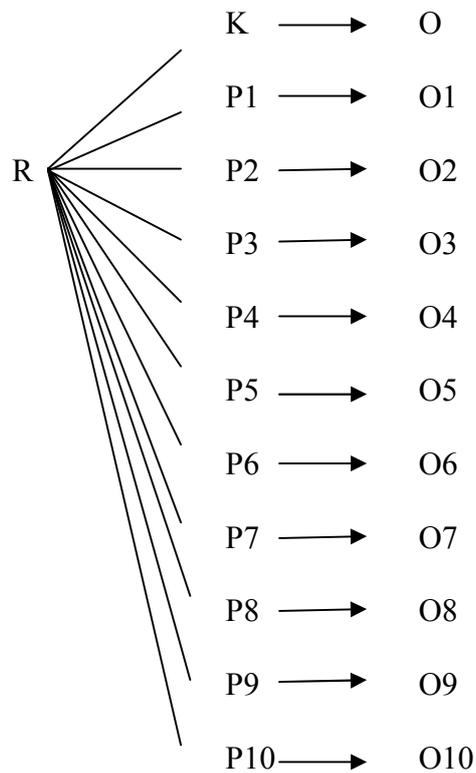


**BAB 3**  
**METODE PENELITIAN**

**3.1 Jenis penelitian**

Jenis penelitian ini menggunakan rancangan penelitian eksperimental laboratorium dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi rebusan daun nanas kerang terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*, dengan rancangan penelitian sebagai berikut:



Gambar 3.1 : Rancangan penelitian (Soekidjo, 2005).

Keterangan:

R : Random

K : Perlakuan yang tidak diberi rebusandaun nanas kerang

- P1 : Perlakuan konsentrasi rebusandaun nanas kerang 100%
- P2 : Perlakuan konsentrasi rebusandaun nanas kerang 50%
- P3 : Perlakuan konsentrasi rebusandaun nanas kerang 25%
- P4 : Perlakuan konsentrasi rebusandaun nanas kerang 12,5%
- P5 : Perlakuan konsentrasi rebusandaun nanas kerang 6,25%
- P6 : Perlakuan konsentrasi rebusandaun nanas kerang 3,125%
- P7 : Perlakuan konsentrasi rebusandaun nanas kerang 1,562%
- P8 : Perlakuan konsentrasi rebusandaun nanas kerang 0,781%
- P9 : Perlakuan konsentrasi rebusandaun nanas kerang 0,390%
- P10 : Perlakuan konsentrasi rebusandaun nanas kerang 0,195%
- O : Observasi setelah perlakuan control
- O1 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 100%
- O2 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 50%
- O3 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 25%
- O4 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 12,5%
- O5 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 6,25%
- O6 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 3,125%
- O7 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 1,562%
- O8 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 0,781%
- O9 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 0,390%
- O10 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 0,195%

## 3.2 Populasi dan Sampel

### 3.2.1 Populasi

Bakteri *Shigella dysenteriae* yang ditumbuhkan berasal dari biakan murni yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran kampus A Universitas Airlangga Surabaya.

### 3.2.2 Sampel

Dalam penelitian sampel yang diambil adalah bakteri *Shigella dysenteriae* yang ditumbuhkan berasal dari biakan murni yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran kampus A Universitas Airlangga Surabaya, sedangkan jumlah pengulangan sampelnya diperoleh dari rumus sebagai berikut:

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

$$(n-1)(11-1) \geq 15$$

$$(n-1)(10) \geq 15$$

$$10n - 10 \geq 15$$

$$10n \geq 15 + 10$$

$$10n \geq 25$$

$$n \geq 25 : 10$$

$$n \geq 2,5$$

$$n \sim 3 \quad (\text{Hidayat, 2010}).$$

Keterangan:

n : Jumlah pengulangan

k : Perlakuan

Jadi jumlah pengulangan sebanyak 3 kali

### **3.3 Lokasi dan Waktu penelitian**

#### **3.3.1 Lokasi Penelitian**

Lokasi penelitian dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

#### **3.3.2 Waktu Penelitian**

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan November 2013 sampai bulan Juli 2014. Sedangkan waktu pemeriksaan dilakukan pada bulan Mei 2014.

