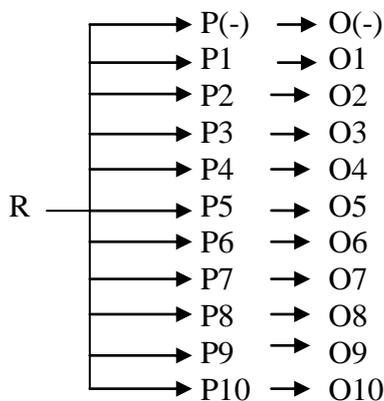


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan rancangan penelitian eksperimental dengan tujuan untuk mengetahui pada konsentrasi optimum perasan buah pinang dapat membunuh bakteri *Staphylococcus aureus*.



Gambar 3.1 : Rancangan Penelitian (Zainuddin, 2003)

Keterangan :

R : Random

P(-) : Perlakuan tanpa diberi perasan buah pinang (kontrol)

P1 : perlakuan konsentrasi perasan buah pinang 10 %

P2 : perlakuan konsentrasi perasan buah pinang 20 %

P3 : perlakuan konsentrasi perasan buah pinang 30 %

P4 : perlakuan konsentrasi perasan buah pinang 40 %

P5 : perlakuan konsentrasi perasan buah pinang 50 %

P6 : perlakuan konsentrasi perasan buah pinang 60 %

P7 : perlakuan konsentrasi perasan buah pinang 70 %

P8 : perlakuan konsentrasi perasan buah pinang 80 %

P9 : perlakuan konsentrasi perasan buah pinang 90 %

P10 : perlakuan konsentrasi perasan buah pinang 100 %

- O(-) : Observasi setelah perlakuan kontrol
- O1 : Observasi setelah diberi perlakuan 10%
- O2 : Observasi setelah diberi perlakuan 20%
- O3 : Observasi setelah diberi perlakuan 30%
- O4 : Observasi setelah diberi perlakuan 40%
- O5 : Observasi setelah diberi perlakuan 50%
- O6 : Observasi setelah diberi perlakuan 60%
- O7 : Observasi setelah diberi perlakuan 70%
- O8 : Observasi setelah diberi perlakuan 80%
- O9 : Observasi setelah diberi perlakuan 90%
- O10 : Observasi setelah diberi perlakuan 100%

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* di dalam media pertumbuhan. *Staphylococcus aureus* yang ditumbuhkan berasal dari biakan murni, diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Klinik (BBLK)

3.2.2 Sampel penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang dipindah dari biakan murni di media NAS. Dalam penelitian ini terdapat 10 perlakuan konsentrasi yang diambil dari perasan buah pinang dan 1 perlakuan sebagai kontrol. Dalam penelitian ini setiap perlakuan dilakukan masing-masing 3 kali pengulangan yang diperoleh berdasarkan rumus replikan yang ditentukan dengan rumus federer (1977) :

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

$$(R-1) 11 - 1 \geq 15$$

$$(R-1) 10 \geq 15$$

$$10R - 10 \geq 15$$

$$10R \geq 15 + 10$$

$$R \geq 25/10 = 2,5$$

$$R \geq 3 \quad (\text{Immi kamilatin nisa', 2012})$$

Keterangan :

T : banyaknya perlakuan

R : jumlah pengulangan

Sehingga seluruhnya ada 3 pengulangan x11 perlakuan = 33 unit percobaan. Setiap 1 unit percobaan memerlukan sampel sebanyak 1 ml suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* setara dengan neflometer Mac Farland 1 yang mengandung bakteri 3×10^8 CFU/ml.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan 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 Juni 2017, sedangkan waktu pemeriksaan dilaksanakan pada bulan April 2017.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

3.4.1 Variabel penelitian

- A. Variabel bebas : Konsentrasi perasan buah pinang
- B. Variabel terikat : Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*
- C. Variabel kontrol : Lama inkubasi, suhu, jumlah suspensi kuman *Staphylococcus aureus*, volume perasan buah pinang, sterilisasi.

