

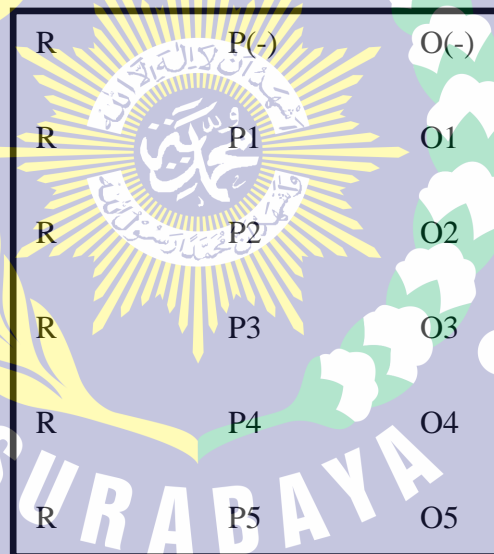
## BAB 3

### 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, BaCl<sub>2</sub> 1%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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  $\pm 10$  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 ( $\pm 7$ ).
- 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  $\text{BaCl}_2$  1% :  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1% sebesar 1 : 90
  - c) Memipet 0,05 mL  $\text{BaCl}_2$  1% + 9,95 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  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 ( $\text{NaCl}$  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 ( $\pm 7$ ).
- 3) Larutan media tepung biji kurma ditutup dengan menggunakan kapas kemudian disterilkan dengan autoklaf suhu  $121^{\circ}\text{C}$  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  $121^{\circ}\text{C}$  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  $\pm 20$  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  $121^{\circ}\text{C}$  tekanan 1,5 atm selama 15 menit.
- 4) Menuang secara aseptis pada cawan petri steril sebanyak  $\pm 20$  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  $121^{\circ}\text{C}$  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  $121^{\circ}\text{C}$  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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%.
    - 2) Menyiapkan objek glass yang bebas dari lemak dan steril ose bulat kemudian dinginkan.

- 3) Mengambil 1 tetes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% dan teteskan pada objek glass.
- 4) Mengambil kuman pada media MSA secara steril, campurkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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  $\pm 20$  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  $37^{\circ}\text{C}$  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  $37^{\circ}\text{C}$  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).

