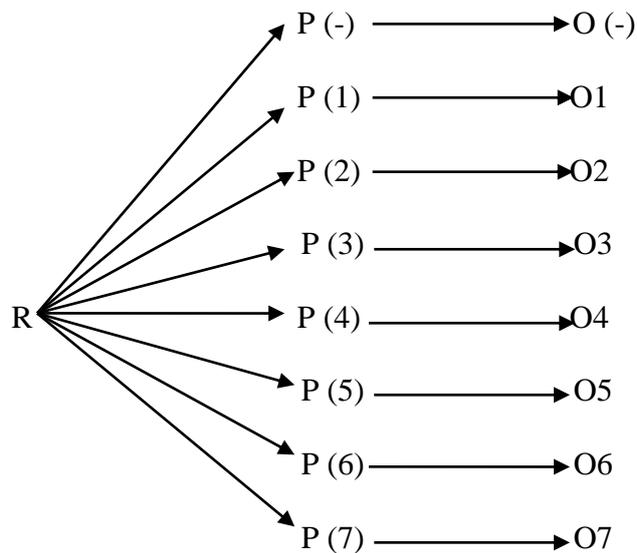


BAB 3
METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan tujuan untuk mengetahui konsentrasi terkecil pada perasan bawang putih (*Allium Sativum L.*) yang dapat menghambat terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* Dengan rancangan penelitian sebagai berikut :



Gambar 3.1 Rancangan penelitian

Keterangan :

R : Random

P (-) : Perlakuan tanpa diberi perasan Bawang Putih

P (1) : Perlakuan dengan pemberian perasan Bawang Putih konsentrasi 100%

P (2) : Perlakuan dengan pemberian perasan Bawang Putih konsentrasi 50%

- P (3) : Perlakuan dengan pemberian perasan Bawang Putih konsentrasi 25%
- P (4) : Perlakuan dengan pemberian perasan Bawang Putih konsentrasi 12,5%
- P (5) : Perlakuan dengan pemberian perasan Bawang Putih konsentrasi 6,25%
- P (6) : Perlakuan dengan pemberian perasan Bawang Putih konsentrasi 3,125%
- P (7) : Perlakuan dengan pemberian perasan Bawang Putih konsentrasi 0%
-
- O (-) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan tanpa pemberian perasan Bawang Putih
- O (1) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan pemberian perasan Bawang Putih konsentrasi 100%
- O (2) : Observasi pertumbuhan pada *Staphylococcus aureus* perlakuan pemberian perasan Bawang Putih konsentrasi 50%
- O (3) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan pemberian perasan Bawang Putih konsentrasi 25%
- O (4) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan pemberian perasan Bawang Putih konsentrasi 12,5%
- O (5) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan pemberian perasan Bawang Putih konsentrasi 6,25%
- O (6) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan pemberian perasan Bawang Putih konsentrasi 3,125%
- O (7) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan pemberian perasan Bawang Putih konsentrasi 0%

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1. Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah Bakteri *Staphylococcus aureus* murni pada media NAS (*Nutrient Agar Slant*).

3.2.2. Sampel Penelitian

Sampel untuk penelitian adalah *Staphylococcus aureus* murni di media yang diperlakukan 4 kali perlakuan dengan Rumus sebagai Berikut :

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

$$(n-1) (7-1) \leq 15$$

$$(n-1) (6) \leq 15$$

$$n6 - 6 \leq 15$$

$$n6 \geq 15 + 6$$

$$n6 \geq 21$$

$$n \geq 21 : 6$$

$$n \leq 3,5 \Rightarrow n \sim 4 \text{ (Zainudin,2003)}$$

Keterangan :

n : Jumlah ulangan atau jumlah sampel

k : Jumlah kelompok

3.3. Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1. Lokasi

Penelitian ini di mulai pada bulan januari –juni 2015. Penelitian di laksanakan di Laboratorium Mikrobiologi D3 Anlis Kesehatan Universitas Muhammadiyah surabaya.

