

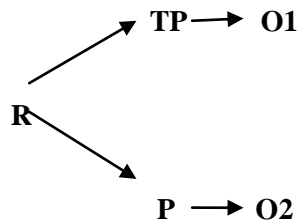
## BAB 3

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh getah pelepah pisang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *staphylococcus aureus*. Dengan rancangan penelitian sebagai berikut :

#### 3.2 Rancangan Penelitian



Gambar 3.1 Rancangan Penelitian

#### Keterangan :

R : Random

TP : Tanpa pemberian getah Pelepah pisang.

P : Dengan pemberian getah pelepah pisang.

O1 :Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* tanpa pemberian getah Pelepah pisang.

O2 :Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan pemberian getah Pelepah pisang.

#### 3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

##### 3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi yang diambil dalam penelitian ini kuman *Staphylococcus aureus* yang diambil *Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK)* Surabaya..

### 3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah media biakan *Staphylococcus Aureus*. Terdapat 2 perlakuan sehingga setiap kelompok terdiri dari 16 (ulangan), yang diperoleh dari rumus sebagai berikut :

Jumlah sampel berdasarkan rumus adalah :

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

$$n \leq 16$$

$$n \sim 16$$

Keterangan:

n = jumlah sampel

k = kelompok (perlakuan)

(Hidayat, 2010).

Jadi, jumlah pengulangan sampel sebanyak 16 kali.

## 3.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

### 3.4.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dan pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

### 3.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai dengan bulan Juli 2014, sedangkan waktu pemeriksaan laboratorium dilaksanakan pada bulan Mei 2014.

### 3.5 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

#### 3.5.1 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Pemberian getah pelepah pisang.
2. Variabel terikat : Pertumbuhan bakteri *Staphillococcus aureus*.
3. Variabel kontrol : Waktu inkubasi, jenis getah pelepah pisang, suhu inkubasi, volume getah pelepah pisang.

#### 3.5.2 Definisi Operasional

1. Pemberian getah pelepah pisang adalah pemberian getah pada media biakan *Staphylococcus aureus* yang dikategorikan menjadi pemberian getah pelepah pisang dan tanpa pemberian getah pelepah pisang.
2. Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* adalah *Staphylococcus aureus* yang tumbuh pada media yang diberi dan tanpa pemberian getah pelepah pisang dengan melihat kekeruhan pada masing – masing tabung, dikategorikan :
  - ( + ) Terjadi pertumbuhan
  - ( - ) Tidak terjadi pertumbuhan
3. Inkubasi dilakukan selama 24 jam, suhu inkubasi adalah 37°C, jenis pisang yang di gunakan adalah pisang manis Maumere.

### 3.6 Metode Pemeriksaan

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

### 3.6.1 Prinsip Pemeriksaan

Senyawa antibakteri di masukkan kedalam salah satu tabung. ditambahkan suspensi bakteri uji dalam media cair. Perlakuan tersebut akan diinkubasi dan diamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan terjadinya kekeruhan. Larutan uji senyawa antibakteri akan terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan bakteri uji, ditetapkan sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM) atau MIC (*Minimum inhibition concentration*) (Pratiwi, 2008).

### 3.6.2 Alat Pemeriksaan

Alat yang digunakan dalam pemeriksaan ini adalah sebagai berikut : Timbangan, gelas arloji, tabung reaksi, gelas ukur, pengaduk, rak tabung, pipet pasteur, api spirtus, kaki tiga, blender, filler, erlenmeyer, ose, Autoclave, plate, pipet ukur dan tabung sentrifuge

### 3.6.3 Bahan Pemeriksaan

Bahan yang digunakan dalam pemeriksaan ini adalah sebagai berikut : Getah pelepah pisang, suspensi kuman *Staphylococcus aureus*, aquades steril, media nutrient agar slant (NAS), media manitol salt agar (MSA) dan pz steril.