### **3.4 Variabel dan Definisi Oprasional**

#### **3.4.1 Variabel Penelitian**

Variabel bebas : Konsentrasi rebusandaun nanas kerang

Variabel terikat : Pertumbuhan *Shigella dysenteriae*.

Variabel control : Lama inkubasi, suhu.

#### **3.4.2. Definisi Oprasional**

1. Konsentrasi rebusan daun nanas kerang dikategorikan menjadi berbagai macam konsentrasi, yaitu: 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,562%, 0,781%, 0,390%, 0,195%, dan 0% (kontrol).
2. Pertumbuhan *Shigella dysenteriae* ditetapkan berdasarkan kekeruhan atau kejernihan rebusan daun nanas kerang yang terdapat pada masing- masing konsentrasi setelah diinkubasi selama 24 jam 37°C. Pertumbuhan dikategorikan menjadi tumbuh dan tidak tumbuh. Untuk melihat adtidaknya pertumbuhan bakteri perlu dilakukan pemeriksaan yaitu dengan cara menanam pada media Mac Conkey( MC). Yang dimaksud

tumbuh adalah jika melalui penanaman pada media Triple Sugar Iron Agar menunjukkan bahwa lereng dari media Triple Sugar Iron Agar bersifat alkali (berwarna merah) dan dasar dari media Triple Sugar Iron Agar bersifat acid (berwarna kuning).

### 3.5 Metode Pengumpulan Data

Data pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* diperoleh melalui uji Laboratorium. Langkah-langkah pemeriksaannya diantaranya sebagai berikut :

#### 3.5.1. Alat- alat

Alat yang digunakan dalam pemeriksaan ini adalah sebagai berikut :

- |                    |                              |
|--------------------|------------------------------|
| 1. Timbangan       | 9. Gelas arloji              |
| 2. Tabung reaksi   | 10. Gelas ukur               |
| 3. Pengaduk        | 11. Rak tabung               |
| 4. Pipet pasteur   | 12. Api spiritus + kaki tiga |
| 5. Mortar + mortir | 13. Filler                   |
| 6. Erlenmeyer      | 14. Ose                      |
| 7. Autoclave       | 15. Plate                    |
| 8. Pipet pasteur   | 16. Tabung sentrifuge        |

#### 3.5.2. Bahan Pemeriksaan

Bahan yang digunakan dalam pemeriksaan ini adalah sebagai berikut :

1. Rebusannanas kerang
2. Suspensi kuman *Shigella dysenteriae*
3. Aquades steril

4. Media Nutrient Agar

5. Pz steril

### 3.5.3.Reagen Pemeriksaan

1. NaOH 0.1 N

2. HCL 0.1 N

### 3.5.4. Pembuatan suspensi kuman *Shigella dysenteriae*

Pembuatan suspensi kuman sesuai dengan metode Mc.Farlan 0,5:

1. Disiapkan 2 tabung steril, 1 untuk suspensi dan yang 1 untuk standart Mc Farlan 0,5.
2. Prosedur membuat standart Mc Farlan 0,5, yaitu:
  - a. Dibuat perbandingan antara BaCl 1% : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 % sebesar 1 : 9
  - b. Dipipet 0,05 ml BaCl 1 % + 9,95 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 %
  - c. Dihomogenkan dengan cara kocok pelan tabung

Standart Mc Farlan 0,5 ini sama dengan tiap 0,5 ml nya mengandung 150 juta kuman.

3. Prosedur membuat suspensi kuman, yaitu:

Dalam biakan murni bakteri *Shigella dysenteriae* diambil dengan ose bulat, kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi berisi PZ (Nacl 0,85%-0,9%) yang steril, homogenkan dan bandingkan dengan standart Mc Farlan 0,5. Bila didapatkan kekeruhan suspensi bakteri *Shigella dysenteriae* yang melebihi standart Mc Farlan 0,5 maka tambahkan PZ steril, apabila kekeruhan yang ditimbulkan masih kurang dari standart Mc Farlan 0,5 maka tambahkan dengan kultur murni bakteri *Shigella dysenteriae*. Lakukan hal tersebut sampai didapatkan suspensi bakteri *Shigella dysenteriae* yang sesuai dengan standart Mc Farlan 0,5.

