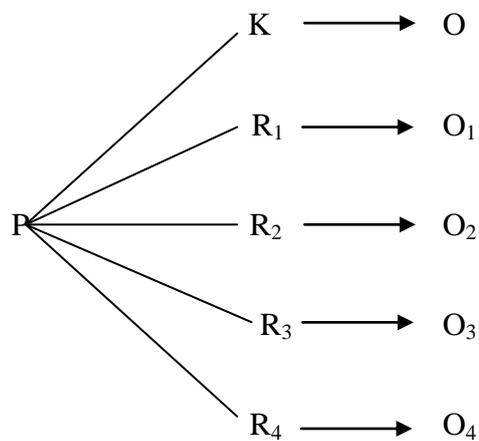


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan rancangan penelitian Eksperimental dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh perasan daun majapahit (*Crescentia cujete* Linn) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan rancangan penelitian sebagai berikut :



Keterangan :

R : Random

K : Perlakuan tanpa pemberian perasan daun Majapahit.

R₁ : Perlakuan dengan pemberian konsentrasi 25 %.

R₂ : Perlakuan dengan pemberian konsentrasi 50%.

R₃ : Perlakuan dengan pemberian konsentrasi 75%.

R₄ : Perlakuan dengan pemberian konsentrasi 100%.

O : Observasi setelah perlakuan kontrol.

O₁ : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 25%.

O₂ : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 50%.

O₃ : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 75%.

O₄ : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 100%.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* murni pada media NAS (*Nutrien agar Slant*).

3.2.2 Sampel Penelitian

Dalam penelitian ini sampel yang diambil adalah bakteri *Staphylococcus aureus* yang dipindah dari biakan murni di media NAS. Dalam penelitian terdapat 5 perlakuan. Setiap perlakuan dilakukan masing-masing 5 kali perlakuan yang diperoleh berdasarkan rumus Aziz (2012), hasil pengulangan sebagai berikut :

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

$$(r-1) (5-1) \leq 15$$

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

$$4r - 4 \leq 15$$

$$4r \leq 15 + 4$$

$$4r \leq 19$$

$$\frac{r \leq 19}{4} = 4,75$$

$$r \approx 5$$

Keterangan :

r : jumlah replikasi (pengulangan).

t : banyak kelompok perlakuan.

Jadi jumlah perlakuan sebanyak 5 kali pengulangan.

3.2.3 Teknik Sampling

Sampel dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* murni yang dipindah dari biakan murni dan tumbuh pada media *Manitol Salt Agar* (MSA). Bakteri *Staphylococcus aureus* diambil secara random.

3.3 Lokasi dan waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi penelitian

Lokasi penelitian ini dilaksanakan dilaboratorium Mikrobiologi D3 Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya, Jalan Sutorejo No.59 Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Januari sampai dengan bulan Juni 2017. Sedangkan waktu pemeriksaan dilaksanakan pada bulan April 2017.

3.4 Variabel dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel Bebas : Konsentrasi perasan daun Majapahit (*Crescentian cujete* Linn).

Variabel Terikat : Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Variabel Kontrol : Lama inkubasi, suhu, jumlah suspensi kuman *Staphylococcus aureus*.

3.4.2 Definisi Operasional

1. Perasan adalah suatu cara yang digunakan untuk mengeluarkan zat aktif yang terdapat di dalam sel bahan alami, baik secara manual maupun mekanik. Perasan daun majapahit dikategorikan menjadi beberapa macam konsentrasi, yaitu : 0 % (kontrol), 25 %, 50 %, 75 %, dan 100 %.
2. Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ditetapkan berdasarkan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yang tumbuh setelah inkubasi 24 jam dengan suhu 37°C pada media MSA (*Manitol Salt agar*) dengan satuan CFU.

