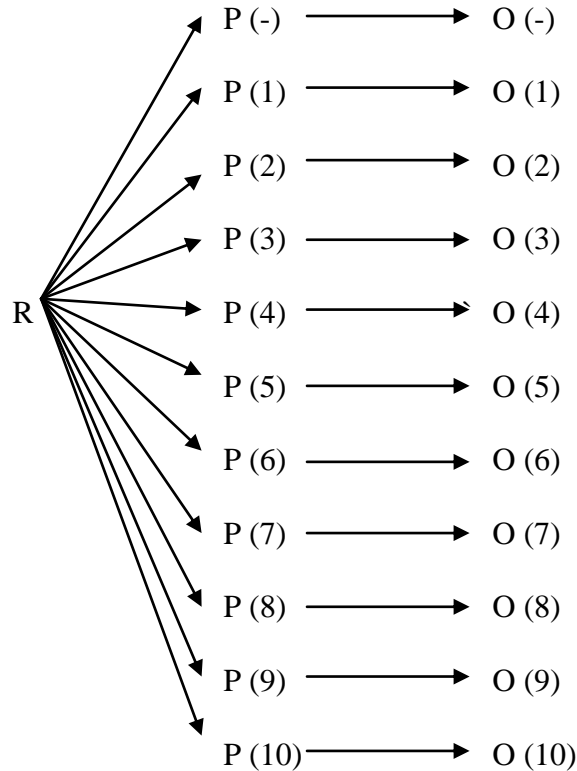


BAB 3
METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

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



Keterangan :

R : Random

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

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

- P (2) : Perlakuan dengan pemberian perasan daun seledri konsentrasi 90%
- P (3) : Perlakuan dengan pemberian perasan daun seledri konsentrasi 80%
- P (4) : Perlakuan dengan pemberian perasan daun seledri konsentrasi 70%
- P (5) : Perlakuan dengan pemberian perasan daun seledri konsentrasi 60%
- P (6) : Perlakuan dengan pemberian perasan daun seledri konsentrasi 50%
- P (7) : Perlakuan dengan pemberian perasan daun seledri konsentrasi 40%
- P (8) : Perlakuan dengan pemberian perasan daun seledri konsentrasi 30%
- P (9) : Perlakuan dengan pemberian perasan daun seledri konsentrasi 20%
- P (10) : Perlakuan dengan pemberian perasan daun seledri konsentrasi 10%
- O (-) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan tanpa pemberian perasan daun seledri
- O (1) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian perasan daun seledri konsentrasi 100%
- O (2) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian perasan daun seledri konsentrasi 90%
- O (3) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian perasan daun seledri konsentrasi 80%
- O (4) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian perasan daun seledri konsentrasi 70%
- O (5) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian perasan daun seledri konsentrasi 60%
- O (6) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian perasan daun seledri konsentrasi 50%

- O (7) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian perasan daun seledri konsentrasi 40%
- O (8) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian perasan daun seledri konsentrasi 30%
- O (9) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian perasan daun seledri konsentrasi 20%
- O (10) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan dengan pemberian perasan daun seledri konsentrasi 10%

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya.

3.2.2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* dalam biakan media *Nutrien Agar Slant (NAS)*. Sedangkan jumlah pengulangan sampelnya diperoleh dari rumus sebagai berikut :

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

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

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

$$10n - 10 \geq 15$$

$$10n \geq 15 + 10$$

$$10n \geq 25$$

$$n \geq 25 : 10$$

$$n \geq 2,5 \sim 3$$

(Zainudin, 2003)

Keterangan :

n : Jumlah sampel

k : Perlakuan

3.3 Lokasi dan Waktu penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Jln. Sutorejo 63A 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 November sampai bulan Juni 2015, sedangkan waktu pemeriksaan dilaksanakan pada bulan Februari 2015

3.4 Variabel dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas : Pemberian perasan daun seledri

Variabel terikat : Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

1. Perasan daun seledri dikategorikan menjadi berbagai konsentrasi yaitu : 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, dan 0% (sebagai kontrol)
2. Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ditetapkan berdasarkan kekeruhan atau kejernihan air perasan daun seledri. Pertumbuhan dikategorikan menjadi positif (+) : jika terjadi pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, negatif (-) : jika tidak terjadi pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Untuk melihat ada tidaknya pertumbuhan kuman perlu dilakukan pemeriksaan yaitu dengan cara menanam pada media MSA (Manitol Salt Agar)

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh melalui uji laboratorium.

3.5.1 Metode Pemeriksaan

Pemeriksaan daya hambat bakteri *Staphylococcus aureus* ini menggunakan metode pengenceran, langkah – langkah pemeriksaannya sebagai berikut :

3.5.2 Prinsip Pemeriksaan

Senyawa antibakteri diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi, kemudian masing – masing konsentrasi ditambahkan suspensi bakteri uji dalam media cair. Perlakuan tersebut akan di inkubasi dan diamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan terjadinya kekeruhan. Larutan uji senyawa antibakteri pada konsentrasi terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan bakteri uji ditetapkan sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM) atau MIC (Minimum inhibitory concentration) (Pratiwi, 2008). Karena perasan daun seledri merupakan larutan yang berwarna maka kekeruhan dalam tabung yang seharusnya menunjukkan adanya pertumbuhan kuman sepertinya sulit untuk dilihat secara visual. Untuk meyakinkan ada tidaknya pertumbuhan kuman perlu dilakukan pemeriksaan lebih lanjut yaitu dengan cara menanam pada media MSA (*Manitol Salt Agar*).