Menstandartkan ose yang akan dipakai dalam penelitian:

1. Disiapkan pipet 0.1 ml dan filter serta tabung.
2. Dipipet aquadest 0.1 ml, kemudian menuangnya kedalam tabung.
3. Dinyalakan api spirtus.
4. Diambil 1 mata ose air yang sudah dituang kedalam tabung dan kemudian memanaskan ose tersebut di atas api spirtus, lakukan berulang- ulang sampai air dalam tabung habis.

### **3.5.5.Prosedure Pembuatan media NAP**

1. Dilakukan perhitungan media Nutrient Agar (NA)

Membuat NAP 5 plate, @ plate  $\pm$  17 ml

$$\text{Komposisi NA 20 gr per 1 liter} \rightarrow \frac{20 \text{ gr} \times 85 \text{ ml}}{1000} = 1.7 \text{ gr}$$

2. Disiapkan alat dan bahan yang digunakan
3. Ditimbang bahan media Nutrient Agar sesuai dengan perhitungan menggunakan timbangan
4. Diukur volume aquadest 85 ml menggunakan gelas ukur
5. Dilarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest yang sudah diukur volumenya dalam erlenmeyer
6. Dipanaskan larutan diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih
7. Diangkat larutan yang sudah dipanaskan dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam – suam kuku

8. Diukur 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. Ditutup erlenmeyer dengan kapas berlemak dan menyeterilkannya dengan autoclave pada suhu 121 atm selama 15 menit
10. Setelah turun dari autoclave, menuangkannya ke dalam plate yang steril sampai rata
11. Didiamkannya sampai terlihat padat dan menyimpannya ke almari es (Sumarsono, 1996).

#### **3.5.6. Uji sterilitas konsentrasi Rebusan Daun Nanas Kerang**

Teknik pembuatan konsentrasi rebusan daun nanas kerang yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Daun nanas kerang ditimbang 100 gram atau mengambil sejumlah daun nanas kerang sesuai dengan volume perasan yang dibutuhkan.
2. Daun nanas kerang di cuci bersih, kemudian di bilas dengan aquadest steril.
3. Dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 ml dan tambahkan 100 ml aquadest.
4. Erlenmeyer ditutup dengan kapas kasa lalu letakkan erlenmeyer di atas hotplate dan di ukur suhunya dengan termometer.
5. Ditunggu selama 15 menit dan pertahankan pada suhu 90° C.
6. Disaring daun nanas kerang yang sudah direbus tadi dengan kasa berlapis yang steril. Disaring sampai benar-benar jernih.
7. Disentrifuge kembali perasan tadi ditabung sentrifuge yang steril sehingga didapatkan rebusan yang benar-benar jernih.

8. Diambil 1 mata ose rebusan yang sudah jernih secara steril, kemudian menanamnya ke media NAP, dengan cara menggoreskannya dipermukaan media.
9. Inkubasi selama 24 jam 37° C.
10. Diamati hasilnya, jika tidak terjadi pertumbuhan kuman berarti rebusan daun nanas kerang tadi sudah benar – benar steril. Namun jika pada media NAP terdapat pertumbuhan kuman berarti perlu dilakukan proses tindalisasi, yaitu:
  - a. Dipanaskan rebusan daun nanas kerang dengan waterbath pada suhu 90° C selama 15 menit
  - b. Kemudian meletakkannya di inkubator selama 24 jam pada suhu 37° C
  - c. Diulangi perlakuan tersebut sampai 3 kali
  - d. Ditanam kembali rebusan daun nanas kerang yang sudah melalui proses tindalisasi di media NAP dan menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37° C.

#### **3.5.7. Prosedur pembuatan konsentrasi rebusandaun nanas kerang**

- |                  |  |
|------------------|--|
| Konsentrasi 100% | :Tabung 1 diisi 1 ml perasan awal, itu sebagai konsentrasi 100%                                      |
| Konsentrasi 50%  | :Tabung 2 diisi 1 ml perasan awal, ditambahkan 1 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.                 |
| Konsentrasi 25%  | :Tabung 3 diisi 1 ml yang berasal konsentrasi 50%, ditambahkan 1 ml Pz steril kemudian dihomogenkan. |