### 3.6.4 Reagen Pemeriksaan

Reagen yang digunakan dalam pemeriksaan ini adalah sebagai berikut : NaOH 0.1 N dan HCl 0.1 N

### 3.6.5 Prosedur

**A. Pembuatan Suspensi Kuman *Staphylococcus aureus* dengan metode Mc. Farland 0,5 :**

1. Menyiapkan 2 tabung steril, 1 untuk suspensi kuman dan yang 1 untuk standart Mc. Farland 0,5.
2. Prosedur pembuatan standart Mc. Farland 0,5; yaitu:
  - a. Membuat perbandingan antara  $\text{BaCl}_2$  1% :  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1% .
  - b. Memipet 0,05 ml  $\text{BaCl}_2$  1% + 9,95 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1%.
  - c. Menghomogenkan dengan cara mengkokok pelan tabung.
  - d. Standart Mc. Farland 1 ini kekeruhannya sama dengan setiap 1 ml suspensi kuman mengandung 150 juta kuman (Soemarno, 2000).
3. Prosedur membuat suspensi kuman, yaitu:
  - a. Mengisi tabung steril dengan PZ  $\pm$  5 ml
  - b. Mengambil kuman dari biakan *Staphylococcus aureus* murni yang sudah ditanam di media NAS umur 24 jam dengan lidi kapas steril.
  - c. Menyelupkan lidi kapas steril yang sudah ada kumannya pada tabung yang berisi PZ.
  - d. Membandingkan kekeruhan suspensi kuman dengan Mc.Farland 0,5.
  - e. Apabila suspensi kurang keruh, maka tambahan kuman menggunakan lidi kapas steril dan apabila terlalu keruh tambahkan PZ hingga kekeruhannya sama dengan standart Mc. Farland 0,5.
4. Menstandartkan ose yang akan dipakai dalam penelitian (Tera Ose) :
  1. Menyiapkan pipet 0.1 ml, filler dan tabung.
  2. Memipet aquadest 0.1 ml, kemudian menuanginya kedalam tabung.
  3. Menyalakan api spirtus.

4. Mengambil 1 mata ose air yang sudah dituang kedalam tabung, kemudian memanaskan ose tersebut di atas api spirtus, lakukan berulang- ulang sampai air di dalam tabung habis.
5. Didapatkan 15 mata ose air tersebut habis.

$$= \frac{150.000.000}{150}$$

= 1.000.000 kuman (bila suspensi kuman per mililiternya 150 juta kuman).

**Jumlah kuman setiap 1 mata ose :**

$$= \frac{1.000.000}{150}$$

= 6.666 kuman (bila suspensi kuman per mililiternya 1 juta kuman)

## **B. Prosedur Pembuatan Media Nutrient Agar Slant (NAS)**

Prosedur pembuatan media Nutrient Agar Slant (NAS) adalah sebagai berikut :

1. Melakukan perhitungan media NA (Nutrient Agar).
2. Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan.
3. Menimbang bahan (media NA) sesuai dengan perhitungan menggunakan timbangan.
4. Memasukkan sampel NA ke beaker glass kemudian di tambahkan dengan aquadest 30ml.
5. Melarutkan sampel dengan cara di panaskan sampai larut sempurna.
6. Mengangkat larutan yang sudah dipanaskan dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam – suam kuku.

7. 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.
8. Menutup erlenmeyer dengan kapas berlemak dan menyeterilkannya dengan autoclave pada suhu 121 atm selama 15 menit.
9. Setelah turun dari auto clave, menuangkannya ke dalam tabung yang steril kemudian memiringkan tabung.
10. Mendinginkannya sampai terlihat padat dan menyimpannya ke almari es (Sumber : Sumarsono, 1996).

### C. Prosedur Pembuatan Media Manitol Salt Agar (MSA)

1. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
2. Melakukan perhitungan terhadap jumlah bahan/media MSA yang dibutuhkan:  
Membuat MSA (15 plate, @ ± 17 ml  $\longrightarrow$  225 ml)  
Komposisi MSA 108 gr per 1 liter  $\longrightarrow$   $\frac{108 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}} \times 225 \text{ ml} = 27,54 \text{ gr}$
3. Melakukan penimbangan bahan sesuai dengan yang diperlukan yaitu 27,54 gr menggunakan timbangan.
4. Mengukur volume aquadest yang dibutuhkan yaitu sebanyak 225 ml menggunakan gelas ukur.
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang tadi dengan aquadest yang sudah diukur volumenya ke dalam erlenmeyer.
6. Memanaskannya diatas api spiritus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih.
7. Mengangkat larutan yang sudah larut sempurna dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan di baskom sampai suam-suam kuku.

