

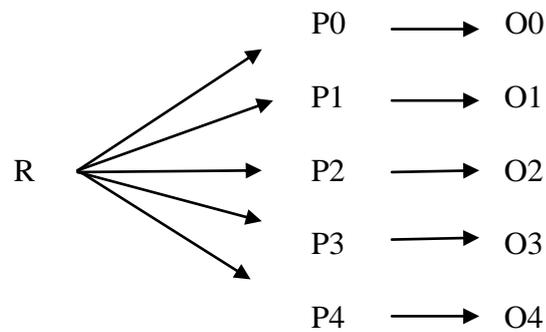
BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh yang timbul sebagai akibat dari adanya perlakuan tertentu (Notoatmodjo, 2005), dalam hal ini untuk mengetahui pengaruh perasan daun kelor (*M. oleifera*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Desain penelitian sebagai berikut :



Gambar 3.1: Rancangan Penelitian (Mufarrijah, 2013)

R : Random

P(-) : Perlakuan yang tidak diberi air perasan daun kelor

P1 : Perlakuan konsentrasi air perasan daun kelor 100%

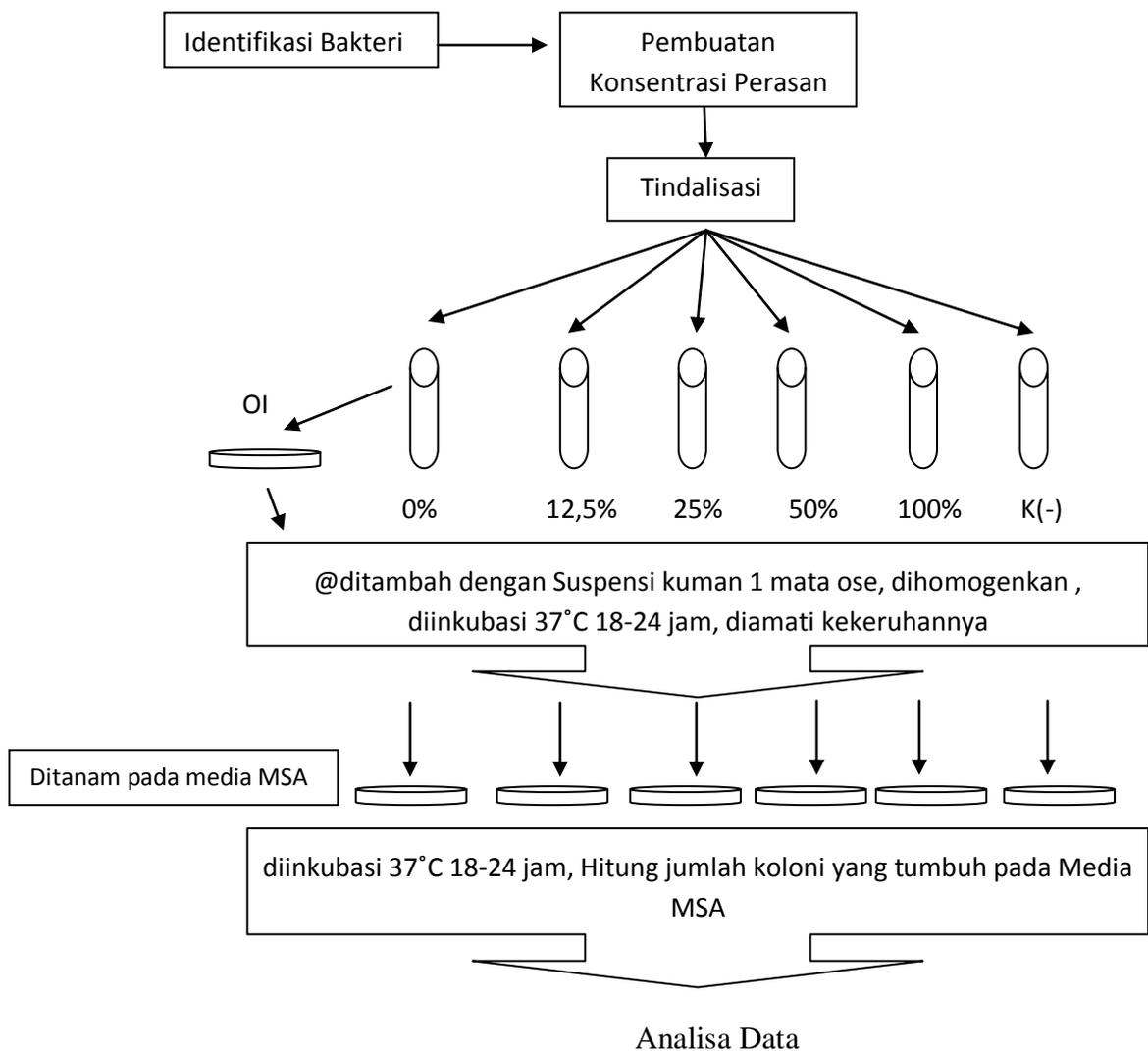
P2 : Perlakuan konsentrasi air perasan daun kelor 50%

