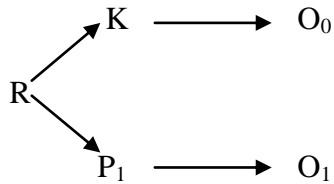


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh rebusan daun mint (*Mentha piperita*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Adapun desain penelitian dirancang sebagai berikut :



Sumber : Hidayat, (2010)

Keterangan :

R : Random

K : Kontrol

P1 : Perlakuan dengan memberi rebusan daun mint (*Mintha piperita*) 100 %

O₀ : Observasi pertumbuhan bakteri tanpa diberi rebusan daun mint (*Mintha piperita*)

O₁ : Observasi pertumbuhan bakteri setelah diberi rebusan daun mint (*Mintha piperita*) 100%

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus* dari biakan murni Departement Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus* dari biakan murni departement Mikrobiologi Universitas Muhammdiyah Surabaya. Dalam penelitian ini terdapat dua perlakuan yaitu dengan pemberian rebusan daun mint dan tanpa pemberian daun rebusan daun mint. Pengulangan masing-masing perlakuan sebanyak 16 kali yang di peroleh dari rumus sebagai berikut:

$$(2-1)(r-1) \geq 15$$

$$1(r-1) \geq 15$$

$$r-1 \geq 15$$

$$r \geq 15+1$$

$$r \geq 16 \quad (\text{Federer, 2010})$$

Keterangan :

t : Jumlah kelompok

r : Jumlah pengulangan

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2019 sampai dengan Juli 2019, adapun waktu pemeriksaan dilakukan pada bulan Juni 2019.

3.3.2 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi D3 Teknik Laboratorium Medik Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya, Jalan Sutorejo 59 Surabaya.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Variabel bebas : Pemberian rebusan daun mint (*Mintha piperita*).
2. Variabel terikat : Pertumbuhan bakteri *staphylococcus aureus*.
3. Variabel Kontrol : Waktu inkubasi, suhu, jumlah suspense kuman / OD (Optical Density) konsentrasi rebusan, metode pemeriksaan.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Rebusan daun mint (*Mintha piperita*) adalah menaruh daun mint (*Mintha piperita*) di dalam air dengan volume tertentu yang di didihkan dengan waktu tertentu dengan cara dipanaskan.
2. Pertumbuhan bakteri *Stapylococcus aureus* dikatakan tumbuh apabila ditemukan koloni dengan morfologi bulat, halus, dan berwarna kekuningan sampai kuning emas pada media MSA (*Manitol Salt Agar*) yang telah diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C

3. Suhu adalah temperature yang akan di gunakan untuk bakteri aerob yang akan berkembang biak dengan baik yaitu suhu 37^oC.
4. Waktu inkubasi adalah waktu yang dibutuhkan oleh bakteri untuk meperbanyak diri yaitu 1x24 jam.
5. Optical Density (OD) adalah tingkat kekeruhan bakteri yang sudah di standarkan dengan standart Mc Farland 0,5

3.5 Teknik Pengumpulan Data

Data pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh dengan cara observasi langsung, yaitu dengan uji laboratorium. Pemeriksaan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan pemberian rebusan daun mint menggunakan metode dilusi. Dengan langkah-langkah pemeriksaan sebagai berikut:

3.5.1 Prinsip Pemeriksaan

Perhitungan jumlah koloni kuman diperoleh dari suspensi kuman yang di tumbuhkan pada pada suhu 37^oC rebusan daun mint dengan konsentrasi tertentu selama 24 jam lalu di tumbuhkan ke media MSA.

3.5.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang di gunakan dalam penelitian ini meliputi neraca analitik, gelas arloji, tabung reaksi, batang pengaduk, rak tabung, pipet gelas ukur pasteur, api sepiritus, kaki tiga, kasa asbes, *hot plate*, Erlenmeyer, ose, filler, cawan Petri, tabung *centrifuge*, *autoclave*, plate, pipet ukur, mikropipet, *yellow tip* dan LAF (Laminar air Flow).

Sedangkan bahan yang di gunakan meliputi rebusan daun mint dengan konsentrasi 100% suspensi kuman *staphylococcus aureus*, kertas PH, kertas saring, media *Nutrient Agar*, media MSA, NaCl Broth, larutan H₂SO₄, larutan BaCl 1%.

3.5.3 Prosedur Penelitian

A. Pembuatan suspensi kuman

Cara untuk membuat suspensi kuman dengan metode Mac Farland 0,5 sebagai berikut:

1. Disiapkan 2 tabung steril, untuk suspensi dan untuk standart Mac Farland.
2. Membuat standart Mac Farland:
 - a. Dicampur BaCl 1% dan H₂SO₄ 1% yaitu dengan perbandingan BaCl 1% 0,05ml : H₂SO₄, 1% 9,095ml
 - b. Dipipet BaCl 1% 0,05 ml kemudian pipet H₂SO₄, 9,95 ml
 - c. masukkan pada tabung steril lalu di homogenkan.
 - d. Standart Mac Farland 0,5 ini tiap 1 ml nya mengandung 150 juta kuman. (Soemarno, 2006)
3. Membuat suspensi kuman
 - a. Diisi NaCl Broth 3 ml kedalam tabung steril.
 - b. Diambil biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus* yang sudah ditanam di media NAS dengan lidi kapas steril.
 - c. Dihomogenkan lidi kapas tadi dengan bakteri ke dalam tabung yang berisikan NaCl Broth.

