

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 uJenis Dan Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian deskriptif dengan tujuan untuk mengetahui Gambaran bakteri *Staphylococcus aureus* pada rongga mulut Mahasiswa perokok aktif di Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.2 Populasi Dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi

Populasi dari penelitian ini adalah seluruh Mahasiswa perokok aktif di Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah 20 mahasiswa perokok aktif di lingkungan Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Surabaya yang memenuhi kriteria penelitian. Sedangkan Sampel pemeriksaan ini adalah swab rongga mulut mahasiswa perokok aktif di Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya

3.2.3 Teknik Sampling

Teknik sampling yang digunakan dalam penelitian ini adalah *purposive* sampling. *Purposive* sampling adalah teknik pengambilan sampel yang dilakukan berdasarkan kriteria tertentu agar sampel yang di pilih sesuai dengan tujuan penelitian. Teknik *purposive sampling* dipilih dalam penelitian ini karena yang dipilih hanya yang memenuhi kriteria inklusi, sehingga mendapatkan data yang

representatif. Beberapa kriteria inklusi dan eksklusi dalam penelitian sebagai berikut:

a. Kriteria Inklusi

- 1) Mahasiswa perokok aktif di Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.
- 2) Berumur 19 – 20 tahun
- 3) Perokok aktif yang mengomsumsi 10 – 15 batang perhari
- 4) Dalam kondisi sehat dan tidak mengalami infeksi akut pada rongga mulut saat pengambilan sampel.
- 5) Bersedia menjadi responden dengan menandatangani formulir informed consent, dan mengisi kuisioner.
- 6) Seluruh partisipasi bersifat sukarela dan tidak mempengaruhi status pekerja responden.

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Sedang mengalami infeksi atau peradangan pada rongga mulut, seperti stomatitis, abses, atau kandidiasis oral pada saat pengambilan sampel.
- 2) Perokok kurang dari 10 – 15 batang perhari
- 3) Tidak bersedia memberikan sampel atau dilakukan pemeriksaan.

3.3 Lokasi Dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Pengambilan data dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan desember 2025 sampai bulan Juli 2026 dan waktu pemeriksaan dilakukan bulan Juni 2026.

3.4 Variabel Penelitian Dan Definisi Operasional Variabel

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada rongga mulut Mahasiswa perokok aktif di Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* didefinisikan sebagai ditemukannya koloni bakteri pada hasil pemeriksaan swab rongga mulut perokok aktif. Penilaian dilakukan melalui identifikasi laboratorium yang meliputi pengamatan morfologi koloni pada media kultur *Blood Agar Plate* (BAP), *Mannitol Salt Agar* (MSA), dan *Nutrient Agar* (NA), hasil pewarnaan Gram, serta uji biokimia berupa katalase dan koagulase. Kriteria hasil ditetapkan sebagai berikut:

Dikatakan positif (+): Apabila ditemukan koloni berwarna putih hingga kuning keemasan dengan hemolisis β pada BAP, mampu memfermentasi manitol pada MSA (perubahan warna menjadi kuning), pada media NA terbentuk pigmen kuning keemasan khas, serta menunjukkan hasil katalase dan koagulase positif. Sedangkan pada pengamatan mikroskopis terlihat sebagai kokus Gram positif berkelompok.

Dikatakan negatif (-) : Apabila tidak ditemukan karakteristik tersebut atau hasil identifikasi tidak sesuai dengan ciri *Staphylococcus aureus* (Zami and Shofi, 2024).

3.5 Teknik Pengumpulan Data.

3.5.1 Instrumen Penelitian

Jenis data dalam penelitian ini adalah data primer yang diperoleh data primer berupa pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang diperoleh pemeriksaan laboratorium dengan langkah sebagai berikut:

3.5.2 Prinsip

Pemeriksaan swab rongga mulut pada perokok aktif dengan metode isolasi dan identifikasi bakteri secara kultur, mikroskopis, dan biokimia. Sampel swab rongga mulut diambil secara aseptik, kemudian diinokulasikan ke dalam media selektif dan diferensial seperti BAP untuk melihat pola hemolisis, MSA untuk seleksi dan uji fermentasi manitol, serta NA untuk melihat pigmentasi. Media kemudian diinkubasi pada suhu 35–37°C selama 18 - 24 jam untuk memungkinkan pertumbuhan koloni bakteri (CLSI 2022).

