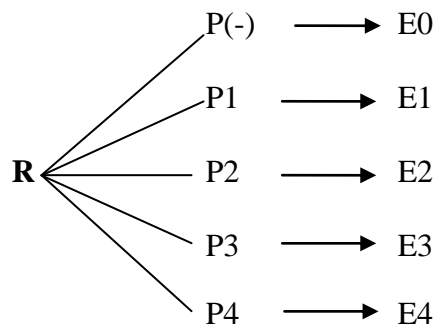


BAB 3
METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan rancangan penelitian eksperimental dengan tujuan untuk mengetahui pada konsentrasi berapa getah tanaman jarak pagar dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Dengan rancangan penelitian sebagai berikut:



Gambar 3.1 : Rancangan Penelitian

Keterangan :

R : Random

P0 : Tanpa pemberian getah tanaman jarak pagar (K. positif tetrasiklin)

P1 : Dengan pemberian getah tanaman jarak pagar konsentrasi 25%

P2 : Dengan pemberian getah tanaman jarak pagar konsentrasi 50%

P3 : Dengan pemberian getah tanaman jarak pagar konsentrasi 75%

P4 : Dengan pemberian getah tanaman jarak pagar konsentrasi 100%

- E(-) : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* tanpa pemberian getah tanaman jarak pagar (kontrol positif tetrasiklin)
- E1 : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan pemberian getah tanaman jarak pagar konsentrasi 100%
- E2 : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan pemberian getah tanaman jarak pagar konsentrasi 75%
- E3 : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan pemberian getah tanaman jarak pagar konsentrasi 50%
- E4 : Observasi pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan pemberian getah tanaman jarak pagar konsentrasi 25%

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi

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

3.2.2 Sampel

Sampel yang diambil dalam penelitian ini adalah kuman *Staphylococcus aureus*. Terdapat 5 perlakuan sehingga setiap kelompok terdiri dari 5 sampel (ulangan), yang diperoleh dari rumus sebagai berikut:

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

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

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

$$4r - 4 \leq 15$$

$$4r \leq 19$$

$$r \leq 19/4$$

$$r \leq 4,75$$

$$r \leq 5$$

Jadi, jumlah pengulangan sampel sebanyak 5 kali

Keterangan :

t : Banyaknya kelompok perlakuan

r : Jumlah replikasi

(Supranto, 2000)

3.3 Lokasi dan Waktu penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Januari sampai Juli 2014, sedangkan waktu pemeriksaan dilakukan pada bulan Mei 2014.

3.4 Variabel dan Devinisi Operasional Variabel

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas : Konsentrasi getah tanaman jarak pagar

Variabel terikat : Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

Variabel kontrol : Sterilisasi alat, bahan dan media pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, suhu inkubasi, waktu inkubasi, waktu pengamatan, konsentrasi sampel, dan metode pemeriksaan.

3.4.2 Devinisi Operasional Variabel

1. Konsentrasi getah tanaman jarak dikategorikan menjadi berbagai macam konsentrasi, yaitu: 100%, 75%, 50%, 25%, dan 0% (kontrol positif dengan antibiotik tetrasiklin).
2. Data pertumbuhan kuman *Staphylococcus aureus* dalam penelitian ini berupa angka yang menunjukkan lebar zona hambat pada media MHA tempat tumbuhnya *Staphylococcus aureus*.
3. Metode pemeriksaan dalam penelitian ini adalah *Disk Diffusion Test* yaitu Tes difusi Agar, caranya dengan melihat lebar zona hambat pada media MHA dan membandingkannya dengan kontrol positif.

3.5 Metode 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 *Disk Diffusion Test*. Langkah – Langkah pemeriksian diantaranya sebagai berikut :

3.5.1 Prinsip Pemeriksaan

Pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) ditanami kuman biakan murni dari *Staphylococcus aureus* setelah melalui proses perhitungan Mc Farland 1, selanjutnya media tersebut akan diberi perlakuan, yaitu getah jarak pagar yang sudah di encerkan dengan air hangat (aquades steril) dalam tabung reaksi yang sudah dibuat dengan berbagai macam konsentrasi kemudian di masukkan paper

disk kosong agar bahan yang mengandung senyawa antimikroba tersebut terserap kedalamnya, Paper disk yang sudah mengandung senyawa antibiotik di tempelkan di atas permukaan media, kemudian dilihat apakah sudah terbentuk zona hambat yang menunjukkan kepekaan dari antibiotik yang selanjutnya dibandingkan dengan kontrol positif (Tetrasiklin).