Konsentrasi 12,5%	:Tabung 4 diisi 1 ml yang berasal konsentrasi 25%, ditambahkan 1 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
Konsentrasi 6,25%	:Tabung 5 diisi 1 ml yang berasal konsentrasi 12,5%, ditambahkan 1 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
Konsentrasi 3,125%	:Tabung 6 diisi 1 ml yang berasal konsentrasi 6,25%, ditambahkan 1 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
Konsentrasi 1,562%	:Tabung 7 diisi 1 ml yang berasal konsentrasi 3,125%, ditambahkan 1 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
Konsentrasi 0,781%	:Tabung 8 diisi 1 ml yang berasal konsentrasi 1,562%, ditambahkan 1 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
Konsentrasi 0,390%	:Tabung 9 diisi 1 ml yang berasal konsentrasi 0,781%, ditambahkan 1 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
Konsentrasi 0,195%	:Tabung 10 diisi 1 ml yang berasal konsentrasi 0,390%, ditambahkan 1 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
Konsentrasi 0%	:Pada tabung 11 diisi 1 ml Pz steril tanpa diberi tambahan perasan daun sirih.

### **3.5.8. Prosedure pembuatan media MC (Mac Conkey)**

1. Disiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
2. Dilakukan perhitungan terhadap jumlah bahan media MC yang dibutuhkan  
Membuat MC15 plate, @ plate 17 ml  
Komposisi MC50 gr per 1 liter  $\longrightarrow \frac{50\text{gr} \times 225\text{ ml}}{1000\text{ ml}} = 12,75\text{ gr}$
3. Dilakukan penimbangan bahan sesuai dengan yang diperlukan menggunakan timbangan
4. Diukur volume aquadest yang di butuhkan yaitu sebanyak 225 ml dengan gelas ukur
5. Dilarutkan bahan yang sudah ditimbang tadi dengan aquadest yang sudah diukur volumenya ke dalam erlenmeyer
6. Dipanaskannya diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih
7. Diangkat larutan yang sudah larut sempurna dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam – suam kuku
8. Diukur pH nya dengan cara menambahkan NaOH 0.1 N jika terlalu asam dan menambahkan HCL 0.1 N jika terlalu basa sampai pH nya 6,9 – 7,3
9. Ditutup larutan yang ada di erlenmeyer dengan kapas berlemak dan koran serta mengikatnya. Kemudian larutan tersebut disterilisasi bersama dengan plate yang dibutuhkan di autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit
10. Setelah turun dari autoclave, menuangkannya ke dalam plate yang steril sampai rata
11. Dituang larutan tadi ke dalam plate. Masing – masing plate  $\pm$  17 ml secara steril dekat dengan api (Sumarsono, 1996).

### 3.5.9. Prosedur Pemeriksaan Sampel

#### Hari pertama pemeriksaan :

1. Disiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
2. Dinyalakan api spirtus dengan korek api.
3. Dilabeli masing-masing tabung sesuai dengan konsentrasinya, yaitu konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,562%, 0,781%, 0,390%, 0,195% dan 0% atau C (Control).
4. Dipanaskan ose bulat diatas nyala api spirtus, mengambil suspensi kuman *Shigella dysenteriae* sebanyak 1 mata ose dan membiakkannya di tabung berlabel 100% dengan cara menggesekkan ose didinding permukaan media cair sebanyak 3 kali. Kemudian mengambil lagi 1 mata ose kuman *Staphylococcus aureus* pada suspensi kuman dan membiakkannya pada tabung berlabel 50%, begitu seterusnya sampai pada tabung Control. Semua perlakuan dilakukan secara steril dekat dengan api.
5. Ditutup kembali tabung dengan kapas berlemak
6. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

#### Hari kedua :

1. Diamati masing-masing tabung, apakah terjadi kekeruhan atau tidak.
2. Diambil Konsentrasi terkecil yang mulai terlihat keruh, dan menguji kembali ke media padat (MC) dengan tujuan memastikan apakah kuman tersebut adalah *Shigella dysenteriae*.
3. Dipanaskan ose bulat diatas nyala api spirtus, mengambil 1 mata ose kuman yang ada pada konsentrasi terkecil tadi.
4. Ditanam di media padat dengan cara menggoreskannya dipermukaan media.



Jumlah											
--------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**Dengan keterangan :**

Positif (+) : Mampu menghambat pertumbuhan kuman (jernih)

Negatif (-) : Tidak mampu menghambat pertumbuhan kuman (keruh)

**3.6 Metode Analisis Data**

Data yang diperoleh dari uji laboratorium kemudian ditabulasi selanjutnya data diuji menggunakan uji chi – square dengan tingkat kesalahan 5% (0,05).