P3 : Perlakuan konsentrasi air perasan daun kelor 25%

P4 : Perlakuan konsentrasi air perasan daun kelor 12,5%

- O(-) : Observasi setelah tidak diberi perasan daun kelor
- O1 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 100%
- O2 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 50%
- O3 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 25%
- O4 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 12,5%

3.2. Kerangka Kerja



Gambar 3.2 : Kerangka kerja

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi

Staphylococcus aureus dalam media pertumbuhan. *Staphylococcus aureus* yang ditumbuhkan berasal dari biakan murni yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.3.2. Sampel

Dalam penelitian ini sampel yang digunakan adalah biakan bakteri *Staphylococcus aureus*, dengan jumlah sampel yang di hitung berdasarkan rumus sebagai berikut (Hidayat, 2010) :

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

$$(r-1)(4-1) \leq 15$$

$$(r-1)(3) \leq 15$$

$$r - 1 \geq 15/3$$

$$r - 1 \geq 5$$

$$r \geq 5 + 1$$

$$r \geq 6$$

Keterangan : r = replika / pengulangan , k = kelompok

3.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

3.4.1. Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian di lakukan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya JL. Sutorejo 59 surabaya.

3.4.2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Maret 2015 sampai bulan Juni 2015, sedangkan waktu pemeriksaan dilaksanakan pada bulan Juni 2015

3.5. Variabel Dan Definisi Operasional Variabel

3.5.1. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Konsentrasi air perasan daun kelor (*M. oleifera*)
2. Variabel terikat : Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*
3. Variabel kontrol : Lama Inkubasi, suhu, jumlah suspensi kuman *Staphylococcus aureus* dan volume air perasan daun kelor.

3.5.2. Definisi Operasional Variabel

1. Konsentrasi perasan daun kelor adalah Daun kelor yang dihaluskan kemudian diperas dan divariasikan dalam berbagai konsentrasi menjadi 100%, 50%, 25% , 12,5% dan 0%.
2. Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* adalah jumlah koloni *Staphylococcus aureus* yang tumbuh pada media MSA.
3. Lama Inkubasi 24 jam, suhu 37°C, Jumlah suspensi kuman *Staphylococcus aureus* 1juta/ml, volume air perasan daun kelor 1 ml.

3.6. Tehnik Pengumpulan Data

Data pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh dengan cara observasi tidak langsung, yaitu dengan melalui uji Laboratorium. Pemeriksaan daya hambat bakteri *Staphylococcus aureus* ini menggunakan metode Pengenceran. Langkah-langkah pemeriksaannya diantaranya sebagai berikut :

3.6.1. Prinsip Pemeriksaan

Tes ini menggunakan tabung reaksi sejumlah tertentu bakteri *Staphylococcus aureus* yang diuji ditambah dengan obat yang telah diencerkan secara serial dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan pada tabung. Konsentrasi terendah obat ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih adalah KHM dari obat. Selanjutnya biakan dari tabung yang jernih di inokulasikan pada media agar padat, diinkubasi dan keesokan harinya diamati ada tidaknya koloni mikroba yang tumbuh. Konsentrasi terendah obat ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni mikroba adalah KBM dari obat terhadap bakteri uji. (Dzen *et al*, 2003)