3.5.3 Alat – alat

Alat yang digunakan dalam pemeriksaan ini adalah sebagai berikut : Timbangan, gelas arloji, tabung reaksi, gelas ukur, pengaduk, rak tabung, pipet Pasteur, api spirtus, kaki tiga, blender, filler, Erlenmeyer, ose, autoclave, plate, pipet ukur, tabung centrifuge, mortar, spatula, kertas pH, lidi kapas.

3.5.4 Bahan Pemeriksaan

Bahan yang digunakan dalam pemeriksaan ini adalah sebagai berikut : Perasan daun seledri, suspensi kuman *Staphylococcus aureus*, aquadest steril, media nutrient agar (NA), media manitol salt agar (MSA), dan Pz steril.

3.5.5 Reagen Pemeriksaan

Reagen yang digunakan dalam pemeriksaan ini adalah Sebagai berikut : NaOH 0.1 N dan HCL 0.1 N

3.5.6 Prosedur

Pembuatan Suspensi Kuman *Staphylococcus aureus* dengan metode Mc. Farland 0,5 :

1. Menyiapkan 2 tabung steril, 1 untuk suspensi kuman dan yang 1 untuk standart Mc. Farland 0,5.
2. Prosedur pembuatan standart Mc. Farland 0,5, yaitu :
 - a. Membuat perbandingan antara BaCl₂ 1% : H₂SO₄ 1%
 - b. Memipet 0,05 ml BaCl₂ 1% + 9,95 ml H₂SO₄ 1%
 - c. Menghomogenkan dengan cara mengkocok pelan tabung.
 - d. Standart Mc. Farland 1 ini kekeruhannya sama dengan setiap 1 ml suspensi kuman mengandung 150 juta kuman (Soemarno, 2000)
3. Prosedur membuat suspensi kuman, yaitu :
 - a. Mengisi tabung steril dengan PZ ± 5 ml

- b. Mengambil kuman dari biakan *Staphylococcus aureus* murni yang sudah ditanam di media NAS umur 24 jam dengan lidi kapas steril.
 - c. Menyelupkan lidi kapas steril yang sudah ada kumannya pada tabung yang berisi PZ.
 - d. Membandingkan kekeruhan suspensi kuman dengan Mc. Farland 0,5
 - e. Apabila suspensi kurang keruh, maka tambahkan kuman menggunakan lidi kapas steril dan apabila terlalu keruh tambahkan PZ hingga kekeruhannya sama dengan standart Mc. Farland 0,5.
4. Menstandartkan ose yang akan dipakai dalam penelitian (Tera Ose) :
1. Menyiapkan pipet 0.1 ml, filler dan tabung.
 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, kemudian memanaskan ose tersebut di atas api spirtus, lakukan berulang – ulang sampai air dalam tabung habis.
 5. Didapatkan 43 mata ose

3.5.7. Prosedur Pembuatan Media Nutrient Agar Plate (NAP)

Prosedur pembuatan media Nutrient Agar Plate (NAP) adalah sebagai berikut:

1. Melakukan perhitungan media NA (Nutrien Agar)
2. Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan.
3. Menimbang bahan (media NA) sesuai dengan perhitungan menggunakan timbangan .

4. Memasukkan sampel NA ke beaker glass kemudian ditambahkan dengan aquades
 5. Melarutkan sampel dengan cara dipanaskan sampai larut sempurna.
 6. Mengangkat larutan yang sudah dipanaskan dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam – suam kuku.
 7. Mengukur pH nya sampai 7.4, jika terlalu asam menambahkannya dengan NaOH 0.1 N, sedangkan jika terlalu basa menambahkannya dengan HCL 0.1N sampai pH nya 7.4
 8. Menutup erlenmeyer dengan kapas berlemak dan menyeterilkannya dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
 9. Setelah turun dari autoclave, menuangkannya ke dalam plate yang steril.
 10. Mendinginkannya sampai terlihat padat dan menyimpannya ke almari es.
- (sumber: Sumarsono, 1996)

3.5.8. Prosedur Pembuatan Media Manitol Salt Agar (MSA)

1. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
2. Melakukan perhitungan terhadap jumlah bahan/media MSA yang dibutuhkan:

Membuat MSA (15 plate, @ ± 15 ml → 225 ml)

Komposisi MSA 108 gr per 1 liter → $\frac{108 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}} \times 225 \text{ ml} = 24.3 \text{ ml}$