3.4.2 Definisi operasional variabel

- A. Pemberian perasan buah pinang dalam penelitian ini dikategorikan menjadi :
 - a) Tanpa Pemberian perasan yaitu media pertumbuhan *S.aureus* tanpa diberi perasan buah pinang
 - b) Dengan Pemberian perasan, yaitu media pertumbuhan *S.aureus* diberi perasan dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100%
- B. Pertumbuhan *S.aureus*, dalam penelitian ini berupa angka yang menunjukkan jumlah koloni *S.aureus* di dalam media pertumbuhan (jumlah koloni/unit), ditetapkan berdasarkan metode pemeriksaan.
- C. Dalam penelitian ini yang harus di kontrol atau di kendalikan yaitu meliputi Lama inkubasi, suhu, jumlah suspensi kuman *Staphylococcus aureus*, volume perasan buah pinang, dan sterilisasi.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh dengan cara observasi secara langsung, yaitu dengan melalui uji Laboratorium. Pemeriksaan

jumlah koloni pada bakteri *Staphylococcus aureus* ini menggunakan metode Dilusi. Berikut ini adalah rangkaian langkah-langkah pemeriksaanya.

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 buah pinang dengan berbagai konsentrasi dan ditanam di media MSA. Pertumbuhan dilihat setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.5.2 Bahan Pemeriksaan

Dalam penelitian ini bahan pemeriksaan yang dibutuhkan adalah perasan buah pinang, suspensi kuman *Staphylococcus aureus*, akuades steril, pz steril, media NA, media MSA.

3.5.3 Reagen Pemeriksaan

Reagen yang diperlukan yaitu NaOH 0,1 N, HCL 0,1 N, BaCl₂1%, H₂SO₄1%.

3.5.4 Prosedur Pembuatan Suspensi Kuman

Prosedur :

Pembuatan suspensi kuman sesuai degan metode *Mac. Farland 1*

1. Menyiapkan 2 tabung steril, 1 untuk suspensi kuman dan 1 untuk standart *Mac Farland 1*
2. Prosedur pembuatan standart *Mac farland 1* yaitu :
 - a. Menyiapkan tabung reaksi yang sudah dibersihkan,

- b. Pipet 0,1 ml Barium Klorida (BaCl_2) 1% dan masukan kedalam tabung reaksi.
 - c. Pipet 9,9 ml Asam Sulfat (H_2SO_4) 1% masukan kedalam tabung yang berisi 0,1 ml Barium Klorida (BaCl_2) 1%.
 - d. Mencampurkan kedua larutan dalam tabung hingga homogen.
 - e. Didapatkan Standart *Mac Farland* 1 dan setara dengan jumlah bakteri 3×10^8 CFU/ml
3. Prosedur membuat suspensi kuman, yaitu :

Alat yang digunakan meliputi pipet pastur, pipet ukur, pipet volum, ose bulat, tabung reaksi, rak tabung, dan kertas garis standart *Mac Farland*

Bahan yang digunakan meliputi PZ steril dan biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus*.

Langkah kerja:

1. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
2. Memipet PZ steril \pm sebanyak 2 ml dan masukan kedalam tabung reaksi
3. Mengambil 1 mata ose biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus* dengan ose bulat kemudian memasukkannya kedalam tabung reaksi yang berisi PZ steril.
4. Menghomogenkan tabung reaksi tersebut dan membandingkan kekeruhan dengan standart *Mac Farland* 1 yang sudah dibuat.
5. Apabila didapat kekeruhan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* yang melebihi standart *Mac Farland* 1 maka perlu ditambahkan PZ steril. Tetapi jika kekeruhan kurang dari standart *Mac Farland* 1 maka perlu ditambahkan dengan biakan bakteri *Staphylococcus aureus*. Dilakukan

terus menerus sampai sesuai dengan standart *Mac Farland* 1 dimana sama dengan jumlah bakteri 3×10^8 CFU/ml kemudian suspensi di inkubasi

6. Menstandartkan ose yang akan dipakai dalam penelitian:
 - a. Menyiapkan pipet 0,1 ml dan filler serta tabung.
 - b. Memipet aquadest 0,1 ml kemudian tuang dalam tabung.
 - c. Menyalakan api spiritus
 - d. Mengambil 1 mata ose air yang sudah dituang kedalam tabung dan kemudian memanaskan ose tersebut diatas pembakar spiritus, lakukan berulang-ulang sampai air dalam tabung reaksi habis
 - e. Mencatat berapa kali mata ose mengambil air sampai habis
 - f. Didapatkan 10 mata ose air tersebut habis.

