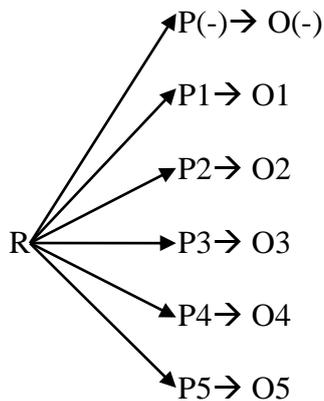


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan rancangan penelitian eksperimental dengan tujuan untuk mengetahui perbedaan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* antara berbagai konsentrasi perasan daun kemangi. Dengan rancangan penelitian sebagai berikut :



Gambar 3.1: Rancangan Penelitian (Zainuddin, 2003)

Keterangan :

R : Random

P (-) : Perlakuan tanpa diberi perasan daun kemangi (kontrol)

P1 : Perlakuan konsentrasi perasan daun kemangi 100 %

P2 : Perlakuan konsentrasi perasan daun kemangi 80 %

P3 : Perlakuan konsentrasi perasan daun kemangi 60 %

P4 : Perlakuan konsentrasi perasan daun kemangi 40 %

P5 : Perlakuan konsentrasi perasan daun kemangi 20 %

- O(-) : Observasi pertumbuhan *S. Aureus* setelah perlakuan kontrol
- O1 : Observasi pertumbuhan *S. Aureus* setelah perlakuan konsentrasi 100%
- O2 : Observasi pertumbuhan *S. Aureus* setelah perlakuan konsentrasi 80 %
- O3 : Observasi pertumbuhan *S. Aureus* setelah perlakuan konsentrasi 60 %
- O4 : Observasi pertumbuhan *S. Aureus* setelah perlakuan konsentrasi 40 %
- O5 : Observasi pertumbuhan *S. Aureus* setelah perlakuan konsentrasi 20 %

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* di dalam media pertumbuhan. *Staphylococcus aureus* yang ditumbuhkan berasal dari biakan murni, diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Klinik (BBLK).

3.2.2 Sampel penelitian

Sampel pada penelitian ini yaitu bakteri *Staphylococcus aureus*. Jumlah sampel yang digunakan yaitu 24 juta kuman, berasal dari 1 mata ose (*Standart Mc. Farland* = 1 juta kuman/ose). Sehingga dalam 24 tabung sampel yang digunakan 24 juta kuman . Teknik sampling dengan cara acak atau randomisasi. Jumlah ulangan/ replikasi masing- masing kelompok yaitu ≥ 4 yang ditentukan dengan rumus berikut (**Hidayat, 2010**) :

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

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

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

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

$$(n-1) \geq 3$$

$$n \geq 3+1$$

$$n \geq 4 \quad n \sim 4$$

Keterangan:

n : Jumlah ulangan atau jumlah sampel

k : Jumlah kelompok/ perlakuan

Jadi jumlah pengulangan sebanyak 4x

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2013 sampai Juli 2014, sedangkan waktu pemeriksaan dilaksanakan pada bulan Mei 2014.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini, yaitu:

Variabel bebas : Konsentrasi perasan daun kemangi (*Ocimum sanctum* Linn.).

Variabel terikat : Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Variabel kontrol : Lama Inkubasi, suhu, jumlah suspensi kuman *Staphylococcus aureus*.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

1. Konsentrasi perasan daun kemangi adalah perasan daun kemangi yang didapatkan dari 100 gr daun kemangi, kemudian ditumbuk lalu diperas sampai didapatkan sarinya. Konsentrasi daun kemangi dalam penelitian ini dikategorikan menjadi berbagai macam konsentrasi, yaitu: 100%, 80%, 60%, 40%, 20%, dan 0%.
2. Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* adalah ditetapkan berdasarkan kekeruhan atau kejernihan perasan daun kemangi yang terdapat pada masing-masing konsentrasi perasan daun kemangi setelah diinkubasi selama 24 jam 37°C. Untuk melihat ada tidaknya pertumbuhan kuman perlu dilakukan pemeriksaan yaitu dengan cara menanam pada media MSA (*Manitol Salt Agar*). Pertumbuhan dikategorikan menjadi :
 - positif (+) : ada pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, ditandai dengan adanya koloni berwarna kuning pada media MSA karena memecah manitol.
 - negatif (-) : tidak ada pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, ditandai dengan adanya koloni berwarna merah pada media MSA karena tidak memecah manitol.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh dengan cara observasi melalui uji Laboratorium. Rangkaian langkah-langkah pemeriksaannya diantaranya sebagai berikut:

3.5.1 Prinsip Pemeriksaan

Perasan daun kemangi diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi, kemudian masing-masing konsentrasi ditambahkan suspensi bakteri uji. Perlakuan tersebut akan diinkubasi dan diamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan terjadinya kekeruhan.