3.5.3 Alat Dan Bahan Pemeriksaan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi neraca analitik, gelas arloji, beaker glass, erlenmeyer, cawan petri, batang pengaduk, kaki 3, mikroskop, ose bulat, bunsen, cotton swab steril, pot steril, pipet tetes, kertas pH, inkubator.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi swab rongga mulut, media diferensial BAP (*Blood Agar Plate*), media MSA (*Manitol Salt Agar*), NAS (*Nutrient Agar Slant*), Hidrogen peroksida (H₂O₂) 3%, Plasma *citrate*, pewarnaan gram.

3.5.4 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini sesuai dengan prosedur dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Surabaya.

Pra Analitik

1. Pengambilan Sampel

- a. Pasien diberi penjelasan mengenai tindakan yang akan dilakukan.
- b. Mengambil bahan uji menggunakan cotton swab steril pada bagian rongga mulut dengan cara memutar.

(Nanggita *et al.*, 2023).

2. Pembuatan Media BAP, MSA, NAS

- a. Menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan
- b. Menimbang media BAP sebanyak 20 gram, MSA 49,68 gram dan NAS 2,8 gram dengan menggunakan neraca analitik

Perhitungan Media:

$$20 \times 25 = 500 \text{ ml (aquadest)}$$

$$\frac{40}{1000} \times 500 \text{ ml} = 20 \text{ gram (media BAP)}$$

$$20 \times 23 = 460 \text{ ml (aquadest)}$$

$$\frac{108}{1000} \times 460 = 49,68 \text{ gram (media MSA)}$$

$$5 \times 20 = 100 \text{ ml (aquadest)}$$

$$\frac{28}{1000} \times 100 \text{ ml} = 2,8 \text{ gram (media NAS)}$$

- c. Memasukkan media BAP, MSA dan NAS ke masing – masing Erlenmeyer lalu tambahkan aquadest sebanyak 500 ml media BAP, 460 ml media MSA dan 100 ml media NAS.

- d. Menghomogenkan larutan dengan mengaduk sambil memanaskan diatas api spiritus sampai benar – benar larut dan mendidih. Jika sudah mendidih diangkat dan suam – suam dengan air kran
- e. Menyesuaikan pH dengan menggunakan pH meter. Jika kurang basa ditambahkan NaOH 0.1 % dan jika kurang asam ditambahkan HCL 0,1%.
- f. Menutup Erlenmeyer dengan bulatan kasa dan kapas, bungkus dengan koran bagian atasnya untuk disterilkan pada autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit.
- g. Mencampurkan darah sebanyak 40 ml kedalam Erlenmeyer yang berisi media BAP secara *aseptic* dengan ketentuan media sudah tidak terlalu panas.

Perhitungan pengambilan darah:

$$\frac{8}{100} \times 500 \text{ ml} = 40 \text{ ml}$$

- h. Menuangkan media dari Erlenmeyer ke cawan petri menggunakan teknik *aseptic*.
- i. Meratakan perlahan media dengan cara memutar cawan petri searah angka delapan dan tunggu sampai memadat. Dan disimpan di dalam kulkas.

Analitik

1. Hari ke I
 - a. Menyiapkan sampel dan media *Blood Agar Plate* (BAP)
 - b. Menginokulasi swab rongga mulut yang sudah dilakukan pada media BAP secara *aseptic* pada permukaan media BAP
 - c. Menginkubasi media selama 1x24 jam pada suhu 37°C.

(Zami and Shofi, 2024).

2. Hari ke II

a. Pengamatan Makroskopis pada Media *Blood Agar*.

