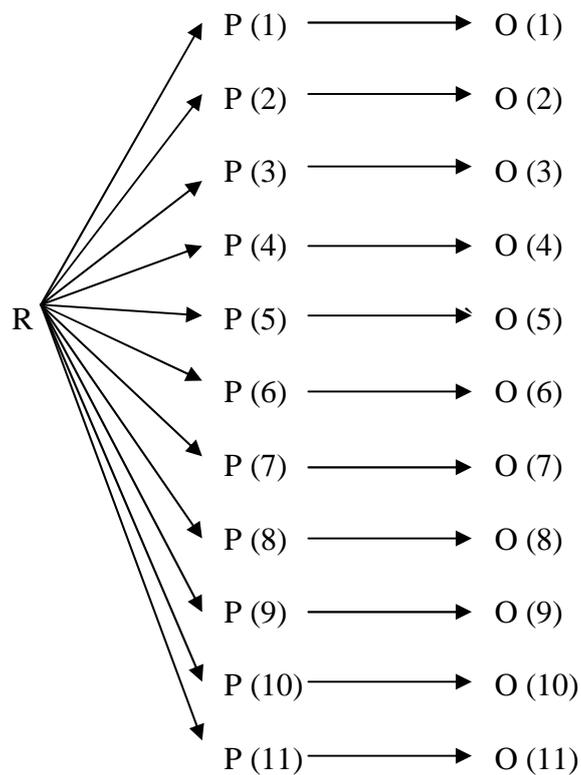


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental yaitu dengan menempatkan sasaran atau obyek pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh perasan daun Sawo (*Manilkara zapota* Linn) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan rancangan penelitian sebagai berikut:



Gambar 3.1 Desain rancangan penelitian (Kuntojo, 2009)

Keterangan :

R : Random

P (1) – P (11) : Pemberian perasan daun sawo manila 0% - 100%

O (1) – O (11) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* tanpa pemberian perasan daun sawo manila 0% - 100%

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian**3.2.1 Populasi Penelitian**

Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* biakan murni pada media *Nutrien Agar Slant* (NAS) yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya (BBLK Surabaya)

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* murni yang diambil secara acak lalu diinokulasi pada media *Nutrien Agar Slate* (NAS). Dalam penelitian terdapat 10 perlakuan. Setiap perlakuan dilakukan masing-masing 3 kali pengulangan sebagai berikut :

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

$$(n-1) (11-1) \quad 15$$

$$(n-1) 10 \quad 15$$

$$10n - 10 \quad 15$$

$$10n \quad 15 + 10$$

$$10n \quad 25$$

n 25 : 10

n 2,5

n 3

(Federer, 2010)

Keterangan :

n : Jumlah replikasi sampel (pengulangan)

k : Perlakuan

3.2.3 Teknik Sampling

Sampel dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* murni yang dipindah dari biakan murni dan tumbuh pada media *Manitol Salt Agar* (MSA). Bakteri *Staphylococcus aureus* diambil secara acak atau random.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya, Jalan Sutorejo No. 59 Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Januari sampai dengan bulan Juni 2017. Sedangkan waktu pemeriksaan dilakukan pada bulan April 2017.

3.4 Variabel dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Konsentrasi Perasan daun sawo manila (*Manilkara zapota* Linn).
2. Variabel Terikat : Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.
3. Variable Kontrol : Suhu, Ph, lama inkubasi, volume perasan daun Sawo manila, dan jumlah suspensi kuman *Staphylococcus aureus*.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

1. Konsentrasi perasan daun sawo manila dalam penelitian ini dikategorikan menjadi : 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, dan 0% (sebagai kontrol)
2. Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ditetapkan berdasarkan jumlah koloni yang tumbuh pada media MSA. Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dalam penelitian ini berupa angka dengan skala rasio yang menunjukkan banyaknya koloni *Staphylococcus aureus*
3. Suhu yang digunakan untuk inkubasi yaitu 37,0 °C, Ph yang digunakan pada media MSA yaitu 7,4 ± 0,2, lama inkubasi pada media MSA yaitu 24 jam, volume perasan daun sawo yang digunakan yaitu 1 ml pada setiap plate, dan jumlah suspensi *Staphylococcus aureus* pada 33 plate.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh dengan cara observasi melalui uji Laboratorium dan menghitung jumlah koloni *Staphylococcus aureus* yang tumbuh pada media MSA.