3.6.2. Alat-Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : (1)Timbangan, (2)Autoclave, (3)Tabung Centrifuge, (4)Tabung Reaksi, (5)Pipet Ukur, (6)Gelas ukur, (7)Pengaduk, (8)Plate, (9)Rak tabung, (10)Pipet Pasteur, (11)Ose, (12)Api spiritus, (13)Blender, (14)Filler, (15)Erlenmayer. Sebelum digunakan, semua alat dan bahan yang akan digunakan di sterilisasi didalam autoclave pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 20 menit.

3.6.3. Bahan Pemeriksaan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : (1)Air perasan daun kelor, (2)Suspensi kuman *Staphylococcus aureus*, (3)Aquades steril , (4)Media *Nutrient Agar* (NA), (5)Pz steril, (6)Media *Manitol Salt Agar* (MSA)

3.6.4. Reagen Pemeriksaan

Reagen yang digunakan dalam penelitian ini adalah : (1)NaOH 0.1 N, (2)HCl 0.1 N, (3)BaCl 1%, (4)H₂SO₄ 1%.

3.6.5. Preparasi Bakteri

A. Pewarnaan Gram

Prosedur pengecatan Gram :

1. Pembuatan sediaan apusan kuman pada gelas obyek
2. Sediaan dituangi dengan Kristal Violet selama 1 menit. Buang sisa Kristal Violet dan bilas dengan air. Kristal Violet disini berfungsi sebagai bahan warna dasar.
3. Sediaan dituangi dengan Lugol selama 1 menit. Buang sisa lugol dan bilas dengan air
4. Sediaan dituangi dengan Alkohol 96 % selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Buang sisa Alkohol dan bilas dengan air.
5. Sediaan dituangi dengan Safranin selama 0.5 menit. Buang sisa Safranin dan bilas dengan air. Adapun Safranin di sini berfungsi sebagai bahan warna pembanding.
6. Sediaan dikeringkan menggunakan kertas penghisap. Dan selanjutnya dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 100x.

B. Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

1. Dilakukan Kultur *Staphylococcus aureus* pada agar NAP.
2. Kemudian NAP tersebut diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
3. Didapatkan gambaran *Warna Kuning Emas* pada agar NAP.
4. Dilakukan pewarnaan Gram dari koloni kuman pada NAP.
5. Dikonfirmasi dengan penanaman pada media MSA dan di inkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

3.6.6. Prosedur Pembuatan Suspensi Kuman

A. Prosedur Pembuatan Standart Mac Farlan I :

1. Memipet 0,1 ml Barium Clorida (BaCl_2) 1% kedalam tabung reaksi
2. Menambah 9,9 Asam Sulfida (H_2SO_4) 1%
3. Mencampur kedua larutan tersebut sehingga didapatkan standart Mac Farland I maka setara dengan jumlah kuman 3×10^8 CFU/ml

B. Prosedur membuat suspensi kuman *S. aureus* menggunakan standart Mac Farland I = 3×10^8 CFU/ml :

1. Mengisi tabung reaksi dengan 10 ml PZ Steril
2. Ambil dengan lidi kapas stereril biakan murni kuman *S. aureus* pada media NAS
3. Kemudian homogenkan, bandingkan dengan standart Mac farland I.
4. Bila suspensi kuman lebih keruh dari standart Mac Farland I maka ditambah PZ, jika kekeruhannya kurang ditambah dengan biakan kuman murni.
5. Sehingga diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi 3×10^8 sebanyak 10 ml, selanjutnya dilakukan standarisasi ose yang akan digunakan untuk penelitian dengan cara :
 1. Menyiapkan pipet 0.1 ml dan filter serta tabung
 2. Memiipet 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 api spirtus, lakukan berulang- ulang sampai air dalam tabung habis.