3.3.2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Maret 2015 sampai dengan bulan juli 2015, sedangkan waktu pemeriksaan dilaksanakan pada bulan Mei 2015 .

3.4 Variabel penelitian dan definisi operasional variabel

3.4.1 Variabel penelitian

- 1.Variabel Bebas : Perasan Bawang putih (*Allium sativum L.*)
2. Variabel Terikat : Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*
- 3.Variabel Kontrol : Lama Inkubasi, suhu, Volume Filtrat Jumlah suspensi
Kuman Staphylococcus aureus

3.4.2 Definisi operasional variabel

1. Perasan Bawang putih dikategorikan menjadi berbagai macam konsentrasi, yaitu: : 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, dan 0% (kontrol).
2. Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dalam penelitian ini ditetapkan berdasarkan Jumlah Koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yang tumbuh setelah inkubasi 24 jam suhu 37°C pada media MSA (Manitol *Salt Agar*).

3.5. Metode pengumpulan data

Data yang diperoleh berdasarkan uji laboratorium dengan tahap tahap sebagai berikut.

3.5.1. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode dilusi, dengan mengamati pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada perasan bawang putih yang ditandai dengan adanya koloni yang tumbuh pada media MSA.

3.5.2. Prinsip Pemeriksaan

Pemeriksaan daya hambat bakteri *Staphylococcus aureus* ini menggunakan metode Pengenceran.

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 kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan bakteri uji, ditetapkan sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM) atau MIC (*Minimum inhibition concentration*) (Pratiwi, 2008).

3.6. Alat dan Bahan

3.6.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Cawan Petri, Pipet pasteur, Autoclav, Alat pemanas, Kain kasa steril (penyaring), Penangas air (water bath), Inkubator, Tabung Reaksi, Gelas ukur, Pengaduk, Rak tabung, Api spirtus, kaki tiga, Filler, Erlenmeyer, Ose , Pipet ukur, Tabung sentrifuge

3.6.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Bawang Putih, Aquadest steril, Media MSA, Suspensi kuman *Staphylococcus aureus*

3.6.3. Reagen Pemeriksaan

Reagen yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Pz Steril, H₂SO₄ 1%, BaCl₂ 1%, Aquadst Steril

3.7. Procedur Pemeriksaan

3.7.1. Prosedur Pembuatan Konsentrasi Perasan Bawang putih

1. Mengupas Bawang putih
2. Mencuci Bawang putih sampai bersih dan yang terakhir dicuci dengan aquadest steril
3. Menumbuk Bawang putih dengan mortar, setelah dihaluskan, kemudian diperas dengan kain bersih untuk mendapatkan sari bawang putih dengan konsentrasi 100%.
4. Menyaring air Bawang putih tersebut dengan kasa steril hingga jernih
5. Kemudian panaskan perasan tersebut di waterbath dengan suhu 100 °C selama 1 jam. Setelah itu, inkubasi di inkubator dengan suhu 37 °C selama 24 jam. Lakukan tahap pemanasan dan inkubasi selama (Tahap 6 dan Tahap) selama 3 hari berturut turut. (Anonim, 2009).
6. Mengambil satu mata ose rebusan yang sudah jernih tadi, kemudian menanamnya pada media NAP, dengan cara menggoreskan pada media tersebut dan menginkubasi selam 24 jam dengan suhu 37°C.
7. Mengamati hasil, jika tidak terjadi pertumbuhan pada media berarti Perasan tersebut benar-benar steril.
8. Membuat konsetrasi 100%,50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, dan kontrol 0% dengan PZ steril:

Konsetrasi 100% : Tabung 1, di isi 1 ml perasan Bawang putih

Konsetrasi 50% : Tabung 2, di isi 1 ml perasan Bawang putih ditambah 1 ml Pz steril kemudian homogenkan.

Konsentrasi 25% : Tabung 3, di isi 1 ml Pz steril ditambah 1 ml perasan Bawang putih diambil dari Konsentrasi 50% kemudian homogenkan.