3.5.1 Prinsip Pemeriksaan

Perasan daun sawo manila diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi. Masing-masing konsentrasi ditambahkan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*, kemudian dilakukan uji dalam media MSA. Pertumbuhan dilihat setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.5.3. Tahapan Penelitian

3.5.3.1 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. Menyiapkan tabung steril kemudian membuat perbandingan antara BaCl₂ 1% : H₂SO₄ 1 % sebesar 1 : 9
2. Memipet 0,1 ml BaCl₂ 1% +9,9 ml H₂SO₄ 1%
3. Menghomogenkan dengan cara kocok pelan tabung

3.5.3.2 Pembuatan Suspensi Kuman

1. Alat :

Alat yang digunakan adalah Tabung steril, Ose bulat, dan vortex.

2. Bahan :

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

3. Prosedur :

1. Menyiapkan tabung steril lalu masukkan pz (NaCl 0,85%) steril.
2. Mengambil kuman dari biakan *Staphylococcus aureus* murni yang sudah ditanam di media NAS dengan ose steril.
3. Menyelupkan ose steril yang sudah ada kumannya pada tabung yang berisi Pz, kemudian di vortex hingga homogen.
4. Membandingkan warna suspensi kuman dengan standart Mc Farland I.
5. Apabila warna kurang keruh, maka menambahkan kuman dengan ose steril dan apabila terlalu keruh menambahkan Pz hingga warnanya sama dengan standar Mc Farland I.

3.5.3.3 Standarisasi Ose Yang Akan Dipakai Dalam Penelitian

1. Alat :

Alat yang digunakan adalah : Ose bulat, push ball, tabung, spirtus.

2. Bahan :

Bahan yang digunakan adalah : Aquadest

3. Prosedur :

1. Menyiapkan pipet 0.1 ml dan pushball sertatabung.
2. Memipet aquadest 0.1 ml, kemudian menuanginya kedalam tabung.

3. Menyalakan api spirtus.
4. Mengambil 1 mata ose air yang sudah dituang kedalam tabung dan kemudian memanaskan ose tersebut di atas spirtus, lakukan berulang- ulang sampai air dalam tabung habis.
5. Didapatkan 56 mataose air tersebut habis.

3.5.3.4 Pembuatan Media *Nutrien 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, pengaduk, rak tabung, api spirtus, kaki tiga, filler, erlenmeyer, ose, pipet ukur, vortex dan kertas pH,.

2. Bahan :

Bahan yang digunakan adalah Media NAP, Aquadest steril, NaOH, HCl.

3. Prosedur :

1. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
2. Melakukan perhitungan media NA
3. Membuat media NAP 10 plate dengan cara menimbang bahan (media NA) sesuai dengan perhitungan menggunakan timbangan neraca analitik
4. Mengukur volume aquadest menggunakan gelas ukur
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest yang sudah diukur volumenya dalam Erlenmeyer
6. Memasukkan larutan di atas api spirtus sampai larut sempurna, tidak sampai mendidih

7. Mengangkat larutan yang sudah dipanaskan dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan baskom sampai suam-suam kuku
8. Mengukur pH nya sampai 7.4, jika terlalu asam dapat menambahkan NaOH 0.1 N, sedangkan jika terlalu basa menambakkannya dengan HCl 0.1 N sampai pH nya 7.4
9. Menutup Erlenmeyer dengan kapas berlemak dan menyeterilkannya dengan autoclave pada suhu 121 atm selama 15 menit
10. Setelah turun dari autoclave, menuangkannya ke dalam plate yang steril sampai rata
11. Mendinginkan sampai terlihat padat dan menyimpannya ke lemari es.