5. Didapatkan 30 mata ose air tersebut habis.

0,1 ml = 0.003

1 mata ose = 1 juta kuman (bila suspense kuman permililiternya 300 juta kuman).

3.6.7. Prosedur Pembuatan Media

A. Nutrient Agar Plate (NAP)

1. Melakukan perhitungan media *Nutrient Agar* (NA)

Membuat NAP 5 plate, @ plate \pm 17ml

Komposisi NA 20gr/Liter $\rightarrow \frac{20 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}} \times 85 \text{ ml} = 1,7 \text{ gr}$

2. Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan.

3. Menimbang bahan (media NA) sesuai dengan perhitungan yaitu 1,7 gr menggunakan timbangan.

4. Mengukur volume aquadest 85 ml menggunakan gelas ukur.

5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest yang sudah diukur volumenya dalam erlenmeyer.

6. Memanaskan larutan diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih.

7. Mengangkat larutan yang sudah dipanaskan dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam – suam kuku.

8. Mengukur pH nya sampai 7.4, jika terlalu asam menambahkannya dengan NaOH 0.1 N, sedangkan jika terlalu basa menambahkannya dengan HCl 0.1 N sampai pH nya 7.4.

9. Menutup erlenmeyer dengan kapas berlemak dan menyeterilkannya dengan autoclave, pada suhu 121°C selama 15 menit.
10. Setelah turun dari autoclave, tuang ke dalam plate yang steril sampai rata.
11. Mendinginkannya sampai terlihat padat dan menyimpannya ke almari es.

B. Manitol Salt Agar (MSA)

1. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
2. Dilakukan perhitungan terhadap jumlah bahan / media MSA yang dibutuhkan :
Membuat MSA 25 plate, @ plate 17 ml
Komposisi MSA 108 gr/1 liter $\rightarrow \frac{108 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}} \times 425 \text{ ml} = 45,9 \text{ gr}$
3. Melakukan penimbangan bahan sesuai dengan perhitungan yaitu 45,9 gr menggunakan timbangan.
4. Mengukur volume aquadest yang di butuhkan yaitu sebanyak 425 ml dengan 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 media yang sudah larut sempurna dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suhunya hangat.
8. 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 7,4.
9. Menutup media yang ada di erlenmeyer dengan kapas berlemak dan koran serta mengikatnya. Menyeterilisasi larutan tersebut bersama dengan plate

yang dibutuhkan di autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

10. Setelah turun dari Autoclave, tuang media ke dalam plate ± 17ml (Laporan praktikum media, 2012)

3.6.8. Prosedur Pembuatan Konsentrasi Air Perasan Daun Kelor

1. Cara Pembuatan air perasan daun kelor :

- a. Memilih daun kelor yang segar berwarna hijau (tidak kering)
- b. Mencuci bersih daun kelor tersebut dengan air panas (Aquadest Steril) yang suhunya 60° - 80° C (steril basah)
- c. Kemudian menghaluskan daun kelor segar dengan mortir sampai halus (sebelumnya mortir di usap dengan alkohol swab agar steril)
- d. Setelah halus atau hancur meletakkannya pada kertas saring kasar, memeras dan disaring sampai keluar airnya sehingga didapatkan perasan daun kelor 100%.
- e. Air perasan yang sudah didapat dimasukkan ke dalam tabung steril dan kemudian di centrifuge sehingga didapatkan air perasan daun kelor 100% yang jernih.
- f. Melakukan sterilitas bahan dengan mengambil 1 mata ose dan ditanam pada media NAP dengan cara menggores ke permukaan media
- g. Inkubasi di inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam
- h. Mengamari hasilnya jika tidak ada pertumbuhan kuman maka perasan daun kelor sudah benar-benar steril, namun jika pada media NAP terdapat pertumbuhan kuman maka perlu di lakukan proses tindalisasi, yaitu :
 1. Memanaskan air perasan daun kelor pada waterbath dengan suhu 90°C selama 15 menit

2. Kemudian meletakkannya di inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C
3. Mengulangi perlakuan tersebut sampai 3x
 - i. Menanam kembali air perasan daun kelor yang sudah melalui proses tindalisasi di media NAP dan menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37° C.