3.5.2 Bahan Pemeriksaan

1. Perasan daun kemangi
2. Suspensi kuman *Staphylococcus aureus*
3. Aquades steril
4. Pz steril
5. Media NA
6. Media MSA

3.5.3 Reagen Pemeriksaan

1. NaOH 0.1 N
2. HCl 0.1 N
3. BaCl₂ 1%
4. H₂SO₄ 1%

3.5.4 Prosedur Pembuatan Suspensi Kuman

Alat yang digunakan adalah tabung reaksi, pipet ukur, pipet pasteur, ose bulat, api spirtus, kaki tiga.

Prosedur:

Pembuatan suspensi kuman sesuai dengan metode Mc.Farland ¹/₂:

1. Menyiapkan 2 tabung steril, 1 untuk suspensi kuman dan yang 1 untuk standart Mc. Farland ¹/₂.

2. Prosedur pembuatan standart Mc. Farland $1/2$ yaitu:
 - a. Membuat perbandingan antara BaCl_2 1% : H_2SO_4 1% .
 - b. Memipet 0,05 ml BaCl_2 1% + 9,95 ml H_2SO_4 1%.
 - c. Menghomogenkan dengan cara mengkocok pelan tabung.
 - d. Standart Mc. Farland 1 ini kekeruhannya sama dengan setiap 1 ml suspensi kuman mengandung 150 juta kuman (Soemarno, 2005).
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 pada 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 $1/2$.
 - e. Apabila suspensi kurang keruh, maka tambahkan kuman menggunakan lidi kapas steril dan apabila terlalu keruh tambahkan PZ hingga kekeruhannya sama dengan standart Mc. Farland $1/2$.

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.

$$\frac{0,1 \text{ ml}}{15} = \frac{1}{150} / \text{ml}$$

Jumlah kuman setiap 1 mata ose :

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

= 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)

3.5.5 Prosedur Pembuatan Media NAP (BBLK, 1993)

Alat yang digunakan adalah timbangan (neraca analitik), pengaduk, pipet pasteur, pipet ukur, filler, erlenmeyer, gelas ukur, gelas arloji, plate, autoclave.

Prosedur:

1. Melakukan perhitungan media NA (Nutrien Agar).

Membuat NAP (6 plate, @ ± 17 ml \longrightarrow 102 ml)

Komposisi NA 20 gr per 1 liter $\longrightarrow \frac{20 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}} \times 102 \text{ ml} = 2.04 \text{ gr}$

2. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
3. Menimbang bahan (media NA) sesuai dengan perhitungan yaitu 2.04 gram menggunakan timbangan.
4. Mengukur volume aquadest sebanyak 102 ml menggunakan gelas ukur.
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest yang sudah diukur volumenya dalam erlenmeyer.

6. Memanaskan larutan di atas api spiritus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih.
7. Mengangkat larutan yang sudah dipanaskan dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam-suam kuku.
8. 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.
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 121⁰C 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 ± 17 ml sampai rata secara steril dan dekat dengan api.
12. Mendiampkannya sampai terlihat padat dan menyimpannya ke lemari es

3.5.6 Prosedur Pembuatan Media MSA (Manitol Salt Agar) (BBLK 1993)

Alat yang digunakan adalah timbangan (neraca analitik), pengaduk, pipet pasteur, pipet ukur, filler, erlenmeyer, gelas ukur, gelas arloji, plate, autoclave.

Prosedur:

1. Melakukan perhitungan media MSA yang dibutuhkan:

Membuat MSA (15 plate, @ ± 17 ml \longrightarrow 255 ml)

Komposisi MSA 108 gr per 1 liter $\longrightarrow \frac{108 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}} \times 255 \text{ ml} = 27,54 \text{ gr}$

2. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
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 spirtus 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 121⁰C 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.

3.5.7 Prosedur Pembuatan Konsentrasi Perasan Daun Kemangi

Alat yang digunakan adalah timbangan (neraca analitik), erlenmeyer, mortar + mortir, tabung sentrifuge, sentrifuge, rak tabung, corong, filler, pipet ukur, tabung reaksi.

