

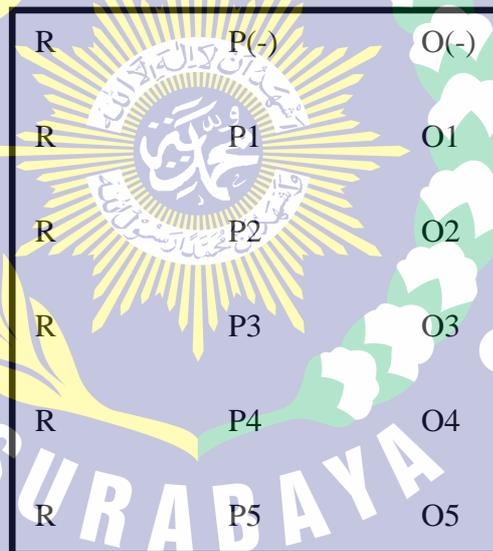
BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan tujuan untuk mengetahui apakah ada perbedaan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* berdasarkan konsentrasi media biji kurma (*Phoenix dactylifera* L.).

Rancangan penelitian dengan bentuk *Posstest Only Control Group Design* (Soekidjo, 2012) yang telah dimodifikasi sebagai berikut :



Gambar 3.1 *Posstest Only Control Group Design* (Soekidjo, 2012)

Keterangan:

R : Random

P(-) : Media *Nutrient Agar Plate* sebagai kontrol

P1 : Perlakuan tepung biji kurma konsentrasi 10%

P2 : Perlakuan tepung biji kurma konsentrasi 9%

P3 : Perlakuan tepung biji kurma konsentrasi 8%

P4 : Perlakuan tepung biji kurma konsentrasi 7%

P5 : Perlakuan tepung biji kurma konsentrasi 6%

O(-) : Observasi setelah perlakuan pada media kontrol

- O1 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 10%
 O2 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 9%
 O3 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 8%
 O4 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 7%
 O5 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 6%

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi

Tepung Biji kurma yang berasal dari biji kurma dengan melalui beberapa tahapan proses pengolahan.

3.2.2 Sampel

Tepung Biji kurma dengan berbagai macam konsentrasi, yaitu: 10%, 9%, 8%, 7% dan 6%. Sedangkan jumlah pengulangan sampel diperoleh dari rumus sebagai berikut:

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

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n = 4$$

Keterangan:

n : Jumlah pengulangan

k : Perlakuan

Jadi jumlah pengulangan sebanyak 4 kali.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Program Studi D-3 Analisis Kesehatan, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2018 sampai dengan bulan Agustus 2019. Sedangkan waktu pemeriksaan dilakukan pada bulan Juni 2019.

3.4 Variabel dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel Bebas : Konsentrasi tepung biji kurma.
Variabel Terikat : Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*
Variabel Kontrol : Lama inkubasi, suhu, jumlah suspensi kuman *Staphylococcus aureus*

3.4.2 Definisi Operasional

1. Konsentrasi tepung biji kurma dikategorikan menjadi berbagai macam konsentrasi, yaitu: 10%, 9%, 8%, 7% dan 6% dengan menambahkan agar 1,5 gr (sesuai hasil uji pendahuluan).
2. Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* adalah ditetapkan berdasarkan adanya koloni pada media biji kurma setelah dieramkan selama 24 jam dengan suhu 37°C. Untuk melihat ada tidaknya pertumbuhan kuman perlu dilakukan pemeriksaan lanjutan yaitu dengan cara melakukan pewarnaan Gram.

Pertumbuhan dikategorikan menjadi :

- a) Positif (+) : ada pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, ditandai dengan adanya *coccus* Gram positif.
- b) Negatif (-) : tidak ada pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aures*, ditandai dengan tidak ditemukannya *coccus* Gram positif atau tidak adanya koloni pada media biji kurma.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh melalui uji Laboratorium. Langkah-langkah pemeriksaannya adalah sebagai berikut:

3.5.1 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan yaitu timbangan, autoklaf, *laminer air flow* (LAF), inkubator, cawan petri, erlenmeyer, *beaker glass*, pipet ukur, pipet pasteur, *filler*, gelas ukur, pengaduk, air spirtus, kaki tiga, ose bulat, pH meter.

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu aquadest, tepung biji kurma, NaCl fisiologis 0,85% steril, agar-agar, *nutrient agar*, *bloog agar*, *mannitol salt agar*, suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*, NaOH 0,1 N, HCl 0,1 N, Pewarnaan Gram, BaCl₂ 1%, H₂SO₄ 1%, H₂O₂ 3%, Na Citrat 3,8%.

3.5.2 Prosedur Penelitian

3.5.2.1 Tahap Persiapan

a. Pembuatan tepung biji kurma (*Phoenix dactylifera* L.)