- d. Dibandingkan warna suspensi kuman dengan standart Mac Farland 0,5.
 - e. Apabila warna kurang keruh, maka ditambahkan NaCl Broth / PZ lagi hingga warna benar-benar keruh seperti standart Mac Farland.
 - f. Kemudian disimpan dalam incubator selama 24 jam dengan suhu 37°C.
4. Menstandarkan ose yang akan di gunakan dalam penelitian (Tera Ose).
- a. Disiapkan tabung steril, pipet 0,1 ml aquadest
 - b. Dinyalakan api spirtus.
 - c. Diambil 1 mata ose kemudian bakar di atas api sepirtus sehingga aquadest yang ada di ose habis. Lakukan berulang-ulang sampai aquadest dalam tabung habis.
 - d. Didapatkan 15 mata ose dari aquadest, setelah aquadest habis.

$$\frac{0,1 \text{ ml}}{20} = \frac{1}{200} \text{ ml}$$

B. Pembuatan Rebusan Daun Mint (*Mintha piperita L*)

Pembuatan rebusan daun mint (*Mintha piperita L*) dengan cara sebagai berikut:

1. Dipilih daun mint yang masih segar
2. Ditimbang daun mint sebanyak 100gr
3. Dengan menggunakan perbandingan 1:1, maka 100gr untuk daun mint dan 100ml untuk aquadest.
4. Dicuci bersih daun mint dan terakhir cuci dengan aquadest steril

5. Dipotong kecil-kecil daun mint.
6. Dimasukan daun mint kedalam aquades sebanyak 100ml
7. Kemudian di rebus dengan suhu 90° C selama 15 menit (Rukmi, 2016)

C. Pemeriksaan Sterilitas Rebusan Daun Mint (*Mintha piperita L*)

Pemeriksaan sterilitas rebusan daun mint (*Mintha piperita L*) dengan cara sebagai berikut:

1. Setelah direbus, disaring menggunakan kasa steril dalam LAF dan Mengambil 1 mata ose rebusan yang sudah disaring dan steril, kemudian ditanamkan kedia NAP, dengan cara menggoreskan di permukaan media.
2. Diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C dalam incubator.
3. Diamati hasilnya, jika tidak terjadi pertumbuhan kumannya berarti rebusan daun mint (*Mintha piperita L*) tadi sudah benar-benar steril. Namun jika media NAP (*Natrium Agar Plate*) terdapat pertumbuhan kuman berarti perlu dilakukan proses tindalisasi.
4. Ditanam kembali pada media NAP (*Natrium Agar Plate*) yang sudah melalui proses tindalisasi dan di inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.
5. Membuat konsentrasi 100% yaitu:
Konsentrasi 100% : pada tabung 1 diisi air rebusan daun mint tanaman daun mint sebanyak 1 ml

3.5.3 Prosedur Pemeriksaan Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Pada Rebusan Daun Mint (*Mintha piperita L*)

Prosedur pemeriksaan sampel adalah sebagai berikut :

Hari Pertama :

1. Disiapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
2. Dinyalakan api spirtus dengan korek api
3. Dipanaskan ose bulat diatas yang sudah dinyalakan.
4. Diambil suspensi kuman murni *Staphylococcus aureus* sebanyak 3 kali melalui dinding tabung.
5. kemudian dibiakkannya ditabung dengan konsentrasi 100% Lakukan dengan cara tersebut pada tabung yang berisi NaCl Broth Ditutup kembali tabung dengan kasa.
6. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Hari Kedua

1. Diamati tabung, apakah terjadi kekeruhan apa tidak.
2. Diambil dari masing-masing tabung dengan ose kemudian ditanam pada media MSA (*Manitol Salt agar*) lalu amati apakah kuman yang tumbuh.
3. Dipanaskan ose bulat pada api sepirtus, kemudian mengambil satu-satu mata ose kuman pada masing-masing tabung.
4. Digoreskan ose pada media MSA (*Manitol Salt agar*) dengan metode Y.

5. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Hari Ketiga

1. Diamati pada hasil media MSA (*Manitol Salt agar*) apakah terbentuk koloni yang mengidentifikasi kuman *Staphylococcus aureus* atau bukan.
2. Dihitung jumlah koloni *Staphylococcus aureus* pada masing-masing pengulangan.
3. Dicatat hasil koloni sebagai data.

3.5.5 Tabulasi Data

Data yang diperoleh di tabulasikan pada Table 3. 1 sebagai berikut :

Table Data 3.1 Pengaruh rebusan daun mint terhadap penghambatan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Jumlah koloni bakteri pada rebusan daun mint (<i>Mintha piperita</i>) (koloni/ml)			
Kode	Konsentrasi 0%	Kode	Konsentrasi 100%
C1		P1	
C2		P2	
C3		P3	
C4		P4	
C5		P5	
C6		P6	
C7		P7	
C8		P8	
C9		P9	
C10		P10	
C11		P11	
C12		P12	
C13		P13	
C14		P14	
C15		P15	
C16		P16	
Jumlah		Jumlah	
Rata-rata		Rata-rata	

3.6 Analisis Data

Data pertumbuhan bakteri dianalisis dengan uji normalitas kemudian lanjut uji signifikan homogenitas setelah itu di lanjut lagi dengan uji T bebas dengan nilai 0,05.