Prosedur:

1. Memetik daun kemangi dari pohonnya.
2. Daun kemangi ditimbang 100 gram atau sesuai yang dibutuhkan.

3. Daun kemangi dicuci bersih, kemudian di bilas dengan aquadest steril, setelah itu ditumbuk sampai benar-benar halus menggunakan mortir.
4. Menyaring daun yang sudah ditumbuk tadi dengan kasa berlapis yang steril.
5. Mensentrifuge perasan tadi menggunakan tabung sentrifuge yang steril sehingga didapatkan perasan yang benar-benar jernih.
6. Mengambil 1 mata ose perasan yang sudah jernih secara steril, kemudian menanamnya ke media NAP, dengan cara menggoreskannya di permukaan media.
7. Inkubasi di inkubator selama 24 jam 37°C .
8. Mengamati hasilnya, jika tidak ada pertumbuhan kuman berarti perasan daun kemangi tersebut sudah benar-benar steril. Namun jika pada media NAP terdapat pertumbuhan kuman berarti perlu dilakukan proses tindalisasi, yaitu:
 - a. Memanaskan perasan daun kemangi tersebut dengan waterbath pada suhu 90°C selama 15 menit.
 - b. Kemudian inkubasi di inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C .
 - c. Mengulangi perlakuan tersebut sampai 3 kali.
9. Menanam kembali perasan daun kemangi yang sudah melalui proses tindalisasi di media NAP kemudian menginkubasinya di inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C .
10. Mengamati hasilnya, jika tidak ada pertumbuhan kuman berarti perasan daun kemangi tersebut sudah benar-benar steril.
11. Membuat konsentrasi perasan daun kemangi 100%, 80%, 60%, 40%, 20%, dan 0% yaitu:

- Konsentrasi 100% :Pada tabung 1 mengisi 1 ml perasan daun kemangi awal, itu sebagai konsentrasi 100%.
- Konsentrasi 80% :Pada tabung 2 mengisi 0,2 ml Pz steril menambahkan perasan daun kemangi konsentrasi 100% sebanyak 0,8 ml, menghomogenkan.
- Konsentrasi 60% :Pada tabung 3 mengisi 0,4 ml Pz steril menambahkan perasan daun kemangi konsentrasi 100% sebanyak 0,6 ml, menghomogenkan.
- Konsentrasi 40% :Pada tabung 4 mengisi 0,6 ml Pz steril menambahkan perasan daun kemangi konsentrasi 100% sebanyak 0,4 ml, menghomogenkan.
- Konsentrasi 20% :Pada tabung 5 mengisi 0,8 ml Pz steril menambahkan perasan daun kemangi konsentrasi 100% sebanyak 0,2 ml, menghomogenkan.
- Konsentrasi 0% : Pada tabung 6 mengisi 1 ml Pz steril.

(Sumber: Puspitasari, 2013)

3.5.8 Prosedur Pemeriksaan Sampel

Alat yang digunakan adalah tabung reaksi kecil, rak tabung, pipet ukur, api spirtus, kaki tiga, filler, ose bulat, autoclave.

Prosedur :

Hari Pertama :

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

3. Melabeli masing-masing tabung sesuai dengan konsentrasinya, yaitu 100%, 80%, 60%, 40%, 20%, dan 0% atau K (Kontrol).
4. Memanaskan ose bulat di atas nyala api spirtus, mengambil suspensi kuman *Staphylococcus aureus* sebanyak 1 mata ose dan membiakkannya di tabung berlabel 100% dengan cara menggesekkan ose di dinding tabung yang berisi perasan sebanyak 3 kali. Kemudian ose bulat dipanaskan kembali di atas nyala api spirtus. Setelah itu, mengambil lagi 1 mata ose suspensi kuman *Staphylococcus aureus* dan membiakkannya pada tabung berlabel 90%, begitu seterusnya sampai pada tabung kontrol. Semua perlakuan dilakukan secara steril dekat dengan api.
5. Menutup kembali tabung dengan kapas berlemak.
6. Inkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam (Sumber : Gustiani, 2013).

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 37⁰C selama 24 jam (Sumber : Gustiani, 2013).

Hari Ketiga :

1. Mengamati hasilnya pada media MSA apakah terbentuk koloni yang mengidentifikasi kuman tersebut adalah *Staphylococcus aureus*.

2. Mencatat adanya pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada masing-masing media MSA sesuai dengan konsentrasi.
3. Mencatat hasil yang di amati sebagai data (Sumber : Gustiani, 2013).

3.5.9 Tabulasi Data

Data yang diperoleh ditabulasikan sebagai berikut:

Tabel 3.1 : Contoh tabulasi data

Pertumbuhan bakteri	Jumlah pertumbuhan bakteri pada konsentrasi perasan daun kemangi						
	100%	80%	60%	40%	20%	K	T
Tumbuh							
Tidak tumbuh							
Total							

Keterangan:

Keterangan:

K : Kontrol

T : Total pertumbuhan bakteri dari perlakuan pengulangan 4 kali

3.6 Metode Analisis Data

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