3.5 Pengumpulan dan Analisis Data

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

3.5.1 Pengumpulan Data

Senyawa anti bakteri diencerkan sehingga diperoleh beberapa konsentrasi. Kemudian masing-masing konsentrasi ditambahkan suspensi bakteri uji dalam media cair. Mengamati ada tidaknya bakteri *Staphylococcus aureus* setelah diberi perlakuan perasan daun majapahit dengan berbagai konsentrasi yang ditanam di media MSA. Pertumbuhan dilihat setelah diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.

3.5.1.1 Tahap Penelitian

1. Alat-alat yang digunakan adalah :

- | | |
|------------------|---------------------------------|
| a. Cawan petri | j. Inkubator |
| b. Pipet Pasteur | k. Kain kasa steril (penyaring) |
| c. Pipet ukur | l. Pemanas air (water bath) |
| d. Autoclave | m. Pengaduk |
| e. Tabung reaksi | n. Api spirtus + kaki tiga |
| f. Erlenmeyer | o. Ose |
| g. Gelas ukur | p. Filler |
| h. Pengaduk | q. Alat pemanas |
| i. Rak tabung | r. Tabung centrifuge |

2. Bahan yang digunakan adalah :

- | | |
|--------------------|--|
| a. Daun majapahit | c. Media MSA |
| b. Aquadest steril | d. Suspensi kuman <i>Staphylococcus aureus</i> |

3. Reagen Pemeriksaan adalah :

- | | |
|---------------|--------------------------------------|
| a. Pz steril | d. BaCl 1% |
| b. NaOH 0,1 N | e. H ₂ SO ₄ 1% |
| c. HCl 0,1 N | |

3.5.1.2 Prosedur Pemeriksaan

1. Prosedur Pembuatan Standart Mac Farland I
 - a. Siapkan tabung steril kemudian membuat perbandingan BaCl 1% : H₂SO₄ 1% sebesar 1 : 9.
 - b. Pipet 0,1 ml BaCl 1% + 9,9 ml H₂SO₄ 1%.
 - c. Homogenkan dengan cara mengocok pada tabung.
2. Proses Pembuatan Suspensi Kuman
 - a. Siapkan tabung steril dan masukkan pz (NaOH 0,85%) steril.
 - b. Ambil biakan kuman *Staphylococcus aureus* murni yang sudah ditanam di media NAS dengan ose bulat steril.
 - c. Masukkan ose yang berisi kuman tadi ke tabung yang berisi pz (NaOH 0.85%).
 - d. Bandingkan warna susupensi kuman dengan standart Mc Farlan I.
 - e. Apabila warna kurang keruh, maka tambahkan kuman lagi dengan ose steril. Dan apabila warnanya terlalu keruh, maka tambahkan pz sehingga sama dengan warna standart Mc Farlan I.
3. Proses Pengenceran Suspensi Kuman
 - a. Setelah didapatkan kuman yang sesuai standart Mc Farlan I, maka didapatkan hasil 1:300.000.000 (3×10^8 CFU/ml).
 - b. Encerkan suspensi kuman sehingga didapatkan hasil 1 : 1000 (3×10^3 CFU/ml).

Prosedur pengenceran :

 - 1) Ambil suspensi kuman pada tabung 1 sebanyak 1 ml dari standart Mc Farlan I (3×10^8 CFU/ml), lalu masukkan pada

tabung ke 2 dan tambahkan 9 ml pz, itu setara dengan 3×10^7 CFU/ml.

2) Selanjutnya, ambil kuman pada tabung ke 2 dari pengenceran suspensi kuman 3×10^7 CFU/ml, lalu masukkan pada tabung ke 3 dan ditambah dengan 9 ml pz, itu setara dengan 3×10^6 CFU/ml.

3) Lakukan pengenceran seperti diatas untuk tabung selanjutnya sampai dengan tabung yang terakhir yaitu tabung ke 6. Sehingga tabung terakhir diperoleh pengenceran 3×10^3 CFU/ml.