3.5.2 Alat – alat

Neraca analitik, tabung Reaksi, gelas ukur, batang pengaduk, rak tabung, pipet pasteur, api spirtus, kaki tiga, kasa, tabung centrifuge, filler, erlenmeyer, ose bulat, pinset steril, autoclave, plate, pipet ukur, Disk blanko kosong, kertas pH, lidi kapas steril, penggaris atau jangka, gelas arloji.

3.5.3 Bahan Pemeriksaan

Getah tanaman Jarak Pagar, suspensi kuman *Staphylococcus aureus*, media *Mueller Hinton Agar* (MHA), aquades steril, Pz steril, media *Nutrient Agar Slant* (NAS).

3.5.4 Reagen Pemeriksaan

NaOH 0.1 N, HCL 0.1 N, H₂SO₄ 1%, BaCl 1%.

3.5.5 Prosedur pemeriksaan

A. Pembuatan suspensi kuman *Staphylococcus aureus*

Pembuatan suspensi kuman sesuai dengan metode Mc Farland I sebagai berikut:

1. Menyiapkan 2 tabung steril, 1 untuk suspensi kuman dan yang 1 lagi untuk standart Mc Farland I.
2. Prosedur membuat standart Mc Farland I, yaitu:
 - a. Membuat perbandingan antara BaCl 1% : H₂SO₄ 1 % sebesar 1 : 9.

- b. Memipet 0,1 ml BaCl 1 % + 0,9 ml H₂SO₄ 1 %.
- c. Menghomogenkan dengan cara mengocok tabung secara perlahan.

Standart Mc Farland I ini sama dengan tiap 1 ml nya mengandung 300 juta kuman.

3. Prosedur membuat suspensi kuman, yaitu:

- a. Mengisi tabung steril dengan pz ± 5 ml.
- b. Mengambil kuman dari biakan *Staphylococcus aureus* murni yang sudah ditanam di media NAS 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 I.
- e. Apabila suspensi kuman kurang keruh, maka tambahkan kuman dengan lidi kapas steril dan apabila terlalu keruh, maka tambahkan pz steril hingga kekeruhannya sama dengan standart Mc Farland I.

4. Menstandartkan ose yang akan dipakai dalam pemeriksaan :

- a) Menyiapkan pipet 0.1 ml dan filler serta tabung.
- b) Memipet aquadest 0.1 ml, kemudian menuanginya kedalam tabung.
- c) Menyalakan api spirtus.
- d) Mengambil 1 mata ose air yang sudah dituang kedalam tabung dan kemudian memanaskan ose tersebut diatas api spirtus, lakukan berulang - ulang sampai air dalam tabung habis.
- e) Misal didapatkan 30 mata ose air tersebut habis

$$0.1 \text{ ml} = 0.003$$

1 mata ose = 1 juta kuman (bila suspensi kuman per mililiter 300 juta kuman).

B. Prosedur Pembuatan media *Nutrient Agar Slant* (NAS)

1. Melakukan perhitungan media *Nutrient Agar Slant* (NAS)

Membuat NAS 3 tabung, @ tabung ± 6 ml.

Komposisi NA 20 gr per 1 liter → $20 \text{ gr} / 1000 \times 18 \text{ ml} = 0,36 \sim 1 \text{ gr}$.

2. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
3. Menimbang bahan (media NA) sesuai dengan perhitungan menggunakan timbangan neraca analitik.
4. Mengukur volume aquadest 18 ml menggunakan gelas ukur sesuai dengan yang dibutuhkan.
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest yang sudah diukur volumenya dalam beaker glass.
6. Memanaskan larutan diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih.
7. Mengangkat larutan yang sudah larut sempurna dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam - suam kuku.
8. Mengukur pH larutan, 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 mensterilkannya pada autoclave dengan suhu 121 atm selama 15 menit.

10. Setelah turun dari autoclave, menuangkannya ke dalam tabung yang steril ± 6 ml kemudian miringkan tabung.
11. Mendinginkannya sampai terlihat padat dan menyimpannya pada almari es.

C. Prosedur pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

1. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
2. Melakukan perhitungan terhadap jumlah bahan atau media MHA yang dibutuhkan.

Membuat MHA 6 tabung, @ tabung ± 17 ml.

Komposisi MHA 34 gr per 1 liter $\rightarrow 34 \text{ gr} / 1000 \times 102 \text{ ml} = 3,468$ gr.