Konsentrasi 12,5%: Tabung 4, di isi 1 ml Pz steril ditambah 1 ml perasan Bawang putih diambil dari Konsentrasi 25% kemudian homogenkan.

Konsentrasi 6,25%: Tabung 5, di isi 1 ml Pz steril ditambah 1 ml perasan Bawang putih diambil dari Konsentrasi 12,5% kemudian homogenkan.

Konsentrasi 3,125% : Tabung 6, di isi 1 ml Pz steril ditambah 1 ml perasan Bawang putih diambil dari Konsentrasi 6,25% kemudian homogenkan.

Kontrol (0%) : Tabung 6 di isi 1 ml PZ steril

(Sumber: Rendy,2012)

3.7.2. Cara Pembuatan Standart Mac Farland 1

1. Menyediakan tabung reaksi yang bersih dan baru
2. Mepipet dan masukkan 0.1 ml Barium Clorida ($BaCl_2$) 1% kedalam tabung reaksi tersebut.
3. Menambahkan 9,9 ml Asam Sulfat (H_2SO_4) 1% dalam tabung yang telah berisi 0,1 ml Barium Clorida ($BaCl_2$) 1%
4. Mencampur kedua larutan tersebut sehingga didapatkan standart Mac Farland 1 dan sama dengan jumlah bakteri 300 juta kuman (Setia,2006).

3.7.3. Prosedur Pembuatan Suspensi Kuman

Menurut Baron (dalam Setia 2007:22) sebelum pembuatan suspensi kuman, terlebih dahulu dibuat larutan Mc. Farland no. 1 dengan standart kekeruhan suspensi kuman dengan pencampuran 0,1 ml BaCl₂ 1% dan 9,9 ml H₂SO₄ 1%.

- a. mengisi tabung steril dengan Pz kurang lebih 5 ml.
- b. mengambil kuman dari biakan *Staphylococcus aureus* murni yang telah ditanam di media NAS dengan lidi kapas steril.
- c. menyelupkam lidi kapas steril yang sudah ada kumannya kedalam tabung yang berisi Pz steril.
- d. membandingkan warna suspensi kuman dengan Mc. Farland 1.
- e. apabila kurang keruh, maka tambahkan kuman dengan lidi kapasdan apabila terlalu keruh ditambah dengan Pz steril hingga warnanya sama dengan standart Mc. Farland 1.

Untuk mendapatkan kuman tiap ml 150 juta, maka dilakukan pengenceran dengan cara :

1. menyiapkan tabung steril
2. memipet 5 ml pipet steril dan 5 ml suspensi kuman Mc. Farland 1 tadi.
3. menghomogenkan tabung dengan cara dikocok secara perlahan – lahan.
4. suspensi kuman dengan jumlah kuman tiap ml nya 150 juta siap digunakan (Soemarno, 2000).

Menstandartkan Ose yang akan digunakan dalam Penelitian, Dengan cara :

1. Menyiapkan Pipet 0,1, Filler serta tabung.

2. Memipet Aquadest sebanyak 0,1 ml dan menuangkannya kedalam Tabung.
3. Menyalakan Api spirtus.
4. Mengambil 1 mata ose yang sudah dutuang kedalam Tabung dan kemudian Memanaskan Ose tersebut diatas Api spirtus. Lakukan Berulang-ulang sampai air yang ada di dalam tabung Habis.
5. Didapatkan 10 mata Ose Air didalam tabung tersebut habis.

$$\frac{0,1 \text{ ml}}{10} = \frac{1}{100}$$

1 Mata Ose = 1000 Kuman (bila suspensi kuman permililiternya 150 juta Kuman)

3.7.4. Prosedur Pembuatan Nutrien Agar Plate

1. Melakukan perhitungan media NA (Nutrien Agar)

Membuat NAP 5 plate @ plate ± 15-17ml

Komposisi NA 20 gram per 1 Liter → $\frac{20\text{gram} \times 85\text{ml}}{1000 \text{ ml}} = 1,7 \text{ gram}$
2. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
3. Menimbang media NA sesuai dengan perhitungan yaitu gram menggunakan timbangan
4. Mengukur volume aquades sebanyak 85 ml menggunakan gelas ukur
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest yang sudah di ukur volumenya ke dalam erlenmeyer
6. Memanaskan larutan tersebut diatas api bunsen atau hotplate sampai larut sempurna jangan sampai mendidih