4. Prosedur standarisasi ose yang akan dipakai pada penelitian :

- a. Siapkan pipet ukur, filler dan tabung.
- b. Pipet aquadest 0,1 ml dan masukkan kedalam tabung.
- c. Nyalakan api spirtus.
- d. Ambil 1 mata ose air yang didalam tabung, kemudian panaskan ose tersebut di atas api spirtus, lakukan berulang-ulang kali air di dalam tabung habis.
- e. Di dapatkan 10 mata ose air.

$$\frac{0.1 \text{ ml}}{10 \text{ ml ose}} = \frac{1}{100}$$

5. Prosedur pembuatan media NAP (*Nutrien Agar Plate*)

- a. Lakukan perhitungan media NAP.
- b. Membuat media NAP 5 plate, @ plate \pm 20 ml.

Komposisi : NA 20 gr per 1 liter , 20 gr / 1000 x 100 ml = 2 gr.

- c. Siapkan semua alat dan bahan yang akan digunakan.

- d. Timbang media NAP sesuai dengan perhitungan dengan menggunakan timbangan neraca analitik.
 - e. Siapkan aquadest 85 ml dengan menggunakan gelas ukur.
 - f. Masukkan media ke erlenmeyer dan larutkan dengan aquadest.
 - g. Panaskan media pada api spiritus sampai larut semua, tidak sampai mendidih.
 - h. Setelah itu angkat larutan dan dinginkan dengan air mengalir.
 - i. Ukur pH nya sampai, jika terlalu asam, tambahkan NaOH 0,1 N, sedangkan kalau terlalu basa tambahkan HCl 0,1 N sampai pH nya 7,4.
 - j. Tutup erlenmeyer dengan kain kasa dan menyeterilkannya dengan autoclave pada suhu 121°C dalam waktu 15 menit.
 - k. Setelah turun dari autoclave, dituang pada plate yang steril sampai rata.
 - l. Diamkan sampai padat dan simpan pada lemari es.
6. Prosedur pembuatan media MSA (*Manitol Salt Agar*)
- a. Siapkan semua alat dan bahan yang akan digunakan.
 - b. Lakukan perhitungan terhadap media MSA yang dibutuhkan.
MSA 25 plate, @ plate 20 ml.
Komposisi MSA 108 gr per liter.
 - c. Lakukan penimbangan media MSA sesuai dengan perhitungan menggunakan timbangan neraca analitik.
 - d. Siapkan aquadest sebanyak 500 ml dengan gelas ukur.
 - e. Masukkan media pada erlenmeyer dan larutkan dengan aquadest.

- f. Panaskan media pada api spirtus sampai larut semua, jangan sampai mendidih.
 - g. Setelah itu angkat larutan dan dinginkan pada air mengalir.
 - h. Ukur pH nya dengan cara menambahkan NaOH 0.1 N jika terlalu asam dan menambahkan HCl 0.1 N jika terlalu basa sampai pH nya 7.2-7.4.
 - i. Tutup erlenmeyer dengan kain kasa dan menyeterilkannya dengan autoclave pada suhu 121°C dalam waktu 15 menit.
 - j. Setelah turun dari autoclave, dituang pada plate yang steril sampai rata. Masing-masing plate berisi 15 ml, dituangkan pada plate yang steril dekat api spirtus.
 - k. Diamkan sampai padat dan simpan pada lemari es.
7. Prosedur pembuatan perasan daun Majapahit (*Crescentia cujete* Linn)
- a. Pilih dan petik daun majapahit yang masih muda dan segar.
 - b. Cuci daun sampai bersih dan terakhir dicuci dengan aquadest steril.
 - c. Timbang daun majapahit sebanyak 100 gr.
 - d. Haluskan daun majapahit dengan menggunakan mortal atau blender sampai halus. Lalu saring sampai benar-benar jernih.
 - e. Ambil satu mata ose steril perasan daun majapahit, dan tanam pada media NAP dengan cara mengoreskannya pada media.
 - f. Setelah itu diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.
 - g. Amati hasilnya, jika tidak terjadi pertumbuhan kuman berarti perasan daun majapahit tadi sudah benar-benar steril. Oleh karena itu terjadi pertumbuhan, maka dilanjutkan proses tindalisasi:

- 1) Panaskan perasan daun majapahit dengan waterbath dengan suhu 90°C selama 15 menit.
 - 2) Kemudian masukkan pada inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C.
 - 3) Ulangi perlakuan tersebut sampai dengan 3 kali.
 - 4) Menanam kembali perasan daun sukun yang sudah melalui proses tindalisasi di media NAP dan menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37°C.
8. Prosedur pembuatan konsentrasi perasan daun Majapahit (*Crescentia cujete* Linn)
- a. Konsentrasi 100 % : Tabung 1 mengisi 1 ml perasan awal sebagai konsentrasi 100 %.
 - b. Konsentrasi 75 % : Tabung 2 diisi 0,25 ml pz steril, tambahkan perasan daun majapahit dari konsentrasi 100 % sebanyak 0,75 ml, lalu dihomogenkan.
 - c. Konsentasi 50 % : Tabung ke 3 diisi 0,5 ml pz steril, tambahkan perasan daun majapahit dari konsentrasi 100 % sebanyak 0, 5 ml, lalu dihomogenkan.
 - d. Konsentari 25 % : Tabung ke 4 diisi 0,7 ml pz steril , tambahkan perasan daun majapahit dari konsentrasi 100 % sebanyak 0,25 ml, lalu dihomogenkan.
 - e. Konsentrasi 0 % : Tabung ke 5 diisi 1 ml pz steril dan kuman tanpa memberikan perasan daun majapahit.
9. Pemberian suspensi kuman pada masing-masing konsentrasi
- Pada hari pertama yang harus dilakukan :

- a. Siapkan semua alat dan bahan yang akan digunakan.
- b. Beri label pada masing-masing tabung sesuai konsentrasi yaitu 100%, 75%, 50%, 25%, 0% (kontrol).
- c. Nyalakan api spirtus, panaskan ose bulat diatas api spirtus, lalu ambil suspensi kuman *staphylococcus aureus* pada standart Mc Farlan I sebanyak 1 mata ose dan campurkan suspensi pada masing-masing konsentrasi secara acak.
- d. Tutup kembali tabung dengan kain kasa.
- e. Inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.

10. Proses pemberian perlakuan perasan pada media

Pada hari ke dua yang harus dilakukan :

- a. Amati masing-masing tabung apakah terjadi kekeruhan atau tidak.
- b. Mengambil konsentrasi terkecil yang mulai terlihat keruh, dan menguji kembali pada media padat MSA dengan tujuan memastikan apakah kuman tersebut adalah *Staphylococcus aureus*.
- c. Nyalakan api spirtus, panaskan ose diatas api spirtus dan ambil satu mata ose kuman yang ada pada konsentrasi terkecil tadi.
- d. Tanam pada media padat, dengan menggoreskan pada permukaan media.
- e. Inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37 °C.

11. Proses pengamatan

Pada hari ke tiga yang harus dilakuakan :

- a. Amati hasilnya pada media padat apakah terbentuk koloni yang mengidentifikasi kuman *Staphylococcus aureus*.
- b. Hitung jumlah koloni dari konsentrasi terkecil.

- c. Catat hasil yang diamati sebagai data.

3.5.2 Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh di uji dengan uji ANOVA dengan tingkat kesalahan α (0,05).

3.5.3 Tabulasi Data

Data yang ditabulasikan sebagai berikut :

Tabel 3.1 Contoh tabulasi data

No	Replikasi	Jumlah koloni pada perlakuan konsentrasi (CFU)				
		0%	25%	50%	75%	100%
1.	R1					
2.	R2					
3.	R3					
4.	R4					
5.	R5					
Jumlah						
Rata-rata						
SD						