

BAB 3

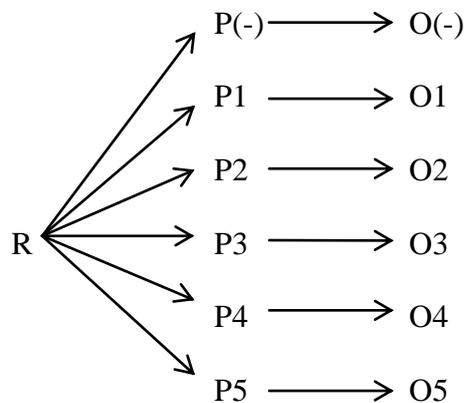
METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah ekperimental, yaitu untuk mengetahui pengaruh rebusan akar rumput teki (*Cyperus rotundus* Linn) terhadap *Staphylococcus aureus*.

3.2 Rancangan Penelitian

Berdasarkan hasil uji pendahuluan yang dilakukan tidak terdapat pertumbuhan pada konsentrasi 100% dan 75%, sedangkan konsentrasi 50%, 25%, 0% tumbuh. Sehingga konsentrasi yang digunakan adalah antara 75% hingga 50%, sedangkan konsentrasi 100% sebagai kontrol negatif dan 0% sebagai kontrol positif.



(Sumber: Zainudin, 2003)

Keterangan :

R : Randomisasi

P(-) : Kontrol (tanpa perlakuan)

P1 : Perlakuan dengan pemberian rebusan konsentrasi 100%

P2 : Perlakuan dengan pemberian rebusan konsentrasi 70%

P3 : Perlakuan dengan pemberian rebusan konsentrasi 65%

P4 : Perlakuan dengan pemberian rebusan konsentrasi 60%

P5 : Perlakuan dengan pemberian rebusan konsentrasi 55%

O(-) : Observasi pertumbuhan kuman *Staphylococcus aureus*

O1 : Observasi pertumbuhan kuman *Staphylococcus aureus* dengan pemberian konsentrasi 100%

O2 : Observasi pertumbuhan kuman *Staphylococcus aureus* dengan pemberian konsentrasi 70%

O3 : Observasi pertumbuhan kuman *Staphylococcus aureus* dengan pemberian konsentrasi 65%

O4 : Observasi pertumbuhan kuman *Staphylococcus aureus* dengan pemberian konsentrasi 60%

O5 : Observasi pertumbuhan kuman *Staphylococcus aureus* dengan pemberian konsentrasi 55%

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah akar rumput teki yang di ambil dari halaman sekitar Kampus Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah rebusan akar rumput teki yang dibuat berbagai konsentrasi. Setiap konsentrasi terdiri dari pengulangan, yang diperoleh dari rumus sebagai berikut. Jumlah pengulangan berdasarkan rumus adalah

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

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

(Sumber: Zainudin, 2003)

Keterangan:

n : Jumlah Pengulangan

r : Jumlah Kelompok (perlakuan)

Jadi, jumlah pengulangan sampel setiap perlakuan adalah 4 kali.

3.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya jalan Sutorejo no. 59 Surabaya.

3.4.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan November 2014 sampai dengan bulan Mei 2015. Sedangkan waktu pemeriksaan dilaksanakan pada bulan Januari 2015.

3.5 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

3.5.1 Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas : Rebusan Akar Rumput Teki (*Cyperus rotundus* Linn)
2. Variabel Terikat : Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*
3. Variabel Kontrol : Suhu Penyimpanan, Waktu Inkubasi, Jumlah Suspensi Kuman, Volume Konsentrasi Rebusan

3.5.2 Definisi Operasional Variabel

1. Rebusan akar rumput teki (*Cyperus rotundus* Linn) adalah 100 gram akar rumput teki dalam 100 ml aquades suhu 90⁰C selama 15 menit yang dikatakan sebagai rebusan pekat (konsentrasi 100%). Untuk kategori selanjutnya dibuat pengenceran dalam berbagai konsentrasi.
2. Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ditetapkan berdasar kekeruhan dari setiap konsentrasi rebusan akar rumput teki (*Cyperus rotundus* Linn) setelah di inkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Lalu kuman di tanam pada media *Manitol Salt Agar* (MSA) dilihat tumbuh tidaknya kuman pada media tersebut
3. Suhu inkubasi adalah 37⁰C, waktu inkubasi 24 jam, jumlah suspensi kuman masing-masing satu mata ose, Volume rebusan disetiap konsentrasi sebanyak 1 ml.

