

BAB IV

METODELOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian *deskriptif* yaitu dengan menggambarkan fenomena yang terjadi atau diselidiki tentang angka lempeng total dan identifikasi *Staphylococcus aureus* lulur tradisional pada pemijat di daerah wisata pantai Kuta.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Bakteriologi Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Denpasar

2. Waktu penelitian

Waktu pengambilan sampel dan pemeriksaan sampel untuk pemeriksaan ini dilakukan pada bulan Maret sampai Juni 2018.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh lulur yang digunakan oleh pemijat di daerah wisata Pantai Kuta.

2. Sampel

Sampel merupakan bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi tersebut (Sugiyono, 2014).

a. Unit analisis

Unit analisis dapat diartikan sebagai sesuatu yang berkaitan dengan fokus atau komponen yang diteliti. Unit analisis dalam penelitian ini adalah lulur tradisional (Sugiyono, 2014).

b. Jumlah sampel

Berdasarkan hasil survei penulis, didapatkan sampel lulur tradisional pada pemijat di daerah wisata pantai Kuta adalah sebanyak 10 lulur tradisional dengan menggunakan teknik *purposive sampling* (Sugiyono, 2014).

c. Teknik pengambilan sampel

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini yaitu *purposive sampel* yang merupakan teknik penentuan sampel dengan pertimbangan khusus sehingga layak dijadikan sampel. Pertimbangan khusus tersebut antara lain : karakteristik yang sama (merk yang digunakan, jenis lulur), lokasi dibatasi dari restoran cepat saji (McD) Kuta hingga Mall Bali Galeria, waktu, biaya dan keterbatasan penulis. Dalam hal ini, penulis menentukan jumlah sampel sebanyak 10 yang diharapkan sudah mewakili kondisi populasi tersebut (Sugiyono, 2014).

D. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

- a. Data primer adalah data yang diperoleh dan dikumpulkan sendiri oleh penulis secara langsung meliputi identitas sampel, kualitas lulur dan pemeriksaan laboratorium (uji angka lempeng total dan identifikasi *Staphylococcus aureus*).
- b. Data sekunder adalah data yang diperoleh dari mengutip data dari pihak lain yaitu data yang berhubungan dengan usulan penelitian.

2. Cara pengumpulan data

Pengumpulan data dilakukan dengan mengambil sampel lulur tradisional pada pemijat di daerah wisata pantai Kuta kemudian diuji di laboratorium untuk dicari uji angka lempeng total dan identifikasi *Staphylococcus aureus*. Hasil uji laboratorium dibandingkan dengan peraturan BPOM (1994) tentang syarat mutu lulur untuk mengetahui apakah sampel memenuhi persyaratan atau tidak.

3. Instrumen pengumpul data

- a. Alat Tulis, untuk membantu proses pengisian data observasi
- b. Kamera Digital, untuk dokumentasi

E. Alat, Bahan dan Prosedur Kerja

1. Alat

Adapun alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *cotton bud steril*, tabung reaksi (merk Pyrex), rak tabung reaksi, api bunsen, ose bulat, ose jarum, pinset, batang pengaduk, erlenmeyer (merk Pyrex), bola hisap, pipet ukur (merk Pyrex), mikropipet (merk Terumo), mikrotip, kaca objek, pipet tetes, pinset, jembatan

pewarnaan, gelas beaker (merk Iwaki), mikroskop (Olympus), gelas ukur (merk Pyrex) petridish, inkubator (*merk Esco Isotherm*), *cool box*, *Bio Safety Cabinet* (merk Biobase), *hotplate*, *magnetic stirrer*, neraca analitik (merk Radwag), autoclave (merk Tomy ES-215), dan *Quibec Colony Counter*.

2. Bahan

Bahan yang digunakan antara lain *Sodium Chlorida* (NaCl) 0,9% media *Plate Count Agar* (PCA), akuades steril, kertas pH, *Crystal Violet*, Lugol, Safranin, Alkohol 70%, indikator *Bromthymol Blue*, media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMB), media *Blood Agar Plate* (BAP), media *Manitol Salt Agar* (MSA), reagen Katalase, kapas berlemak, aluminium foil, indikator tip dan kertas label.

3. Prosedur kerja

a. Tahap Persiapan

1) Persiapan alat pemeriksaan

Semua alat gelas yang akan digunakan untuk pemeriksaan disterilkan dengan mencucinya dan dibungkus kertas kemudian dimasukkan kedalam oven pada suhu 110° selama 1 jam

2) Persiapan media dan reagensia

a) Pembuatan media PCA (*Plate Count Agar*)

Komposisi media PCA merk Oxoid adalah *tryptone* 5 g, *yeast extract* 2,5 g, *glucose* 1,0 g, *agar* 9 g dan pH 7,0

Cara pembuatan :

(1) Ditimbang 19,6875 g PCA dengan neraca analitik

(2) Dilarutkan dalam 1.125 ml aquadest

- (3) Dipanaskan sampai larut dengan sempurna
- (4) Dimasukkan kedalam Erlenmeyer dan ditutup kapas
- (5) Disterilisasi dalam autoklaf selama +2 jam pada suhu 121°C

b) Pembuatan Media BAP (*Blood Agar Plate*)