$$\frac{0,1 \text{ ml}}{34} = \frac{1}{340}$$

3.5.5 Prosedur Pembuatan Media NAP (Nutrient Agar Plate)

Alat yang digunakan adalah timbangan (neraca triple beam), pengaduk, pipet pasteur, pipet ukur, filler, erlenmeyer, gelas ukur, gelas arloji, plate, autoclave

Prosedur :

1. Melakukan perhitungan media NA (Nutrient Agar)

Membuat NAP (3 plate, @ ± 17 ml → $3 \times 17 = 51$ ml)

Komposisi NA 20 gr per 1 liter → $\frac{20 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}} \times 51 \text{ ml} = 1,02 \text{ gr}$

2. Menyiapkan semua alat dan bahan yang dibutuhkan
3. Menimbang media NA sebanyak 1,02 gr menggunakan timbangan

4. Mengukur volume aquadest sebanyak 51 ml menggunakan gelas ukur
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest yang sudah diukur volumenya tadi dalam erlenmeyer
6. Melarutkan di atas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih
7. Menunggu sampai suam-suam dengan cara merendam Erlenmeyer tadi dengan air dingin
8. Mengukur PH media tersebut sampai 7,2 apabila terlalu rendah tambahkan NaOH 0,1 N dan apabila terlalu tinggi tambahkan HCL 0,1 N sampai PH nya 7,2
9. Menutup Erlenmeyer dengan menggunakan kapas dan kasa dan juga bungkus dengan kertas Koran sertas ikat menggunakan benang wol
10. Melakukan sterilisasi di autoclave dengan suhu 121°C pertahankan selama 15 menit bersama dengan semua alat yang butuh steril
11. Setelah turun dari autoclave, tuang media ke plate secara steril dekat dengan api
12. Menunggu sampai beku dan simpan di lemari es

3.5.6 Prosedur Pembuatan Media MSA (Mannitol Salt Agar)

Alat yang digunakan adalah timbangan (neraca triple beam), pengaduk, pipet pasteur, pipet ukur, filler, erlenmeyer, gelas ukur, gelas arloji, plate, autoclave

Prosedur :

1. Melakukan perhitungan media MSA (Mannitol Salt Agar)
Membuat MSA (33 plate, @ ± 17 ml → $33 \times 17 = 561 \text{ ml}$)
Komposisi MSA 108 gr per 1 liter → $\frac{108 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}} \times 561 \text{ ml} = 60,59 \text{ gr}$
2. Menyiapkan semua alat dan bahan yang dibutuhkan
3. Menimbang media MSA sebanyak 60,59 gr menggunakan timbangan
4. Mengukur volume aquadest sebanyak 561 ml menggunakan gelas ukur
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest yang sudah diukur volumenya tadi dalam erlenmeyer
6. Melarutkan di atas api spiritus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih
7. Menunggu sampai suam-suam dengan cara merendam Erlenmeyer tadi dengan air dingin
8. Mengukur PH media tersebut sampai 7,4, apabila terlalu rendah tambahkan NaOH 0,1 N dan apabila terlalu tinggi tambahkan HCL 0,1 N sampai PH nya 7,4
9. Menutup Erlenmeyer dengan menggunakan kapas dan kasa dan juga bungkus dengan kertas Koran sertas ikat menggunakan benang wol
10. Melakukan sterilisasi di autoclave dengan suhu 121°C pertahankan selama 15 menit bersama dengan semua alat yang butuh steril

11. Setelah turun dari autoclave, menuang media ke plate secara steril dekat dengan api lalu tunggu sampai beku dan simpan di lemari es

3.5.7 Prosedur Pembuatan Konsentrasi Perasan Buah Pinang

Prosedur :

1. Mengupas atau belah buah pinang
2. Menumbuk sampai benar-benar hancur buahnya
3. Menyaring buah pinang yang sudah ditumbuk tadi dengan kertas saring
4. Mengambil 1 mata ose perasan tadi secara steril dan tanam ke media NAP
5. Menginkubasi 24 jam dengan suhu 37°C
6. Mengamati hasilnya apabila tidak ada pertumbuhan berarti perasan tersebut sudah steril namun apabila masih ditumbuhi harus dilakukan proses tindalisasi, yaitu :