7. Mengangkat larutan yang sudah di panaskan dan letakan dalam baskom berisi air hingga suam-suam kuku
8. Mengukur pH media yaitu 7,4. Jika terlalu asam tambahkan NaOH , sedangkan jika terlalu basa tambahkan HCL hingga pH 7,4
9. Menutup erlenmeyer dengan kapas berlemak dan mensterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit
10. Setelah dikeluarkan dari autoclave maka dituangkan ke dalam plate steril hingga merata
11. Mendinginkan media sampai terlihat memadat dan simpan dalam lemari es

3.7.5. Prosedur Pembuatan Media MSA

1. Melakukan perhitungan media MSA(Manitol Salt Agar)
Membuat MSA 25 plate @ plate ± 15-17ml
Komposisi MSA 108 gram per 1 Liter → $\frac{108\text{gr}}{1000\text{ ml}} \times 476\text{ ml} = 51,408\text{gr}$
2. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
3. Menimbang media MSA sesuai dengan perhitungan yaitu 45,9 gram menggunakan timbangan
4. Mengukur volume aquades sebanyak 425 ml menggunakan gelas ukur
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest yang sudah diukur volumenya ke dalam erlrmeyer
6. Memanaskan larutan tersebut diatas api bunsen atau hotplate sampai larut sempurna jangan sampai mendidih

7. Mengangkat larutan yang sudah dipanaskan dan letakan dalam baskom berisi air hingga suam-suam kuku
8. Mengukur pH media yaitu 7,2-7,4. Jika terlalu asam tambahkan NaOH , sedangkan jika terlalu basa tambahkan HCL
9. Menutup erlenmeyer dengan kapas berlemak dan menyeterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit
10. Setelah dikeluarkan dari autoclave maka dituangkan ke dalam plate steril hingga merata
11. Mendinginkan media sampai terlihat memadat dan simpan dalam lemari es.

3.7.6. Prosedur pemeriksaan

a. Hari pertama

Untuk mendapatkan Kuman 1 ml = 1000 maka dilakukan pengenceran kuman, dari Kuman *Staphylococcus aureus* dengan Stndart Mc. Farland 0,5 = 150.000.000, dengan Cara :

1. Mengambil Pz Steril sebanyak 14,9 ml + 0,1 ml Suspensi Kuman (Diambil Dari Standart Mc. Farland 0,5) dimasukkan kedalam Tabung steril → 1 ml = 1.000.000 Kuman.
2. Mengambil Pz Steril sebanyak 9 ml + 1 ml Suspensi Kuman (Diambil Dari pengenceran Kuman yang 1.000.000) dimasukkan kedalam Tabung steril → 1 ml = 100.000 Kuman.
3. Mengambil Pz Steril sebanyak 9,9 ml + 0,1 ml Suspensi Kuman (Diambil dari pengenceran Kuman yang 1.000.000) dimasukkan kedalam Tabung steril → 1 ml = 10.000 Kuman.

4. Mengambil Pz Steril sebanyak 9 ml + 1 ml Suspensi Kuman (Diambil dari pengenceran Kuman yang 10.000) dimasukkan kedalam Tabung steril → 1 ml = 1.000 Kuman.