2. Cara Pembuatan Konsentrasi :

Untuk membuat air perasan daun kelor dengan konsentrasi 50 % dari konsentrasi 100 % ialah dengan mengambil air perasan daun kelor 100 % sebanyak 0,5 ml kemudian ditambahkan dengan aquades steril sebanyak 0,5 ml. Untuk lebih lengkapnya kita lihat dalam tabel berikut ini :

Tabel 3.1 Pengenceran Air Perasan Daun Kelor

Konsentrasi (%)	Air perasan daun kelor 100% (ml)	Aquabides steril (ml)	Volume (ml)
0	0	1	1
12,5	0,125	0,875	1
25	0,25	0,75	1
50	0,50	0,50	1
100	1	1	1

3.6.9. Prosedur Pemeriksaan Sampel

A. Hari pertama pemeriksaan :

1. Menyiapkan tabung reaksi steril 5 buah dan bahan yang dibutuhkan
2. Menyalakan api spirtus dengan korek api.
3. Pada tabung 1 sampai 5 dilabeli sesuai dengan konsentrasi air perasan daun kelor dan dibuat larutan untuk pengujian daya hambat bakteri, adapun larutan daya hambat bakteri tersebut dibuat dengan cara mencampurkan antara ekstrak daun kelor dan larutan bakteri uji dengan perbandingan sebagai berikut :

- a. Tabung 1 (konsentrasi 100%) : 1 ml perasan daun kelor konsentrasi 100% + 1 mata ose larutan bakteri uji
 - b. Tabung 2 (konsentrasi 50%) : 1 ml perasan daun kelor konsentrasi 50% + 1 mata ose larutan bakteri uji
 - c. Tabung 3 (konsentrasi 25%) : 1 ml perasan daun kelor konsentrasi 25% + 1 mata ose larutan bakteri uji
 - d. Tabung 4 (konsentrasi 12.5%) : 1 ml perasan daun kelor konsentrasi 12.5% + 1 mata ose larutan bakteri uji
 - e. Tabung 5 (Kontrol Negatif) : 1 ml perasan daun kelor konsentrasi 100%
 - f. Kontrol Positif : 1 mata ose larutan bakteri uji langsung ditanam pada media MSA sebagai original Inoculum (OI)
4. Semua tabung diatas, baik tabung yang digunakan untuk pengujian daya hambat bakteri maupun tabung yang dipergunakan untuk kontrol negatif, dicampur dengan vortex hingga rata.
 5. Semua tabung dan plate di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- B. Hari kedua :**
1. Diperhatikan dan dicatat pada tabung no berapa tampak mulai terjadi kekeruhan. Kadar terendah pada tabung yang menunjukkan tidak ada kekeruhan merupakan kadar hambat minimum (KHM)
 2. Semua tabung dari tabung 1 – 5 diambil 1 mata ose dan ditanam pada media MSA yang telah ditandai 37°C selama 24 jam.
- C. Hari Ketiga :**
1. Diamati ada tidaknya pertumbuhan koloni kuman pada MSA ke-1 sampai dengan MSA ke-5, dan hitung jumlah koloni kuman yg tumbuh pada masing-

masing MSA. Konsentrasi terendah dimana pada medium agar padat tidak menunjukkan adanya pertumbuhan koloni merupakan Kadar Bunuh Minimal

3.7. Metode Analisis Data

Data yang diperoleh ditabulasikan sebagai berikut:

Tabel 3.2. Contoh tabulasi data

NO	KODE SAMPEL	KONSENTRASI				
		0%	12,5%	25%	50%	100%
1	U1					
2	U2					
3	U3					
4	U4					
5	U5					
6	U6					

Dengan keterangan :

Dihitung jumlah koloni kuman yang tumbuh pada media MSA

Data yang diperoleh diuji menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dengan tingkat kesalahan 5% (0,05).