8. Mengukur pH yaitu 7.2-7.4 , jika pH terlalu asam tambahkan NaOH 0.1 N jika terlalu basa tambahkan HCL 0.1 N sampai pH yang telah ditentukan.
9. Menutup larutan yang ada di erlenmeyer dengan kapas berlemak dan bungkus dengan koran serta mengikatnya dengan benang wol.
10. Melakukan sterilisasi di autoclave pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit bersama dengan plate yang dibutuhkan serta alat-alat yang perlu disteril.
11. Setelah turun dari autoclave, menuangkannya ke dalam plate yang steril sampai rata  $\pm$  17 ml secara steril dan dekat dengan api.
12. Mendinginkannya sampai terlihat padat dan menyimpannya ke lemari es  
(Sumber : Gustiani, 2013).

#### **D. Prosedur pengambilan getah pelepah pisang**

Prosedur pengambilan getah pelepah pisang adalah sebagai berikut :

1. Menyiapkan alat dan bahan
2. Memotong batang pelepah pisang dan pisahkan dengan daunnya, potongan batang pelepah  $\pm$  5cm
4. Kemudian peras batang pelepah teteskan pada beaker glass steril sampai volume yang diinginkan (Sumber : Anonim, 1996).

#### **F. Prosedur Pemeriksaan Sampel**

##### **a. Hari pertama :**

1. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
2. Menyalakan api spirtus dengan korek api.
3. Memberi label pada tabung yang berlabel 1(diberi) dan 2 (tanpa diberi)
4. Padatabung 1 isi dengan 1ml getah dan tabung 2 isi dengan 1ml aquadest steril



5. Memanaskan ose bulat diatas nyala api spirtus, mengambil suspensi kuman *Staphylococcus aureus* sebanyak 1 mata ose dan membiakkannya di tabung berlabel 1 dan 2 dengan cara menggesekkan ose didinding permukaan media cair sebanyak  $\pm 5$  kali.
6. Semua perlakuan dilakukan secara steril dekat dengan api.
7. Menutup kembali tabung dengan kapas berlemak.
8. Menginkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam.

**b. Hari Kedua :**

1. Mengamati masing-masing tabung, apakah terjadi kekeruhan atau tidak.
2. Karena kekeruhan sulit dilihat secara visual maka menguji kembali ke media padat (MSA) dengan tujuan memastikan apakah kuman tersebut adalah *Staphylococcus aureus*.
3. Memanaskan ose bulat di atas nyala api spirtus, mengambil 1 mata ose kuman yang ada pada tabung perasan daun kemangi tadi.
4. Menanamnya di media MSA dengan menggoreskannya di permukaan media.
5. Inkubasi kembali pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam (Sumber : Gustiani, 2013).

**c. Hari Ketiga :**

1. Mengamati hasilnya pada media MSA apakah terbentuk koloni yang mengidentifikasi kuman tersebut adalah *Staphylococcus aureus*.
2. Mencatat hasil yang di amati sebagai data (Sumber : Gustiani, 2013).

**3.6.6 Tabulasi Data**

Data yang diperoleh ditabulasikan sebagai berikut :

Tabel 3.1. Contoh tabulasi data

No	Kode Sampel	Pertumbuhan Bakteri	
		Dengan Pemberian	Tanpa Pemberian
1	A1		
2	A2		
3	A3		
4	A4		
5	A5		
6	A6		
7	A7		
8	A8		
16	A16		

Dengan keterangan :

Positif (+) : Terjadi pertumbuhan kuman *Staphillococcus aureus*.

Negatif (-) : Tidak terjadi pertumbuhan kuman *Staphillococcus aureus*.

### 3.7 Metode Analisis Data

Data yang diperoleh diuji menggunakan uji chi – square dengan tingkat kesalahan 5% (0,05).