- 1) Biji kurma dicuci dengan air hingga bersih sampai terbebas dari sisa-sisa daging buahnya.
- 2) Meniriskan biji kurma yang telah dicuci sampai kering.
- 3) Mengeringkan biji kurma dengan menggunakan metode sangrai yaitu menggoreng biji kurma tanpa menggunakan minyak selama ± 10 menit (sampai biji berubah warna kecoklatan).
- 4) Haluskan biji kurma yang telah dikeringkan dengan mesin penggiling hingga menjadi tepung.

b. Uji pendahuluan untuk menentukan konsentrasi agar

- 1) Membuat variasi konsentrasi media tepung biji kurma dengan cara menimbang agar dan tepung biji kurma masing-masing sebanyak 1 gr dan 9 gr, kedua sebanyak 2 gr dan 8 gr, ketiga sebanyak 3 gr dan 7 gr dan keempat sebanyak 4 gr dan 6 gr.
- 2) Melarutkan dengan aquadest 100 mL pada setiap masing-masing konsentrasi yang telah dibuat dalam erlenmeyer.
- 3) Memanaskan dan diaduk sampai larut kemudian dicek pH media sampai netral (± 7).
- 4) Menuang ke dalam cawan petri dan didiamkan sampai mengeras.
- 5) Mengamati tekstur yang paling baik digunakan untuk media tepung biji kurma yaitu tidak terlalu padat dan tidak terlalu lunak.

c. Pembuatan suspensi *Staphylococcus aureus*

- 1) Pembuatan Larutan Standar *McFarland 0,5*
 - a) Menyiapkan 2 tabung steril, masing-masing untuk suspensi kuman dan standart *McFarland 0,5*
 - b) Membuat perbandingan antara BaCl_2 1% : H_2SO_4 1% sebesar 1 : 90
 - c) Memipet 0,05 mL BaCl_2 1% + 9,95 mL H_2SO_4 1%
 - d) Mencampurkan dengan cara kocok pelan tabung
 - e) Standart *McFarland 0,5* ini sama tiap 1 mL dengan $1,5 \times 10^8$
- 2) Pembuatan suspensi bakteri

Dalam biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus* diambil dengan ose bulat, kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi berisi PZ (NaCl 0,85%-0,9%) steril, homogen dan bandingkan dengan standart *McFarland 0,5*. Bila didapatkan kekeruhan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* yang melebihi standart *McFarland 0,5* maka tambahkan PZ steril, apabila kekeruhan yang ditimbulkan kurang dari standart *McFarland 0,5* maka tambahkan dengan kultur murni bakteri *Staphylococcus aureus*. Lakukan hal tersebut sampai didapatkan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* yang sesuai dengan standart *McFarland 0,5*.

d. Pembuatan media tepung biji kurma (*Phoenix dactylifera* L.)

- 1) Menimbang tepung biji kurma masing-masing sebanyak 6 gr, 7 gr, 8 gr, 9 gr dan 10 gr kemudian ditambahkan agar-agar 1,5 gr (sesuai

hasil uji pendahuluan) lalu dilarutkan dengan 100 mL aquadest dalam erlenmeyer.

- 2) Memanaskan dan diaduk sampai larut lalu di periksa pH pada media dengan kertas indikator pH, syarat media pH harus netral (± 7).
- 3) Larutan media tepung biji kurma ditutup dengan menggunakan kapas kemudian disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C tekanan 1,5 atm selama 15 menit.
- 4) Media tepung biji kurma siap digunakan. Simpan dalam lemari es jika belum akan digunakan.

e. Pembuatan media *Blood Agar Plate* (BAP)

- 1) Menimbang 8 gr bubuk *Blood Agar* kemudian dilarutkan dalam 200 mL aquadest.
- 2) Memanaskan dan mengaduk sampai larut sempurna kemudian memeriksa pH media sesuai dengan pH kemasan yaitu $7,3 \pm 0,2$.
- 3) Menutup media menggunakan kapas kemudian disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C tekanan 1,5 atm selama 15 menit.
- 4) Melakukan suam-suam pada media BAP dengan syarat tidak boleh terlalu panas atau sampai menjadi agar.
- 5) Menambahkan 16 mL darah domba atau manusia dengan golongan darah O, kemudian homogenkan.
- 6) Menuang secara aseptis pada cawan petri steril sebanyak ± 20 mL.

f. Pembuatan media *Manitol Salt Agar* (MSA)

- 1) Menimbang 21,6 gr bubuk *Manitol Salt Agar* (MSA) kemudian dilarutkan dalam 200 mL aquadest.
- 2) Memanaskan dan mengaduk sampai larut sempurna kemudian diperiksa pH media sesuai dengan pH kemasan yaitu $7,4 \pm 0,2$.
- 3) Menutup media menggunakan kapas kemudian disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C tekanan 1,5 atm selama 15 menit.
- 4) Menuang secara aseptis pada cawan petri steril sebanyak ± 20 mL.

g. Pembuatan media *Nutrient Agar Plate* (NAP)

- 1) Menimbang 2 gr bubuk bubuk *Nutrient Agar* kemudian dilarutkan dalam 100 mL aquadest.
- 2) Memanaskan dan mengaduk sampai larut sempurna kemudian diperiksa pH media sesuai dengan pH kemasan yaitu $7,0 \pm 0,2$.
- 3) Menutup media menggunakan kapas kemudian disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C tekanan 1,5 atm selama 15 menit.
- 4) Media NAP siap digunakan. Simpan dalam lemari es jika belum akan digunakan.