3.5.3.5 Pembuatan Media *Manitol Agar Slant* (MSA)

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, 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. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
2. Melakukan perhitungan terhadap jumlah media MSA yang dibutuhkan
3. Melakukan penimbangan bahan sesuai dengan yang diperlukan menggunakan timbangan

3. Mengukur volume aquadest yang dibutuhkan dengan gelas ukur
4. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang tadi dengan aquadest yang sudah diukur volumenya ke dalam Erlenmeyer
5. Memanaskan di atas apispirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih
6. Mengangkat larutan yang sudah larut sempurna dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan sampai suam-suam kuku
7. Mengukur pH nya dengan cara menambahkan NaOH 0.1 N jika terlalu asam dan menambahkan HCl 0.1 N jika terlalu basa sampai pH nya 7.2-7.4
8. Menutup larutan yang ada di erlenmeyer dengan kapas berlemak dan menyeterilisasi larutan tersebut bersama dengan plate yang dibutuhkan di autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit
9. Setelah turun dari autoclave, menuangkannya ke dalam plate yang steril sampai rata. Masing – masing plate berisi 15 ml, dituang secara steril dekat dengan apispirtus
10. Mendinginkannya sampai terlihat padat dan kemudian menyimpannya ke lemari es.

3.5.3.6 Pembuatan Perasan Daun Sawo manila (*Manilkara zapota* Linn)

1. Alat :

Alat yang digunakan adalah mortal, blender, kasa penyaring, ose bulat, timbangan.

2. Bahan :

Bahan yang digunakan adalah aquadest steril, daun sawo, media NAP

3. Prosedur :

1. Memetik daun sawo manila yang masih muda.
2. Menimbang daun sawo manila 100 gram.
3. Mencuci daun sawo manila sampai bersih dan terakhir dicuci dengan aquadest steril.
4. Menghaluskan daun sawo manila sampai halus dengan menggunakan mortar atau blender.
5. Menyaring sampai benar-benar jernih.
6. Mengambil satu mata ose perasan yang sudah jernih secara steril, kemudian menanamnya ke media NAP, dengan cara menggoreskannya di permukaan media.
7. Menginkubasi selama 24 jam 37°C .
8. Mengamati hasilnya, jika tidak terjadi pertumbuhan kuman berarti perasan daun sawo manila tadi sudah benar-benar steril. Jika tidak terjadi pertumbuhan, maka dilanjutkan proses tindalisasi.
 - a. Memanaskan perasan daun sawo dengan waterbath pada suhu 90°C selama 15 menit
 - b. Kemudian meletakkannya di inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C
 - c. Menguji kembali perasan daun sawo yang sudah melalui proses tindalisasi di media NAP dan menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37°C untuk memastikan perasan daun sawo sudah benar-benar steril.

3.5.3.7 Pembuatan Konsentrasi Perasan Daun Sawo manila (*Manilkara zapota* Linn)

1. Alat :

Alat yang digunakan adalah Tabung, pipet ukur, pushball, dan vortex.

2. Bahan :

Bahan yang digunakan adalah perasan daun sawo manila, aquadest steril

3. Prosedur

1. Konsentrasi 100% : Tabung 1 mengisi 1 ml perasan awal, sebagai konsentrasi 100%
2. Konsentrasi 90% : Pada tabung 2 mengisi perasan daun sawo manila dari konsentrasi 100% sebanyak 0,9 ml, menambahkan 0,1 ml Aquadest steril, menghomogenkan dengan vortex.
3. Konsentrasi 80% : Pada tabung 3 mengisi perasan daun sawo manila dari konsentrasi 100% sebanyak 0,8 ml, menambahkan 0,2 ml Aquadest steril, menghomogenkan dengan vortex.
4. Konsentrasi 70% : Pada tabung 4 mengisi perasan daun sawo manila dari konsentrasi 100% sebanyak 0,7 ml, menambahkan 0,3 ml Aquadest steril, menghomogenkan dengan vortex
5. Konsentrasi 60% : Pada tabung 5 mengisi perasan daun sawo manila dari konsentrasi 100% sebanyak 0,6 ml, menambahkan 0,4 ml Aquadest steril, menghomogenkan dengan vortex.
6. Konsentrasi 50% : Pada tabung 6 mengisi perasan daun sawo manila dari konsentrasi 100% sebanyak 0,5 ml, menambahkan 0,5 ml

Aquadest steril, menghomogenkan dengan vortex.