Komposisi media BAP merk Oxoid adalah *proteose peptone* 15 g, *liver digest* 2,5 g, *yeast extract* 5 g, *sodium chloride* 5 g, *agar* 12 g, dan pH 7,4

- (1) Ditimbang 9 g media BAP dengan neraca analitik
- (2) Dimasukkan kedalam Erlenmeyer
- (3) Dilarutkan dengan 225 ml akuades
- (4) Dipanaskan diatas *hot plate stirrer* agar homogen
- (5) Disterilisasi pada autoclave suhu 121°C selama 15 menit
- (6) Ditambahkan media yang sudah disterilisasi dengan plasma darah 5%
- (7) Dihomogenkan campuran tersebut dengan cara digoyang-goyangkan
- (8) Dituang dalam petri dish
- (9) Ditunggu hingga memadat

c) Pembuatan Media MSA (*Mannitol Salt Agar*)

Komposisi media MSA merk Oxoid adalah *lab-lemco powder* 1 g, *peptone* 10 g, *mannitol* 10 g, *sodium chloride* 75 g, *phenol red* 0,025 g, *agar* 15 g, dan pH 7,5

- (1) Ditimbang 24, 975 g MSA dengan neraca analitik
- (2) Dimasukkan ke Erlenmeyer
- (3) Dilarutkan dengan 225 ml akuadest
- (4) Dipanaskan diatas *hot plate stirrer* agar homogeny
- (5) Disterilisasi pada autoclave suhu 121°C selama 15 menit

(6) Dihomogenkan campuran tersebut dengan cara digoyang-goyangkan

(7) Dituang dalam petri dish

(8) Ditunggu hingga memadat

d) Pembuatan Pengenceran Bertingkat

Pengenceran lulur tradisional secara bertingkat sehingga mendapatkan suatu seri dengan tingkat pengenceran menurut deret ukur, pengencerannya yaitu :

(1) Pengenceran I : lulur tradisional dimasukkan kedalam labu Erlenmeyer kemudian ditimbang sebanyak 1 g dan dilarutkan dengan NaCl 0,9% sampai volume 10 ml (pengenceran 10^{-1})

(2) Pengenceran II : Pengenceran I diambil sebanyak 1 ml dengan pipet ukur steril, kemudian dimasukkan dalam tabung steril yang sudah berisi 9 ml NaCl 0,9 % dikocol baik-baik (pengenceran 10^{-2})

(3) Pengenceran III : Pengenceran II diambil sebanyak 1 ml dengan pipet ukur steril, kemudian dimasukkan dalam tabung steril yang sudah berisi 9 ml NaCl 0,9 % dikocol baik-baik (pengenceran 10^{-3})

(4) Pengenceran IV : Pengenceran III diambil sebanyak 1 ml dengan pipet ukur steril, kemudian dimasukkan dalam tabung steril yang sudah berisi 9 ml NaCl 0,9 % dikocol baik-baik (pengenceran 10^{-4})

(5) Pengenceran V : Pengenceran IV diambil sebanyak 1 ml dengan pipet ukur steril, kemudian dimasukkan dalam tabung steril yang sudah berisi 9 ml NaCl 0,9 % dikocol baik-baik (pengenceran 10^{-5})

e) Pembuatan NaCl

(1) Ditimbang Natrium Klorida sebanyak 0,9 g

(2) Dimasukkan kedalam labu Erlenmeyer, kemudian dilarutkan sampai 100 ml aquadest (tanda batas).

(3) Setelah dilarutkan, pH nya ditepatkan menjadi 7,0 dengan NaOH 0,1 N

(4) Disaring dengan kertas saring, air saringnya dimasukkan dalam labu Erlenmeyer lain. Kemudian ditutup dengan kapas dan kertas diikat dengan tali

(5) Disterilisasi dengan autoklaf 121°C selama 15 menit

3) Persiapan Sampel

Lulur tradisional pada pemijat di daerah wisata Pantai Kuta

b. Tahap Pengujian

1) Penyiapan bahan pemeriksaan

a) Ditimbang 1 g kemasan lulur tradisional kedalam labu Erlenmeyer atau botol steril

b) Dituangkan 9 ml air g fisiologis (NaCl 0,9%)

c) Dikocok hingga homogen

d) Bahan dengan pengenceran tersebut siap digunakan untuk pemeriksaan uji angka lempeng total

2) Uji Angka Lempeng Total

a) Disiapkan alat dan bahan

b) Dihidupkan api bunsen.

c) Difiksasi mulut tabung sebelum sampel diambil

d) Dipipet sampel pengenceran dari 10^{-1} sampai 10^{-5} sebanyak 100 μ m dengan menggunakan mikropipet dan dituangkan pada media PCA.