h. Pembuatan media *Nutrient Agar Slant* (NAS)

- 1) Menimbang 1,2 gr bubuk *Nutrient Agar* kemudian dilarutkan dalam 60 mL aquadest.
- 2) Memanaskan dan mengaduk sampai larut sempurna kemudian diperiksa pH media sesuai dengan pH kemasan yaitu $7,0 \pm 0,2$.
- 3) Menutup media menggunakan kapas kemudian disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

- 4) Menuang secara aseptis pada tabung steril sebanyak \pm 6 mL.

3.5.2.2 Tahap Penelitian

Hari Pertama

1. Membuat biakan murni kuman *Staphylococcus aureus* dengan cara inokulasi kuman pada media NAS ke media *Blod Agar Plate* (BAP), lalu inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Hari Kedua

1. Mengamati morfologi koloni kuman pada media *Blod Agar Plate* (BAP), bakteri *Staphylococcus aureus* memiliki ciri-ciri koloni secara makroskopis berwarna transparan dan coccus (bergerombol seperti anggur) sifat Gram positif secara mikroskopis.
2. Mengambil koloni berwarna transparan lalu inokulasi ke media *Manitol Salt Agar* (MSA) kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Hari Ketiga

1. Mengamati pertumbuhan kuman pada media *Manitol Salt Agar* (MSA), bakteri *Staphylococcus aureus* memiliki ciri-ciri mampu memecah mannitol (media berubah dari merah muda menjadi kuning).
2. Melakukan Tes Katalase dan Koagulase
 - a. Tes Katalase
 - 1) Menyiapkan reagen H₂O₂ 3%.
 - 2) Menyiapkan objek glass yang bebas dari lemak dan steril ose bulat kemudian dinginkan.

- 3) Mengambil 1 tetes H₂O₂ 3% dan teteskan pada objek glass.
- 4) Mengambil kuman pada media MSA secara steril, campurkan H₂O₂ 3% dengan kuman.
- 5) Jika muncul gelembung (+) : *Staphylococcus*, sebaliknya jika tidak muncul gelembung (-) : *Streptococcus* atau *coccus* genus lain.

b. Tes Koagulase

- 1) Menyiapkan PZ steril dan plasma yang sudah diencerkan dengan PZ (1:4)
 - 2) Menyiapkan objek glass yang bebas dari lemak dan steril ose bulat kemudian dinginkan.
 - 3) Mengambil PZ steril dengan ose bulat dan letakkan pada objek glass.
 - 4) Mengambil plasma yang sudah diencerkan dengan ose bulat
 - 5) Mengambil kuman secara steril pada media MSA dan campurkan sampai rata.
 - 6) Jika ada gumpalan seperti pasir (+) : *Staphylococcus aureus*, jika tidak ada gumpalan pasir (-) : *Staphylococcus citrius* atau *Staphylococcus albus* atau *Staphylococcus non patogen*.
3. Melakukan pembuatan suspensi *Staphylococcus aureus* dengan ketentuan *Standart McFarland 0,5*
 4. Melakukan penanaman suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* pada media tepung biji kurma metode *pour plate*, dengan cara :

- 1) Memindahkan sebanyak 1 mL suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ke dalam cawan petri steril menggunakan pipet ukur steril.
- 2) Menambahkan media tepung biji kurma yang masih cair (suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$) ke dalam cawan petri steril sebanyak ± 20 mL.
- 3) Memutar cawan petri secara perlahan-lahan di atas meja *horizontal* (membentuk angka 8) untuk mencampurkan media dengan suspensi bakteri.
- 4) Mengeramkan dalam inkubator dengan posisi terbalik pada suhu 37°C selama 24 jam.
5. Melakukan penanaman suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* pada media *Nutrient Agar Plate* (NAP) sebagai kontrol positif (perlakuan sama dengan media biji kurma).
6. Melakukan uji sterilitas dengan cara media tepung biji kurma steril dieramkan pada suhu 37°C selama 24 jam (tanpa dilakukan penanaman bakteri).

Hari Keempat

1. Melakukan identifikasi koloni yang tumbuh pada media biji kurma dan media *Nutrient Agar Plate* (NAP) dengan pewaranaan Gram untuk melihat apakah yang tumbuh tetap bakteri *Staphylococcus aureus* atau bukan dengan ciri-ciri *coccus* Gram positif.

3.5.3 Tabulasi Data

Tabel 3.1 Contoh tabulasi data

Pengulangan Sampel	Konsentrasi Tepung Biji Kurma (<i>Phoenix dactylifera</i> L.)					Kontrol (NAP)
	6%	7%	8%	9%	10%	
1						
2						
3						
4						
Jumlah						

3.6 Metode Analisis Data

Data pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dianalisis menggunakan uji *Chi-square* dengan tingkat kesalahan 5% (0,05).