3.6 Metode Pengumpulan Data

Metode pengumpulan data pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada penelitian ini diperoleh dengan cara observasi langsung, yaitu melalui uji laboratorium dengan metode dilusi.

3.7 Teknik Pengumpulan Data

3.7.1 Prinsip Pemeriksaan

Senyawa antibakteri dimasukkan ke dalam salah satu tabung. Ditambahkan suspensi bakteri uji dalam media cair. Perlakuan tersebut akan diinkubasi dan diamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan kekeruhan. Larutan uji senyawa antibakteri akan terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan bakteri uji, ditetapkan sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM) atau *Minimum Inhibition Concentration* (MIC).

3.7.2 Alat dan Bahan yang digunakan

3.7.2.1 Alat-alat

Timbangan, Beaker Glass, Erlrmeyer, Petridish, Corong, Termometer, Api Spirtus, Ose Bulat, Kaki Tiga, Pipet Ukur, Gelas Ukur, Gelas Arloji, Pipet Pasteur, Pushball, Inkubator, Oven, Autoclave.

3.7.2.2 Bahan

Akar Rumput Teki, Suspensi kuman *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

3.7.2.3 Reagen dan Media

Nutrien Agar (NA), *Manitol Salt Agar* (MSA), BaCl₂ 1%, H₂SO₄ 1%, NaOH, HCL, Aquades Steril, PZ Steril

3.7.3 Prosedur Pembuatan Suspensi Kuman

Pembuatan suspensi kuman sesuai dengan metode Mac Farland I, yaitu :

1. Menyiapkan 2 tabung steril, tabung 1 untuk standart Mac Farland dan tabung 2 untuk suspensi kuman
2. Prosedur membuat standart Mac Farland I, yaitu:
 - 1) Membuat campuran BaCl_2 1% dan H_2SO_4 1% dengan perbandingan 1: 90
 - 2) Memipet 0,1 ml BaCl_2 1% di tambahkan 9,9 ml H_2SO_4 1%
 - 3) Menghomogenkan dengan cara kocok pelan tabung standart Mac Farland I. Kekeruhan sama dengan 1ml suspensi mengandung 3×10^8 kuman
3. Prosedur pembuatan suspensi kuman, yaitu:
 - 1) Mengisi tabung steril dengan PZ steril ± 5 ml
 - 2) Mengambil kuman dari biakan *Staphylococcus aureus* murni yang ditanam pada media *Nutrien Agar Slant* (NAS) umur 24 jam
 - 3) Menyelupkan lidi kapas steril yang sudah ada kumannya pada tabung berisi PZ steril
 - 4) Membandingkan kekeruhan suspensi kuman dengan Standart Mac Farland I
 - 5) Apabila suspensi kurang keruh maka tambahkan kuman dengan lidi kapas steril dan apabila terlalu keruh tambahkan PZ steril hingga kekeruhannya sama dengan Standart Mac Farland I.
4. Mensetarakan ose yang akan digunakan untuk penelitian, caranya adalah:

- 1) Menyiapkan pipet ukur 1 ml serta tabung reaksi
- 2) Memipet 0,1 ml aquades masukan kedalam tabung reaksi
- 3) Menyalakan api spiritus
- 4) Mengambi 1 mata ose bulat aquades yang telah dimasukan kedalam tabung reaksi dan memanaskan ose diatas api spiritus. Dilakukan berulang kali hingga aquades dalam tabung tersebut habis
- 5) Didapatkan 45 mata ose aquades steril tersebut habis (perhitungan terlampir)

3.7.4 Prosedur Pembuatan *Nutrien Agar Plate* (NAP)

1. Melakukan perhitungan media *Nutrien Agar* (NA)
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 aquades 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 121⁰C 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 *Manitol Salt Agar* (MSA)

1. Melakukan perhitungan media *Manitol Salt Agar* (MSA)
Membuat MSA 25 plate @ plate ± 15-17ml
Komposisi MSA 108 gram per 1 Liter → $\frac{108\text{gr}}{1000\text{ ml}} \times 425\text{ ml} = 45,9\text{ gr}$
2. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
3. Menimbang media MSA sesuai dengan perhitungan yaitu 45,9 gram
manggunakan timbangan
4. Mengukur volume aquades sebanyak 425 ml menggunakan gelas ukur
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquades 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 7,2-7,4. Jika terlalu asam tambahkan NaOH ,
sedangkan jika terlalu basa tambahkan HCL

