

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan mulai bulan Februari sampai April 2015 di Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSUP H.Adam Malik Medan.

3.2 Bahan dan Alat

3.2.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sputum positif *Mycobacterium tuberculosis*, media Lowenstein-Jensen, larutan NaOH 4%, dan larutan PBS.

3.2.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Biosafety Cabinet Class II*, tabung sentrifus 50 ml, pH meter, rak tabung, tabung erlenmeyer, *beakerglass*, *vortex*, sentrifus, *timer*, neraca analitik, bunsen, pipet otomatis, tip mikropipet dan inkubator.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 1 faktor yaitu waktu pemaparan NaOH 4% (T) yang terdiri atas 6 perlakuan yaitu :

$T_1 = 5$ menit

$T_2 = 10$ menit

$T_3 = 15$ menit

$T_4 = 20$ menit

$T_5 = 25$ menit

$T_6 = 30$ menit

Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 4 kali

Data hasil penelitian dianalisis dengan sidik ragam model linier sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$$

$$i = 1, 2, 3, 4, 5, 6 \quad j = 1, 2, 3, 4$$

Dimana:

Y_{ijk} = Hasil pengamatan jumlah koloni pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

μ = Nilai tengah rata-rata

α_i = Efek faktor waktu pemaparan NaOH ke-i

e_{ij} = Efek galat yang disebabkan oleh faktor waktu pemaparan NaOH ke-i dan pada ulangan ke-j

Jika dari hasil sidik ragam diperoleh pengaruh yang nyata, maka dilanjutkan dengan Uji Duncan Multiple Range Test (DMRT) pada taraf 5% (Steel and Torrie, 1993).

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Metode Pengujian

Dalam penelitian ini metode yang digunakan adalah metode Petroff yaitu dengan mencampurkan 1 bagian NaOH 4% dengan 1 bagian sputum kemudian di homogenkan dengan *vortex* dan ditunggu selama 15 menit lalu di netralkan dengan larutan PBS lalu diputar dengan sentrifus dengan kecepatan 3000 g selama 15 menit (Lestari,2005).

3.4.2 Pembuatan sediaan sputum

Diambil contoh uji sputum pada bagian yang purulen dengan lidi kemudian diapuskan sputum diatas kaca, setelah sediaan kering lalu dilakukan fiksasi diatas api.

3.4.3 Pewarnaan sediaan dengan metode *Ziehl-Neelsen*

Sediaan yang telah dibuat tersebut kemudian diletakkan pada rak yang ditempatkan diatas bak cuci lalu digenangi dengan carbol fuchsin, HCl alkohol dan metilen blue. Setelah itu dikeringkan sediaan dan dibaca pada mikroskop dengan pembesaran 10x dan 100x.

3.4.4 Pembuatan larutan NaOH 4%

NaOH ditimbang sebanyak 40 gr kemudian dilarutkan dengan 1000 ml aquadest setelah larut, larutan NaOH tersebut di alikuot kedalam botol – botol kecil lalu disterilkan pada autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit.

3.4.5 Pembuatan larutan Phosphate Buffer Solution 0,067 M pH 6,8

Langkah I pembuatan larutan stok (10x)

Larutan A

Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) ditimbang sebanyak 94,7 gr kemudian dilarutkan dengan 1000 ml aquadest

Larutan B

Monophotassium hydrogen phosphate (KH_2PO_4) ditimbang sebanyak 90,7 gr kemudian dilarutkan dengan 1000 ml aquadest.

Setelah kedua larutan tersebut dibuat lalu larutan B dimasukkan kedalam beakerglass sebanyak 200 ml kemudian ditambahkan dengan larutan A sedikit

demi sedikit sambil diatur dengan pH meter sampai mendapatkan pH 6,8. Kemudian disterilkan pada autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit.

Langkah II pembuatan larutan kerja (1x)

Larutan stok dimasukkan sebanyak 100 ml ke dalam beaker glass lalu ditambahkan dengan 900 ml aquadest kemudian larutan tersebut dialiokot kedalam botol – botol kecil 100 ml dan disterilkan pada autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit.

3.4.6 Pembuatan media Lowenstein Jensen

Telur bebek yang sudah bersih dan kering direndam dalam alkohol 70% selama 15 menit kemudian pecahkan telur dan tampung langsung telur tersebut pada blender yang sudah disterilisasi lalu blender kurang lebih 2 detik atau sampai terlihat homogen tetapi jangan sampai terjadi gelembung lalu saring dan diukur sebanyak 1 liter. Media garam LJ base ditimbang sebanyak 37,7 gr lalu dilarutkan dalam 600 ml aquades steril kemudian tambahkan 12 ml gliserol dan aduk sampai homogen setelah itu disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit dan larutan biarkan dingin hingga suhu 50°C. Setelah dingin massa telur homogen dan larutan garam LJ dicampurkan dengan perbandingan 10 : 6 dan diaduk sampai homogen yang ditandai dengan warna hijau malasit yang merata kemudian media dituang ke dalam botol Mc.Cartney sebanyak 6 – 8 ml lalu media di koagulasi didalam hot air oven pada suhu 85°C selama 45 menit dengan kemiringan 30°C. Setelah selesai media dikeluarkan dan didinginkan pada suhu ruang.

3.4.7 Inokulasi pada media Lowenstein Jensen

Sputum dituangkan kedalam 7 tabung sentrifus masing – masing sebanyak 5 ml lalu ditambahkan larutan NaOH 4% dengan perbandingan 1:1. Setelah itu dicampur dengan vortex sampai homogen, kemudian didiamkan pada suhu ruang dengan waktu tabung I: 5 menit, tabung II: 10 menit, tabung III: 15 menit, tabung IV: 20 menit, tabung V: 25 menit, tabung VI: 30 menit kemudian larutan PBS ditambahkan sampai volume 45 ml dengan menggunakan pipet lalu sentrifus dengan kecepatan 3000 g selama 15 menit. Cairan supernatan dibuang ke dalam wadah berisi desinfektan lalu larutan PBS ditambahkan sebanyak 1 ml ke dalam sedimen dan kocok hingga homogen. Sedimen diambil 100 µl lalu masukkan ke media LJ dan diratakan ke seluruh media kemudian longgarkan tutup media lalu dimiringkan 30° dan disimpan ke dalam inkubator dengan suhu 37°C. Setelah 24 jam diamati permukaan media lalu tutup media dieratkan, letakkan diposisi vertikal, dan disimpan di dalam inkubator kembali. Pengamatan dilakukan disetiap satu minggu sampai minggu ke-8.