Memanaskan perasan tersebut dengan waterbath pada suhu 90°C selama 15 menit kemudian inkubasi di inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C ulangi perlakuan tersebut sampai 3 kali
7. Menanam kembali ke media NAP inkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam
8. Mengamati kembali, jika tidak ada pertumbuhan berarti sudah benar-benar steril
9. Membuat konsentrasi perasan buah pinang 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% dan 0% yaitu :

Konsentrasi 10% : pada tabung 1 isi 0,9 ml akuades steril tambahkan perasan buah pinang 0,1 ml homogenkan

- Konsentrasi 20% : pada tabung 2 isi 0,8 ml akuades steril tambahkan perasan buah pinang 0,2 ml homogenkan
- Konsentrasi 30% : pada tabung 3 isi 0,7 ml akuades steril tambahkan perasan buah pinang 0,3 ml homogenkan
- Konsentrasi 40% : pada tabung 4 isi 0,6 ml akuades steril tambahkan perasan buah pinang 0,4 ml homogenkan
- Konsentrasi 50% : pada tabung 5 isi 0,5 ml akuades steril tambahkan perasan buah pinang 0,5 ml homogenkan
- Konsentrasi 60% : pada tabung 6 isi 0,4 ml akuades steril tambahkan perasan buah pinang 0,6 ml homogenkan
- Konsentrasi 70% : pada tabung 7 isi 0,3 ml akuades steril tambahkan perasan buah pinang 0,7 ml homogenkan
- Konsentrasi 80% : pada tabung 8 isi 0,2 ml akuades steril tambahkan perasan buah pinang 0,8 ml homogenkan
- Konsentrasi 90% : pada tabung 9 isi 0,1ml akuades steril tambahkan Perasan buah pinang 0,9 ml homogenkan
- Konsentrasi 100% : pada tabung 10 isi 1ml perasan buah pinang
- Konsentrasi 0% : pada tabung 11 isi 1ml pz steril

(sumber: puspitasari,2013)

3.5.8 Prosedur Pemeriksaan sampel

Hari Pertama :

Peralatan yang digunakan adalah pipet ukur 1 ml, api spirtus, korek api dan inkubator. Bahan yang digunakan adalah suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dan perasan buah pinang

Prosedur pemeriksaan sampel :

1. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
2. Menyalakan api spirtus dengan korek api
3. Melabeli masing-masing tabung sesuai dengan konsentrasinya, yaitu 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% dan 0% atau kontrol
4. Memanaskan mulut pipet ukur diatas nyala api spirtus, memipet 1 ml suspensi bakteri dengan steril dan memasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 1 ml perasan konsentrasi 100%. Homogenkan agar suspensi tercampur sempurna. Melakukan hal yang sama pada konsentrasi 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% dan 0% atau kontrol. Tujuan hal ini dilakukan agar perbandingan suspensi bakteri dan perasan sama yaitu 1:1
5. Menutup kembali tabung dengan kapas berlemak
6. Lalu inkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam

Hari kedua :

1. Mengamati pada semua tabung, apakah terjadi kekeruhan atau tidak
2. Karena kekeruhan sulit dilihat secara visual maka diuji kembali ke media MSA dengan memastikan apakah kuman tersebut adalah *Staphylococcus aureus*
3. Memanaskan ose diatas nyala api spirtus, ambil 1 mata ose kuman yang ada pada tabung perasan buah pinang tadi
4. Menanam pada media MSA dengan cara menggoreskan, inkubasi 37°C selama 24 jam

Hari ketiga :

1. Mengamati media MSA apakah terbentuk koloni yang mengidentifikasi kuman tersebut adalah *Staphylococcus aureus*
2. Mencatat konsentrasi terkecil dan menghitung jumlah koloni *Staphylococcus aureus* pada masing-masing media MSA sesuai konsentrasi menggunakan koloni counter

3.5.9 Tabulasi Data

Data yang diperoleh ditabulasikan sebagai berikut :

Tabel 3.1 : contoh tabulasi data

N O	replikasi	Konsentrasi										
		0 %	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %	70 %	80 %	90 %	100 %
1	U1											
2	U2											
3	U3											
Jumlah												
Rata-rata												
SD												

Keterangan :

U1 : pengulangan pertama

U2 : pengulangan kedua

U3 : pengulangan ketiga

3.6 Metode Analisis Data

Data yang diperoleh dari uji laboratorium kemudian ditabulasi selanjutnya data diuji ANOVA dengan tingkat kesalahan α (0,05).