Setelah dilakukan pengenceran, sehingga didapatkan kuman 1 ml = 1000 Kuman. Maka dilakukan penelitian pada Hari Pertama, dengan cara sebagai berikut :

1. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
2. Menyalakan api spiritus dengan korek api
3. Memberi label pada tiap tabung dari konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125% dan 0% sebagai kontrol
4. Mengambil suspensi kuman *Staphylococcus aureus* sebanyak 1 mata ose masukan kedalam tabung yang berisi rebusan konsentrasi 100% dengan cara menggesekan ose pada dinding permukaan media cair sebanyak 3kali. Kemudian mengambil lagi 1 mata ose kuman *Staphylococcus aureus* pada suspensi kuman dan membiakkannya pada tabung berlabel 50%, 12,5%, 6,25%, 3,125% dan 0% sebagai kontrol. Semua perlakuan dilakukan secara steril di dekat api.
5. Membuat konsentrasi 100%,50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, dan kontrol 0% dengan PZ steril:

Konsetrasi 100% : Di isi 1ml perasan Bawang putih ditambah 1 mata ose kuman dari Standart 100.000/ml. (Jadi dalam tabung 1 berisi 1ml Bawang putih ditambah suspensi Kuman *Staphylococcus aureus* 1000)
Homogenkan

- Konsetrasi 50% : Di isi 1 ml (Dari Konsentrasi 100%) ditambah 1 ml suspensi Kuman *Staphylococcus aureus* 1000 dan homogenkan.
- Konsetrasi 25% : Di isi 1 ml (Dari Konsentrasi 50%) ditambah 1 ml suspensi Kuman *Staphylococcus aureus* 1000 dan homogenkan.
- Konsetrasi 12,5% : Di isi 1 ml (Dari Konsentrasi 25%) ditambah 1 ml suspensi Kuman *Staphylococcus aureus* 1000 dan homogenkan.
- Konsetrasi 6,25% : Tabung 5, di isi 1 ml (Dari Konsentrasi 12,5%) ditambah 1 ml suspensi Kuman *Staphylococcus aureus* 1000 dan homogenkan.
- Konsetrasi 3,125% : Tabung 6, di isi 1 ml (Dari Konsentrasi 6,25%) ditambah 1 ml suspensi Kuman *Staphylococcus aureus* 1000 dan homogenkan.
- Konsetrasi 0% : Tabung 7, di isi 1 ml Pz Steril ditambah 1 ml suspensi Kuman *Staphylococcus aureus* dan 1000 homogenkan.

6. menutup kembali tabung dengan kapas berlemak

7. Menginkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (**Sumber:Randy, 2012**)

b. Hari kedua

1. Mengamati masing-masing tabung, apakah terjadi kekeruhan atau tidak

2. Bila kekeruhan sulit diamati secara visual maka menguji kembali ke media padat MSA (manitol Salt Agar) dengan tujuan memastikan apakah kuman yang tersebut adalah *Staphylococcus aureus*
3. Mengambil 1 mata ose kuman yang ada pada masing-masing konsentrasi.
4. Menanam pada media MSA dengan menggosokkan di permukaan media.
5. Menginkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam
- 6.

c. Hari ketiga

1. Mengamati hasil pada media padat apakah terbentuk koloni yang mengidentifikasika kuman tersebut adalah *Staphylococcus aureus*. Dan mencatat jumlah Koloni Kuman *Staphylococcus aureus*.
2. Mencatat konsentrasi terkecil sebagai sumber sebagai daya hambat kuman dan menghitung koloni
5. Hasil yang di amati sebagai data (**Sumber:Randy, 2012**)

3.8. Tabulasi Data

Data yang diperoleh ditabulasikan sebagai berikut :

Tabel 3.1. Contoh tabulasi data

| NO | KODE SAMPEL | Jumlah Koloni <i>Staphylococcus aureus</i> dari konsentrasi perasan Bawang putih yang tumbuh pada Media MSA | | | | | | |
|------------------|-------------|---|-----|-----|-------|-------|--------|---------|
| | | 100% | 50% | 25% | 12,5% | 6,25% | 3,125% | KONTROL |
| 1. | U1 | | | | | | | |
| 2. | U2 | | | | | | | |
| 3. | U3 | | | | | | | |
| 4. | U4 | | | | | | | |
| Jumlah | | | | | | | | |
| Rata-rata | | | | | | | | |

3.9. Metode Analisis Data

Data yang diperoleh pada Tabulasi data diatas, pada penelitian ini diuji menggunakan Anova. Dengan tingkat kesalahan 5% (0,05).