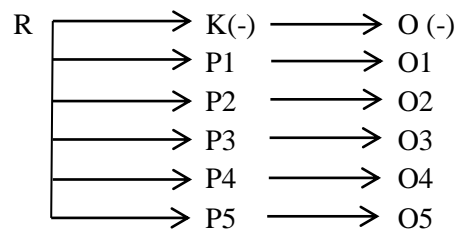


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* pada Perasan Jeruk Lemon dengan rancangan penelitian sebagai berikut :



Gambar 3.1 : Rancangan Penelitian (Zainudin, 2006)

Keterangan :

R : random atau acak

K (-) : Perlakuan tanpa pemberian perasan jeruk lemon atau kontrol

P1 : Perlakuan dengan pemberian perasan jeruk lemon konsentrasi 60%

P2 : Perlakuan dengan pemberian perasan jeruk lemon konsentrasi 70%

P3 : Perlakuan dengan pemberian perasan jeruk lemon konsentrasi 80%

P4 : Perlakuan dengan pemberian perasan jeruk lemon konsentrasi 90%

P5 : Perlakuan dengan pemberian perasan jeruk lemon konsentrasi 100%

O (-) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan tanpa pemberian perasan jeruk lemon

- O1 : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian perasan jeruk lemon konsentrasi 60%
- O2 : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian perasan jeruk lemon konsentrasi 70%
- O3 : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian perasan jeruk lemon konsentrasi 80%
- O4 : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian perasan jeruk lemon konsentrasi 90%
- O5 : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian perasan jeruk lemon konsentrasi 100%

3.2 Populasi Sampel Dan Sampling

3.2.1 Populasi Penelitian

Pada penelitian ini, populasi yang diambil adalah dari biakan bakteri *Staphylococcus aureus* yang dibeli di Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya.

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah biakan murni *Staphylococcus aureus* yang dibeli di BBLK. Untuk setiap perlakuan dalam penelitian dilakukan masing masing sebanyak 5 perlakuan dan 5 pengulangan. Sehingga jumlah sampel yang digunakan yaitu 25 juta kuman. Berasal dari 1 mata ose (standart Mc Farland sama dengan 1 juta kuman/ml). Sehingga dalam 25 plate sampel yang digunakan

sebanyak 25 juta kuman. Dilakukan 5 kali pengulangan didasarkan dari rumus $(R-1)(T-1) \geq 15$, maka akan diperoleh jumlah ulangan sebagai berikut :

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

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

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

$$4R - 4 \geq 15$$

$$4R = 15 + 4$$

$$4R = 19$$

$$R = 19/4$$

$$R = 4,75$$

$$R = 5 \text{ (Hidayat, 2010)}$$

Keterangan :

R : Replikasi atau Pengulangan

T : Perlakuan

3.2.3 Teknik Sampling

Teknik sampling dalam penelitian ini adalah kuman yang dibeli di BBLK berupa biakan murni kuman *Staphylococcus aureus* yang dikirim ke Laboratorium Universitas Muhammadiyah Surabaya dengan menggunakan media transport dan kotak pengiriman kuman yang rapat dan steril, yaitu dengan menggunakan tabung seperti paralon yang ujungnya tertutup rapat, kuman disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 10⁰C sampai dilakukannya penelitian.

3.3 Lokasi Dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analis Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya, Jl. Sutorejo No. 59 Surabaya, Jawa Timur.

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Desember 2016 sampai dengan bulan Juli 2017, sedangkan waktu pemeriksaan dilakukan pada bulan April 2017.

3.4 Variabel Penelitian dan Devinisi Operasional Variabel

3.4.1 Identifikasi Variabel

- 3.4.1.1 Variabel bebas : Konsentrasi perasan jeruk lemon
- 3.4.1.2 Variabel terikat : Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*
- 3.4.1.3 Variabel control : Jumlah sampel yang digunakan setiap perlakuan, lama inkubasi, suhu inkubasi.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

1. Konsentrasi perasan jeruk lemon adalah konsentrasi yang dibutuhkan untuk mempengaruhi perkembangbiakan bakteri. Konsentrasi tersebut dimulai pada konsentrasi 60 %, 70%, 80%, 90%, dan 100%.
2. Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* adalah fase berkembangbiaknya bakteri *Staphylococcus aureus* yang diakibatkan oleh kenaikan suhu dan lama inkubasi pada bakteri tersebut.

3. Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* terdapat 3 fase yaitu fase lag (fase penyesuaian), fase logaritma atau eksponensial, fase stasis atau stasioner, dan fase penurunan atau kematian.
4. Jumlah sampel adalah takaran sampel yang digunakan pada setiap perlakuan. Jumlah sampel tersebut adalah 40 µl pada setiap lubang sumuran.
5. Lama inkubasi adalah waktu yang dibutuhkan untuk perkembangbiakan bakteri. Lama inkubasi yang digunakan pada pemeriksaan ini adalah 24 jam.
6. Suhu adalah temperatur yang digunakan untuk perkembangbiakan suatu bakteri. Suhu yang digunakan adalah pada suhu 37 °C.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data diperoleh dengan cara observasi langsung, melalui uji laboratorium dengan metode difusi secara sumuran.

3.5.1 Alat

Tabung reaksi, plate, gelas ukur, erlenmeyer, beaker glass, pipet tetes, bunsen, kain kasa steril, autoclave, etiket, lemari es, penggaris, inkubator, spatula, neraca penimbangan, pipet ukur, filler, mikropipet, yellow tip, kaki tiga, kawat kasa, corong kaca, rak tabung reaksi, pH media. Sebelum dipergunakan, alat dan bahan yang akan digunakan disterilisasi didalam autoclave pada suhu 121⁰C selama 15 menit.

3.5.2 Bahan

Buah jeruk lemon (berbagai konsentrasi), suspensi kuman *Staphylococcus aureus*.

3.5.3 Reagen Pemeriksaan

BaCl 1%, H₂SO₄ 1%, NaCl 0,9%, dan PZ steril

3.5.4 Media

1. Pembuatan Media *Mueller Hilton* (MH)

Cara pembuatan :

Membuat *Mueller Hilton* (MH) 27 plate, @ plate ± 20 ml

Komposisi *Mueller Hilton* (MH) :

$$34 \text{ gram/liter} = \frac{34 \text{ gr} \times 540 \text{ ml}}{1000} = 18,36 \text{ gr} \approx 18 \text{ gr}$$

- a. Disiapkan alat dan bahan yang diperlukan
- b. Media ditimbang menggunakan timbangan sesuai dengan perhitungan yaitu 18 gr
- c. Media yang sudah ditimbang dilarutkan dengan aquadest sebanyak 540 ml
- d. Media yang sudah dilarutkan tersebut diatas dipanaskan menggunakan bunsen sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih
- e. Larutan yang sudah dipanaskan diangkat dan didinginkan sampai suam-suam kuku kira-kira suhunya 50⁰C
- f. pH diukur sampai 7.6 apabila terlalu basa ditambahkan HCl 0.1 N dan apabila terlalu asam ditambahkan NaOH 0.1 N.
- g. Mulut tabung erlenmeyer ditutup dengan kain kasa dan dibungkus dengan koran

- h. Media disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit
- i. Setelah media turun dari autoclave tuang ke plate secara steril
- j. Media didiamkan sampai padat dan disimpan dalam lemari es
(Soewarsono, 1993, Petunjuk Pembuatan Media Dan Reagensia).

2. Prosedur Pembuatan Suspensi Kuman

Pembuatan suspensi kuman sesuai dengan metode Mc. Farland :

- a. Disiapkan 2 tabung steril, 1 untuk suspensi dan yang 1 untuk standart Mc. Farland
- b. Cara membuat standar Mc. Farland yaitu :
 - a) Dibuat perbandingan antara BaCl 1% dengan H_2SO_4 1% dengan perbandingan 1 : 9
 - b) Dipipet 0.1 ml BaCl 1% + 9.9 ml H_2SO_4 1%
 - c) Dihomogenkan dengan cara kocok pelan tabung.
- c. Cara membuat suspensi kuman yaitu :
 - a) Tabung steril diisi dengan PZ \pm 3 ml
 - b) Kuman dari biakan *Staphylococcus aureus* murni diambil dengan menggunakan lidi kapas steril
 - c) Lidi kapas steril yang sudah ada kumannya dicelupkan pada tabung yang berisi PZ steril
 - d) Dibandingkan warna suspensi kuman dengan Mc. Farland

- e) Apabila warna kuning keruh, maka ditambahkan kuman dengan lidi kapas dan apabila terlalu keruh ditambahkan PZ steril hingga warnannya sama dengan standart Mc. Farland
- f) Jika sudah sama, maka telah didapatkan kuman dengan jumlah 300.000.000 kuman / ml
- g) Suspensi kuman siap digunakan (Winingsih, W. 2007)