7. Konsentrasi 40% : Pada tabung 7 mengisi perasan daun sawo manila dari konsentrasi 100% sebanyak 0,4 ml, menambahkan 0,6 ml Aquadest steril, menghomogenkan dengan vortex.
8. Konsentrasi 30% : Pada tabung 8 mengisi perasan daun sawo manila dari konsentrasi 100% sebanyak 0,3 ml, menambahkan 0,7 ml Aquadest steril, menghomogenkan dengan vortex.
9. Konsentrasi 20% : Pada tabung 9 mengisi perasan daun sawo manila dari konsentrasi 100% sebanyak 0,2 ml, menambahkan 0,8 ml Aquadest steril, menghomogenkan dengan vortex.
10. Konsentrasi 10% : Pada tabung 10 mengisi perasan daun sawo manila dari konsentrasi 100% sebanyak 0,1 ml, menambahkan 0,9 ml Aquadest steril, menghomogenkan dengan vortex.
11. Konsentrasi 0% : Pada tabung 11 mengisi 1 ml Aquadest steril tanpa memberi tambahan perasan daun sawo manila.

3.5.3.8 Prosedur Pemeriksaan Sampel

1. Hari Pertama (Pemberian Suspensi Kuman Pada Masing-Masing Konsentrasi)

1. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
2. Menyalakan api spiritus dengan korek api
3. Memberi label pada masing-masing tabung sesuai dengan konsentrasi, yaitu konsentrasi 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% dan 0% atau C (kontrol).

4. Mengambil suspensi kuman *Staphylococcus aureus* yang sudah setara dengan standart Mc Farland I sebanyak 1 mata ose dan mencampurkan suspensi ke dalam masing-masing konsentrasi secara acak.
5. Menutup kembali tabung dengan kapas.
6. Menginkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

2. Hari Kedua (Prosedur Pemberian Perlakuan Perasan Pada Media)

1. Mengamati masing-masing tabung, apakah terjadi kekeruhan apa tidak.
2. Menghomogenkan kembali dengan vortex.
3. Mengambil konsentrasi terkecil yang mulai terlihat keruh, dan menguji kembali pada media padat MSA dengan tujuan memastikan apakah kuman tersebut adalah *Staphylococcus aureus*.
4. Memanaskan ose bulat di atas nyala api spirtus , mengambil satu mata ose kuman yang ada pada konsentrasi tadi.
5. Menanam pada media MSA dengan cara menggoreskan pada permukaan media.
6. Menginkubasi kembali pada suhu 37°C selama 24 jam.

3. Hari ketiga (Proses Pengamatan)

1. Menghitung jumlah koloni yang tumbuh pada media MSA dengan berbagai Konsentrasi.
2. Mencatat hasil yang diamati sebagai data.

3.5.3.9 Tabulasi Data

Untuk memperoleh data dan informasi maka data hasil penelitian ditabulasikan dengan tujuan untuk mengetahui perbedaan jumlah koloni yang tumbuh pada media MSA dengan berbagai konsentrasi.

Data yang diperoleh ditabulasikan sebagai berikut :

No	Kode Sampel	Konsentrasi										
		0 %	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %	70 %	80 %	90 %	100%
1	R1											
2	R2											
3	R3											
Jumlah												
Rata-rata												
SD												

3.6 Metode Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh perasan daun sawo manila (*Manilkara zapota* Linn) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, data jumlah koloni *Staphylococcus aureus* di analisis dengan menggunakan One-way ANOVA dengan taraf signifikan 5% ($\alpha = 0,05$). Uji One-way Anova bertujuan untuk membandingkan rata-rata lebih dari dua kelompok perlakuan dan untuk membandingkan rata-rata jumlah koloni yang tumbuh pada media MSA yang telah diberi perasan daun sawo manila dengan konsentrasi 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, dan 0% (kontrol). Kemudian dilanjutkan uji Tukey *Honestly*

Significant Difference (HSD) bertujuan untuk melihat perbedaan antar perlakuan dari masing-masing konsentrasi dan untuk mengetahui konsentrasi efektif yang dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.