3. Melakukan penimbangan bahan sesuai dengan yang diperlukan menggunakan timbangan triple beam.
4. Mengukur volume aquadest yang di butuhkan yaitu sebanyak 102 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 larutan yang sudah larut sempurna dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam - suam kuku.
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 ± 0.2 .

9. Menutup larutan yang ada di erlenmeyer dengan kapas berlemak dan koran serta mengikatnya.
10. Mensterilisasi larutan tersebut bersama dengan plate yang dibutuhkan pada autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit.
11. Setelah turun dari Autoclave, menuangkannya ke dalam plate yang steril sampai rata \pm 17 ml.
12. Mendinginkannya sampai terlihat padat dan menyimpannya pada almari es.

D. Prosedur Pembuatan Konsentrasi Getah Jarak Pagar

Prosedure pembuatan konsentrasi getah Jarak Pagar yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengambil getah Jarak Pagar sebanyak \pm 5 ml.
2. Usahakan pada saat proses pengambilan getah jarak pagar dalam keadaan steril.
3. Siapkan tabung reaksi yang sudah di steril sebanyak 4 buah.
4. Membuat konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100%, yaitu :
Konsentrasi 100% : 1 ml getah jarak pagar.
Konsentrasi 75% : 0,75 ml getah jarak pagar + 0,25 ml air hangat.
Konsentrasi 50% : 0,50 ml getah jarak pagar + 0,50 ml air hangat.
Konsentrasi 25% : 0,25 ml getah jarak pagar + 0,75 ml air hangat.

E. Prosedur Pemeriksaan *Staphylococcus aureus*

Hari pertama pemeriksaan :

1. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
2. Kemudian menyalakan api spirtus dengan korek api.

3. Memanaskan ose bulat diatas nyala api spirtus.
4. Mengambil suspensi kuman murni *Staphylococcus aureus* sebanyak 1 mata ose dan membiakkannya pada media *Nutrient Agar Slant* (NAS).
5. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Hari kedua :

1. Mengamati biakan kuman yang ditanam pada media *Nutrient Agar Slant* (NAS).
2. Ambil 1 koloni kuman dengan lidi kapas steril dari media NAS.
3. Lanjutkan pada pembuatan suspensi kuman dengan metode Mc Farland 1.
4. Membuat konsentrasi bahan (getah jarak pagar + air hangat) sesuai dengan konsentrasi dan prosedur pembuatan konsentrasi getah jarak di atas.
5. Pada media MHA dilakukan penanaman kuman *Staphylococcus aureus* yang sudah di standart Mc Farland 1 (menggunakan lidi kapas steril).
6. Ambil pinset steril dan disk blanko kosong (kertas whatman WH 40 dengan diameter 1 cm dan yang mempunyai ketebalan 0,5 mm mempunyai pori-pori rapat 0,05 mikropore (SNI 02-3769-1995), kemudian ratakan disk blanko kosong dengan bahan yang mengandung antibiotik dengan cara mencelupkan disk blanko kosong tersebut \pm 5 menit.
7. Tempelkan disk blanko kosong yang sudah mengandung senyawa antibiotik pada plate yang telah berisi media MHA dan kuman, Tangguhkan 3 – 5 menit.

8. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Hari Ketiga :

1. Mengamati hasilnya pada media padat apakah terbentuk zona hambat yang mengidentifikasi bahwa antibiotik tersebut peka terhadap *Staphylococcus aureus* dan bandingkan dengan kontrol positif.
2. Mengukur diameter zona hambat dengan penggaris atau jangka.
3. Mencatat hasil diameter zona hambat yang diamati sebagai data.

3.5.6 Tabulasi Data

Data yang diperoleh ditabulasikan sebagai berikut :

Tabel 3.1. Contoh tabulasi data

Sampel Uji	Konsentrasi Getah Jarak Pagar				Kontrol Positif
	Konsentrasi 25%	Konsentrasi 50%	Konsentrasi 75%	Konsentrasi 100%	
Uji 1					
Uji 2					
Uji 3					
Uji 4					
Uji 5					
Rata-rata (mm)					

Dengan keterangan :

Kontrol (+) : Tetrasiklin.

3.6 Metode Analisis Data

Setelah diperoleh data dalam bentuk tabel, data kemudian dianalisis dengan menggunakan uji Anova dengan tingkat kesalahan 5% (0,05).