3. Melakukan penimbangan bahan sesuai dengan yang diperlukan yaitu 24.3 gr menggunakan timbangan.

4. Mengukur volume aquadest yang dibutuhkan yaitu sebanyak 225 ml
Menggunakan gelas ukur
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang tadi dengan aquadest yang sudah diukur volumenya ke dalam erlenmeyer.
6. Memanaskannya diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih.
7. Mengangkat larutan yang sudah larut sempurna dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan di baskom sampai suam – suam kuku.
8. Mengukur pH yaitu 7.2 -7.4, jika pH terlalu asam tambahkan NaOH 0.1 N jika terlalu basa tambahkan HCL 0.1 N sampai pH yang telah ditentukan.
9. Menutup larutan yang ada di erlenmeyer dengan kapas berlemak dan bungkus dengan koran serta mengikatnya dengan benang wol.
10. Melakukan 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, menuangkannya ke dalam plate yang steril sampai rata \pm 17 ml secara steril dan dekat dengan api.
12. Mendiarkannya sampai terlihat padat dan menyimpannya ke lemari es

3.5.9 Prosedur Pembuatan Konsentrasi Perasan Daun Seledri

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

1. Menimbang daun seledri sebanyak 100 gram
2. Mencuci daun seledri hingga bersih, setelah itu ditumbuk sampai benar – benar halus.

3. Menyaring daun seledri yang sudah ditumbuk tadi dengan kasa berlapis yang steril. Menyaring sampai benar – benar bersih.
4. Mencentrifuge kembali perasan tadi ditabung yang steril sehingga didapatkan perasan yang benar – benar jernih.
5. Mengambil 1 mata ose perasan yang sudah jernih secara steril , kemudian menanamnya ke media NAP, dengan cara menggoreskannya di permukaan media.
6. Inkubasi selama 24 jam 37° C.
7. Mengamati hasilnya, jika tidak terjadi pertumbuhan kuman berarti perasan daun seledri tadi sudah benar – benar steril. Namun jika pada media NAP terdapat pertumbuhan kuman berarti perlu dilakukan proses tindalisasi, yaitu :
 - a. Memanaskan perasan daun seledri dengan waterbath pada suhu 90°C selama 15 menit.
 - b. Kemudian meletakkannya di inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.
 - c. Menanam kembali perasan daun seledri yang sudah melalui proses tindalisasi di media NAP dan menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37°C.
8. Membuat konsentrasi 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, dan Pz steril (0%), yaitu :

Konsentrasi 100% : Tabung 1 diisi 1 ml perasan awal, sebagai konsentrasi 100%

Konsentrasi 90% : Tabung 2 diisi 0,1 ml Pz steril ditambah perasan daun

seledri konsentrasi 100% sebanyak 0,9 ml,
homogenakan.

Konsentrasi 80% : Tabung 3 diisi 0,2 ml Pz steril ditambah perasan daun
seledri konsentrasi 100% sebanyak 0,8 ml,
homogenkan.

Konsentrasi 70% : Tabung 4 diisi 0,3 ml Pz steril ditambah perasan daun
seledri konsentrasi 100% sebanyak 0,7 ml,
homogenkan.

Konsentrasi 60% : Tabung 5 diisi 0,4 ml Pz steril ditambah perasan daun
seledri konsentrasi 100% sebanyak 0,6 ml,
homogenkan.

Konsentrasi 50% : Tabung 6 diisi 0,5 ml Pz steril ditambah perasan daun
seledri konsentrasi 100% sebanyak 0,5 ml,
homogenkan.

Konsentrasi 40% : Tabung 7 diisi 0,6 ml Pz steril ditambah perasan daun
seledri konsentrasi 100% sebanyak 0,4 ml,
homogenkan.

Konsentrasi 30% : Tabung 8 diisi 0,7 ml Pz steril ditambah perasan daun
seledri konsentrasi 100% sebanyak 0,3 ml,
homogenkan.

Konsentrasi 20% : Tabung 9 diisi 0,8 ml Pz steril ditambah perasan daun
seledri konsentrasi 100% sebanyak 0,2 ml,
homogenkan.

Konsentrasi 10% : Tabung 10 diisi 0,9 ml Pz steril ditambah perasan daun seledri konsentrasi 100% sebanyak 0,1 ml, homogenkan.

Konsentrasi 0% : Tabung 11 diisi 1 ml Pz steril tanpa diberi tambahan perasan daun seledri.

3.5.10 Prosedur pemeriksaan sampel :

A. Hari pertama pemeriksaan :

1. Disiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
2. Dinyalakan api spirtus dengan korek api
3. Dilabeli masing-masing tabung sesuai dengan konsentrasinya, yaitu konsentrasi 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% dan 0% (sebagai kontrol)
4. Dipanaskan ose bulat diatas nyala api spirtus, mengambil suspensi kuman *Staphylococcus aureus* sebanyak 1 mata ose dan membiakkannya di tabung berlabel 100% dengan cara menggesekkannya ose didinding permukaan media cair sebanyak 3 kali. Kemudian mengambil lagi 1 mata ose kuman *Staphylococcus aureus* pada suspensi kuman dan membiakkannya pada tabung berlabel 90%, begitu seterusnya sampai pada tabung kontrol. Semua perlakuan dilakukan secara steril dekat dengan api.
5. Ditutup kembali tabung dengan kapas berlemak
6. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.6 Metode Analisis Data

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