Koloni *Staphylococcus aureus* berwarna putih kekuningan, berbentuk bulat kecil sampai sedang, cembung, pada daerah disekitar koloni terlihat zona beta hemolisa (zona jernih).

b. Pewarnaan Gram

- a. Menyiapkan objek glaas yang bersih dan bebas lemak.
- b. Mengambil koloni dari media *Blood Agar Plate* menggunakan ose bulat steril.
- c. Membuat hapusan diatas objek glass.
- d. Mengeringkan, mengfiksasi lalu beri label.
- e. Meletakkan preparat pada jembatan pewarnaan, lalu menggenangi dengan zat warna cristal violet selama 2 menit.
- f. Membilas dengan air mengalir, lalu menggenangi dengan lugol selama 1 menit.
- g. Membilas dengan air mengalir, lalu menggenangi dengan alkohol selama 15 – 30 detik.
- h. Membilas dengan air mengalir, lalu menggenangi dengan safranin selama 1 menit.
- i. Membilas dengan air mengalir, lalu mengeringkan dengan tisu.
- j. Melihat sediaan yang telah diwarnai dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000x.

Interprestasi hasil :

- Bakteri Gram positif berwarna ungu.

- Bakteri Gram negatif berwarna merah.

k. Penanaman pada Media MSA dan NAS

- Mengambil koloni yang memungkinkan dari media *Blood Agar* menggunakan ose bulat steril (melakukan penanaman dengan metode T atau Y) pada media MSA.

- Mengambil kuman yang sama untuk ditanam pada media NAS.

- Menginkubasi didalam inkubator pada suhu 37°C selama 1x24 jam didalam inkubator.

1. Hari ke III

Pengamatan Makroskopis pada Media MSA

- Hasil positif : pada media MSA terjadi perubahan warna merah menjadi kuning.
- Hasil negatif : pada media MSA tidak terjadi perubahan warna pada media.

Pengamatan Makroskopis pada Media NAS

- Hasil positif : pada media NAS terdapat pigmen kuning emas.
- Hasil negatif : pada media NAS tidak terdapat pigmen kuning emas.

Tes Katalase

- Menyiapkan reagen H_2O_2 3%
- Menyiapkan objek glass bersih dan bebas lemak.
- Mengambil 1 tetes H_2O_2 3% dan tetesan ke objek glass.
- Mengambil kuman pada media NAS secara steril dan mencampurkan tetesan H_2O_2 3% dengan kuman secara merata.

Interprestasi hasil :

- Munculnya gelembung (+) :Staphylococcus

- Tidak muncul gelembung (-) : *Streptococcus*

Tes Koagulase

- Menyiapkan objek glass yang bersih dan bebas lemak.
- Meneteskan plasma sitrat yang sudah diencerkan dengan Pz dengan perbandingan 1:5 pada objek glass.
- Mengambil kuman pada media NAS secara steril dan mencampurkan dengan plasma sitrat sampai rata.

Inteprestasi hasil :

- Jika ada gumpalan pasir (+) : *Staphylococcus aureus*.
- Jika tidak ada gumpalan pasir (-) : *Staphylococcus citrius* atau *Staphylococcus albus* (Novrina and Minawa, 2021).

Pasca Analitik

- Setelah selesai melakukan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis, hasil terhadap sampel swab rongga mulut mahasiswa perokok aktif dicatat secara sistematis pada lembar kerja penelitian.
- Selanjutnya, hasil pengamatan dibuat tabulasi dan diolah dengan metode analisis yang telah ditentukan untuk mengetahui gambaran serta presentase keberadaan bakteri *Staphylococcus Aureus* Pada Rongga Mulut Mahasiswa Perokok Aktif di Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.5.5 Tabulasi Data

Data hasil pemeriksaan yang diperoleh dapat ditabulasikan pada tabel 3.1 dibawah ini.

Tabel 3.1 Tabulasi Data Hasil Pemeriksaan Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* Pada Rongga Mulut Mahasiswa Perokok Aktif Di Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

No	Kode sampel	Hasil Pemeriksaan		keterangan
		Positif	Negatif	

3.6 Teknik Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian bakteri *Staphylococcus aureus* ini dianalisa secara deskriptif kemudian ditabulasikan dalam bentuk tabel dan diagram serta disajikan secara presentase.