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

3.7.6 Prosedur Pembuatan Konsentrasi Rebusan Akar Rumput Teki

1. Mencabut rumput teki dari tanah
2. Mencuci akar rumput teki sampai bersih dan yang terakhir dicuci dengan aquades steril
3. Menimbang akar rumput teki yang telah dicuci dan dikeringkan diudara sebanyak 100 gram.
4. Merebus akar rumput teki yang telah ditimbang dengan 100 ml aquades steril selama 15 menit suhu 90°C
5. Menyaring air rebusan akar rumput teki tersebut dengan kasa steril hingga jernih
6. Mengambil satu mata ose rebusan yang sudah jernih tadi, kemudian menanamnya pada media NAP, dengan cara menggoreskan pada media tersebut
7. Mengamati hasil, jika tidak terjadi pertumbuhan pada media berarti rebusan tersebut benar-benar steril. Namun jika pada media NAP terdapat pertumbuhan kuman berarti perlu dilakukan tindalisasi yaitu
 - 1) Memanaskan rebusan akar rumput teki dalam waterbath pada suhu 90°C selama 15 menit
 - 2) Meletakkan rebusan tadi pada inkubator selama 24 jam suhu 37°C

- 3) Mengulangi perlakuan tersebut selama 3 kali
8. Menanam kembali rebusan akar rumput teki yang sudah mengalami proses tindalisasi di media NAP dan menginkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C
9. Membuat konsentrasi 100%, 70%, 65%, 60%, 55% dan kontrol dengan PZ steril:

Konsentrasi 100% : Tabung 1 diisi 1 ml rebusan akar rumput teki

Konsentrasi 70% : Tabung 2 diisi 0,3 ml PZ steril menambahkan rebusan akar rumput teki sebanyak 0,7 ml rebusan dari konsentrasi 100%, kemudian homogenkan

Konsentrasi 65% : Tabung 3 diisi 0,35 ml PZ steril menambahkan rebusan akar rumput teki sebanyak 0,65 ml rebusan dari konsentrasi 100%, kemudian homogenkan

Konsentrasi 60% : Tabung 4 diisi 0,4 ml PZ steril menambahkan rebusan akar rumput teki sebanyak 0,6 ml rebusan dari konsentrasi 100%, kemudian homogenkan

Konsentrasi 55% : Tabung 5 diisi 0,45 ml PZ steril menambahkan rebusan akar rumput teki sebanyak 0,55 ml rebusan dari konsentrasi 100%, kemudian homogenkan

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

(Sumber: Marlila, 2012)

3.7.7 Prosedur pemeriksaan

a. Hari pertama

1. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan

2. Menyalakan api spiritus dengan korek api
3. Member label pada tiap tabung dari konsentrasi 100%, 70%, 65%, 60%, 55% dan kontrol
4. Memanaskan ose diatas nyala api spiritus hingga membara, dan mendinginkanya di udara
5. Mengambil suspensi kuman *Staphylococcus aureus* sebanyak 1 mata ose masukan kedalam tabung yang berisi rebusan konsentrasi 70% menggesekan ose pada dinding permukaan media cair sebanyak 3-5 kali
6. Melewatkan mulut tabung pada nyala api dan menutup tabung dengan kapas berlemak
7. Melakukan prosedur diatas pada semua konsentrasi
8. Menginkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

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 *Manitol Salt Agar* (MSA) dengan tujuan memastikan apakah kuman yang tersebut adalah *Staphylococcus aureus*
3. Memanaskan ose bulat di atas nyala api spirtus, mengambil 1 mata ose kuman yang ada pada konsentrasi terkecil rebusan rumput teki
4. Menanam pada media MSA dengan menggoreskan di permukaan media
5. Menginkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam

c. Hari ketiga

1. Mengamati hasil pada media padat apakah terbentuk koloni yang mengidentifikasika kuman tersebut adalah *Staphylococcus aureus*
2. Mencatat konsentrasi terkecil sebagai sumber sebagai daya hambat kuman
3. Hasil yang diamati sebagai data

3.7.8 Tabulasi data

Data yang diperoleh dari penelitian diatas lalu ditabulasikan sebagai berikut:

Tabel 3.1 Tabel Hasil Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada rebusan akar rumput teki (*Cyperus rotundus* Linn)

No.	Kode Sampel	KonsentrasiRebusan Akar Rumput Teki					
		100%	70%	65%	60%	55%	0%
1	A1						
2	A2						
3	A3						
4	A4						

Interpretasi Hasil:

Positif ,(+) : Terjadi pertumbuhan kuman *Staphylococcus aureus*

Negatif,(-) : Tidak terjadi pertumbuhan kuman *Staphylococcus aureus*

3.8 Metode Analisis Data

Data yang diperoleh diuji menggunakan *Anova* dengan tingkat kesalahan 5% (0,05).