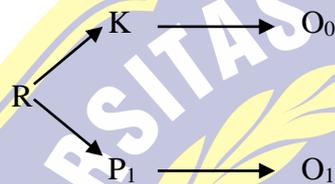


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh perasan daun delima (*Punica granatum*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Adapun desain penelitian dirancang sebagai berikut :



Keterangan :

R : Random

K : Kontrol

P1 : Perlakuan dengan memberi perasan daun delima (*Punica granatum*) 100 %

O₀ : Observasi pertumbuhan bakteri tanpa diberi perasan daun delima (*Punica granatum*)

O₁ : Observasi pertumbuhan bakteri setelah diberi perasan daun delima (*Punica granatum*) 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 bakteri *Staphylococcus aureus* murni dipindahkan dari biakan murni di media *Nutrien Agar Slant* (NAS). Dalam penelitian ini terdapat dua perlakuan yaitu dengan pemberian perasan daun delima dan tanpa pemberian daun rebusan. 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 Desember 2018 sampai dengan Juli 2019, adapun waktu pemeriksaan dilakukan pada bulan Juli 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 No. 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 perasan daun delima(*Punica granatum*).
2. Variabel terikat : Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.
3. Variabel kontrol : Suhu, Jenis Media pertumbuhan bakteri, Jenis bakteri, volume perasan daun delima,

3.4.2 Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Variabel bebas :

Pemberian perasan daun delima (*Punica granatum*) dalam penelitian ini dikategorikan menjadi skala nominal yaitu :

- a). Pemberian perasan daun delima (*Punica granatum*).
- b). Tanpa pemberian perasan daun delima (*Punica granatum*).

2. Variabel terikat :

Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada media MSA yang ditandai dengan tumbuhnya koloni berwarna kuning emas serta media yang berubah menjadi warna kuning dengan menggunakan metode dilusi cair.

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 perasan daun delima(*Punica granatum*) menggunakan metode dilusi. Dengan langkah-langkah pemeriksaan sebagai berikut:

3.5.1 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, Erlenmeyer, ose, filler, cawan Petri, tabung *centrifuge*, *autoclave*, plate, pipet ukur, mikropipet, *yellow tip* dan LAF (Laminar air Flow).

Sedangkan bahan yang di gunakan yakni perasan daun delima dengan konsentrasi 100% suspensi kuman *Staphylococcus aureus*, kertas PH, kertas saring, media MSA, NaCl Broth, larutan H₂SO₄, larutan BaCl 1%.

3.5.2 Prosedur Penelitian

A. Pembuatan suspensi kuman

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

1. Menyiapkan 2 tabung steril, 1 untuk suspensi dan yang 1 untuk standart Mac Farland.
2. Membuat standart Mac Farland:
 - a. Menyiapkan campuran antara BaCl 1% : H₂SO₄, 1 yaitu dengan perbandingan 0,05ml : 9,095ml atau 1: 199
 - b. Memipet BaCl 1% 0,05 ml kemudian pipet H₂SO₄, 9,95 ml lalu di homogenkan.
 - c. Standart Mac Farland 0,5 ini tiap 1 ml nya mengandung 150 juta kuman. (Soemarno, 2006)
3. Membuat suspensi kuman
 - a. Mengisi NaCl Broth 5 ml kedalam tabung steril.

- b. Mengambil biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus* yang sudah ditanam di media NAS dengan ose bulat yang steril dimasukkan kedalam NaCl Broth.
- c. Kemudian homogenkan pelan-pelan.
- d. Diinkubasi 1x24 jam pada suhu 37°C
- e. Membandingkan warna suspensi kuman dengan standart Mac Farland 0,5.
- f. Apabila warna kurang keruh, maka tambahkan suspensi kuman lagi hingga warna benar-benar keruh seperti standart Mac Farland.

B. Pembuatan Perasan Daun Delima(*Punica granatum L*)

Pengambilan daun delima dilakukan secara acak dengan kriteria yaitu daun tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda dengan warna hijau tua

Pembuatan Perasan Daun Delima(*Punica granatum L*) dengan cara sebagai berikut:

1. Menyiapkan daun delima yang masih segar
2. Menimbang daun delima sebanyak 10gr
3. Dihaluskan daun delima dengan menggunakan mortar terlebih dahulu kemudian diblender
4. Disaring sampai benar-benar jernih
5. Diambil satu mata ose perasan yang sudah jernih secara steril, kemudian menanam ke media NAS, dengan cara menggoreskannya di permukaan media.
6. Di inkubasi selama 24 jam 37°C

3.5.3 Prosedur Pemeriksaan Pertumbuhan *S. aureus* Pada Perasan Daun

Delima (*Punica granatum*)

Prosedur pemeriksaan sampel adalah Sebagai berikut:

Hari Pertama :

1. Menyiapkan alat dan bahan yang di gunakan.
2. Menyalakan api sepirtus dengan korek api
3. Memanaskan ose bulat diatas yang sudah dinyalakan.
4. Mengambil suspense kuman murni *Staphylococcus aureus* sebanyak 3 kali melalui dinding tabung.
5. Kemudian membiakkannya 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. Mengamati tabung, apakah terjadi kekeruhan apa tidak.
2. Mengambil dari masing-masing tabung dengan ose kemudian tanam 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. Menggoreskan ose pada media MSA (*Manitol Salt agar*) dengan metode Y.
5. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Hari Ketiga

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

3.5.5 Tabulasi Data

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

Table 3.1 Pengaruh perasan daun delima terhadap penghambatan bakteri *Staphylococcus aureus*.

No	Pengulangan	Jumlah koloni bakteri pada perasan daun delima (<i>Punica granatum L</i>)	
		0% (O)	100% (P)
1	1		
2	2		
3	3		
4	4		
5	5		
6	6		
7	7		
8	8		
9	9		
10	10		
11	11		
12	12		
13	13		
14	14		
15	15		
16	16		

Keterangan

P : Perlakuan

O : Kontrol

3.6 Analisis Data

Datapertumbuhan bakteri dianalisis dengan uji normalitas kemudian lanjut uji homogenitas setelah itu di lanjut lagi dengan uji ANOVA oneway dengan nilai 0,05. Maka data dapat diketahui dengan menggunakan uji ANOVA oneway jika memenuhi syarat sebagai berikut :

1. Data berdistribusi normal (uji normalitas).
2. Data memiliki varians yang sama (uji homogenitas).
3. Data dari sampel independent