3.5.5 Prosedur Pembuatan Kosentrasi Jeruk Lemon

- a. Konsentrasi 100% : Tabung 1 diisi 2 ml perasan jeruk lemon, ini sebagai konsentrasi 100%
- b. Konsentrasi 90% : Tabung 2 diisi 1 ml perasan jeruk lemon ditambahkan 1 ml Pz steril kemudian dihomogenkan
- c. Konsentrasi 80% : tabung 3 diisi 1 ml yang berasal dari konsentrasi 90%, ditambahkan 1 ml Pz steril kemudian dihomogenkan
- d. Konsentrasi 70% : Tabung 4 diisi 1 ml yang berasal dari konsentrasi 80%, ditambahkan 1 ml PZ steril kemudian dihomogenkan
- e. Konsentrasi 60% : Tabung 5 diisi 1 ml yang berasal dari konsentrasi 70%, ditambahkan 1 ml PZ steril kemudian dihomogenkan

- f. Konsentrasi 0% : Pada tabung 6 diisi 1 ml Pz steril tanpa diberi tambahan perasan jeruk lemon.

(Erywiyatno, L. Dkk, 2012, Analisis Kesehatan Sains)

3.5.6 Prosedur Pemeriksaan Sampel

Hari pertama pemeriksaan

- a. Disiapkan alat dan bahan yang digunakan.
- b. Api spirtus dinyalakan dengan korek api.
- c. Tabung diisi dengan pz steril \pm 5ml.
- d. Kuman *Staphylococcus aureus* diambil pada biakan murni dengan lidi kapas steril.
- e. Lidi kapas steril yang sudah ada kumannya dicelupkan pada tabung yang berisi pz steril.
- f. Kekeruhan suspensi kuman dibandingkan dengan standard Mc. Farland 0,5.
- g. Apabila suspensi kurang keruh, maka tambahkan kuman dengan lidi kapas steril dan apabila terlalu keruh tambahkan pz steril hingga kekeruhannya sama dengan standard Mc. Farland 0,5.
- h. Lidi kapas steril diambil, dicelupkan pada suspensi yang telah distandarisasi dengan Mc. Farland 0,5.
- i. Suspensi kuman diambil dengan menggunakan swab steril, kemudian ditanam di atas permukaan media *Mueller Hilton* (MH) dengan cara digoreskan secara perlahan dan merata ke semua permukaan media, dibiarkan 3-5 menit.

- j. Sumuran dengan diameter 6 mm diletakkan di atas media *Mueller Hilton* (MH), dibuat lubang sumuran pada media *Mueller Hilton* (MH).
- k. 40 µl perasan jeruk lemon diambil dengan setiap konsentrasi dan dimasukkan di setiap lubang sumuran. Diletakkan 40 µl aquadest steril di satu lubang sumuran untuk kontrol negatif.
- l. Diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37⁰ C (Miawan, Galih, 2014).

Hari Kedua Pemeriksaan

- a. Pada media *Mueller Hilton* (MH) hasilnya diamati dengan menggunakan penggaris untuk mengukurnya.
- b. Zona beningyang bisa dihambat oleh perasan jeruk lemon diukur pada konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, dan 0% (kontrol).
- c. Konsentrasi terkecil dicatat sebagai daya hambat pertumbuhan kuman *Staphylococcus aureus*.
- d. Hasil yang diamati dicatat sebagai data (Waluyo, 2008).

3.6 Metode Analisa Data

Data pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh melalui uji laboratorium dengan menggunakan metode *difusi sumuran*. Data dikumpulkan dengan cara mengukur diameter daerah atau zona hambatan pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan penggaris dengan satuan milimeter (mm).

Tabel 3.1 Contoh tabulasi data hasil pemeriksaan Perasan Jeruk Lemon (*Cytrus limon burm f.*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*

Konsentrasi air perasan jeruk lemon	Diameter zona hambat pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i> pengulangan ke- (mm)					Rata-rata (mm)
	1	2	3	4	5	
60%						
70%						
80%						
90%						
100%						
Kontrol (-) Aquadest						

Data yang diperoleh dari uji laboratorium kemudian ditabulasi selanjutnya data diuji dengan menggunakan uji anova dengan tingkat kesalahan 5% ($\alpha=0.05$).