e) Sampel diratakan dengan menggunakan menggunakan metode *pour plate*

- f) Diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam.
- 3) Identifikasi *Staphylococcus aureus*
 - a) Dari pengenceran 10⁻¹ diambil sebanyak 1 ose kemudian distreak pada media BAP
 - b) Diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam.
 - c) Diidentifikasi koloni yang tumbuh (ukuran, bentuk, warna, dan tipe hemolysisnya)
 - d) Dipilih 1 koloni yang tunggal untuk dilanjutkan ke uji katalase
- (1) Uji Katalase
 - (a) Disiapkan objek glass, dan reagen katalase (hydrogen peroksida 3%) ditetaskan pada objek glass. Diambil 1-2 ose koloni tunggal pada media BAP, dicampurkan merata dengan reagen katalase
 - (b) Diamati reaksi yang terjadi (katalase positif ditandai dengan adanya gelembung-gelembung gas)
 - (c) Koloni yang menunjukkan katalase positif dilanjutkan dengan uji koagulase untuk mengetahui jenis dari bakteri *Staphylococcus*.
 - (d) Pewarnaan gram pada sampel
 - (e) Sampel yang positif uji katalase kemudian diwarnai gram
 - (f) Dibuat hapusan koloni pada objek glass kemudian preparat diwarnai dengan pengecatan gram
 - (g) Diamati dibawah mikroskop. Koloni bakteri yang positif *Staphylococcus aureus* akan terlihat berbentuk bulat seperti buah anggur dan merupakan bakteri gram positif.

- (2) Pembiakan ke media MSA (Manitol Salt Agar)
 - (a) Koloni dari agar darah yang menunjukkan uji katalase positif di sub kultur dengan metode 4 kuadran ke media MSA
 - (b) Media diinkubais pada suhu 37⁰ C selama 24 jam.
 - (c) Diamati koloni yang tumbuh, fermentasi manitol ditandai dengan perubahan warna dari merah menjadi kuning.
- (3) Uji Koagulase
 - (a) Disiapkan tabung reaksi yang sudah ditambahkan dengan plasma darah sebagai reagen koagulase
 - (b) Diambil koloni pada media
 - (c) Dimasukkan kedalam tabung reaksi (dilakukan 3x dengan difiksasi ose pada bunsen)
 - (d) Ditutup mulut tabung dengan kapas berlemak dan aluminium foil
 - (e) Diinkubasi suhu 37⁰ C selama 24 jam.
 - (f) Koagulase positif ditandai dengan membekunya didalam tabung reaksi

3. Pelaporan Hasil

- a. Perhitungan koloni pada Uji Angka Lempeng Total
 - 1) Pada media, koloni-koloni bakteri yang tumbuh dihitung dengan *colony counter* atau secara manual dengan memberi titik dengan spidol pada cawan petri bagi koloni yang sudah dihitung
 - 2) Idealnya jumlah koloni per-plate dari pengenceran yang boleh dihitung yaitu antara 30 sampai 300 CFU (Coloni Forming Unit)
 - 3) Koloni besar, kecil, menjalar dianggap berasal dari satu koloni

- 4) Kejadian-kejadian yang menyebabkan kerusakan pertumbuhan koloni, misalnya terjadi spreader (tidak membentuk koloni melainkan merata), penghambatan, tidak tumbuh, maka tidak digunakan untuk perhitungan

Pelaporan Uji Angka Lempeng Total

Rumus perhitungan Uji Angka Lempeng Total

$$\frac{(\sum-C) \times 10 + (\sum-C) \times 100 + (\sum-C) \times 1000}{\sum.P}$$

Keterangan :

\sum : Jumlah koloni

C : Control

P : Pengencer

b. Pelaporan Identifikasi *Staphylococcus aureus*

1) Pelaporan Identifikasi di media BAP

Hasil positif BAP digunakan untuk melihat tipe hemolisis yang disebabkan oleh koloni bakteri

2) Pelaporan Identifikasi di Uji Katalase

Hasil positif ditunjukkan adanya pembentukan gelembung karena *Staphylococcus sp.* mengubah hydrogen peroksida menjadi air dan oksigen

3) Pelaporan Hasil Pembacaan Pewarnaan Gram

Koloni bakteri yang positif *Staphylococcus aureus* akan terlihat berbentuk bulat seperti buah anggur dan merupakan bakteri gram positif.

4) Pelaporan Identifikasi pada media MSA

Diamati koloni *Staphylococcus aureus* yang tumbuh dengan melihat perubahan media MSA menjadi warna kuning. *Staphylococcus aureus* mampu memfermentasi mannitol di media MSA sehingga terjadi perubahan warna media dari merah menjadi kuning.

5) Pelaporan Identifikasi pada Uji Koagulase

Hasil positif ditandai dengan membekunya didalam tabung reaksi. Reaksi koagulase positif untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dengan spesies *staphylococcus* yang lain.

F. Teknik Pengolahan Data

1. Pengolahan data

Data yang diperoleh dari hasil pengujian Angka Lempeng Total (ALT) dan identifikasi *Staphylococcus aureus* kemudian diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan diberi narasi.

2. Analisis data

Data yang didapat dan disajikan dalam bentuk tabel kemudian dideskripsikan dan dibandingkan standar menurut BPOM (1994) tentang syarat mutu lulur tradisional

