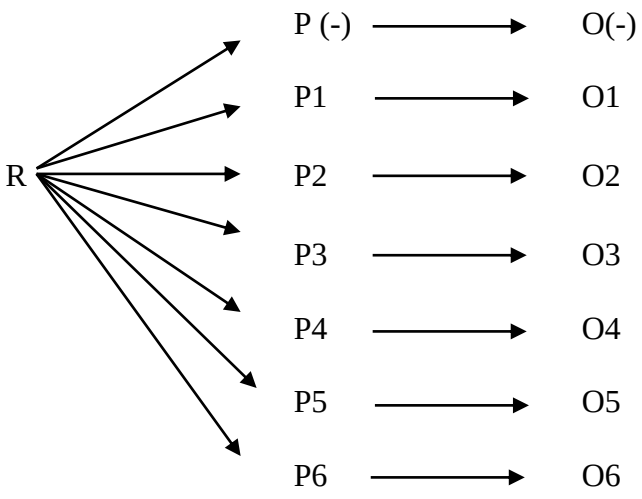
BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian perasan akar bayam duri *(Amaranthus spinosus* Linn) terhadap *Shigella dysenteriae* dengan rancangan penelitian sebagai berikut :



Gambar 3.1 Rancangan Penelitian (Zainudin, 2006)

Keterangan :

R : Randomisasi / acak

P(-) : Kontrol (tanpa perlakuan)

P1 : Perlakuan pemberian perasan akar bayam duri dengan konsentrasi 50%

P2 : Perlakuan pemberian perasan akar bayam duri dengan konsentrasi 60%

P3 : Perlakuan pemberian perasan akar bayam duri dengan konsentrasi 70%

P4 : Perlakuan pemberian perasan akar bayam duri dengan konsentrasi 80%

P5 : Perlakuan pemberian perasan akar bayam duri dengan konsentrasi 90%

P6 : Perlakuan pemberian perasan akar bayam duri dengan konsentrasi 100%

O(-) : Observasi setelah perlakuan tanpa pemberian perasan akar bayam duri

O1 : Observasi setelah perlakuan pemberian perasan akar bayam duri dengan konsentrasi 50%

O2 : Observasi setelah perlakuan pemberian perasan akar bayam duri dengan konsentrasi 60%

O3 : Observasi setelah perlakuan pemberian perasan akar bayam duri dengan konsentrasi 70%

O4 : Observasi setelah perlakuan pemberian perasan akar bayam duri dengan konsentrasi 80%

O5 : Observasi setelah perlakuan pemberian perasan akar bayam duri dengan konsentrsi 90%

O6 : Observasi setelah perlakuan pemberian perasan akar bayam duri dengan konsentrasi 100%

3.2 Populasi Sampel dan Sampling

3.2.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri *Shigella dysenteriae* yang diambil dari Laboratorium Kedokteran Universitas Airlangga Kampus A Surabaya.

3.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah perasan akar bayam duri yang dibuat berbagai konsentrasi. Setiap konsentrasi terdiri dari pengulangan, yang diperoleh dari rumus sebagai berikut :

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

$(n-1)\ (7-1) \geq 15$

$(n-1)\ \ 6 \geq 15$

$6n-6 \geq 15$

$6n \geq 21$

$n \geq 3.5 \sim 4$

(Sumber : Zainudin, 2006)

Keterangan :

n : Jumlah pengulangan

r : Jumlah kelompok (perlakuan)

Jadi, jumlah pengulangan sampel setiap perlakuan adalah 4 kali.

3.2.3 Teknik Sampling

Teknik sampling yang digunakan dalam penelitian ini yaitu secara random atau acak.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah konsentrasi perasan akar bayam duri (*Amaranthus spinosus* Linn).

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah pertumbuhan *Shigella dysenteriae.*

3.3.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol dari penelitian ini adalah suhu penyimpanan, waktu inkubasi, jumlah suspensi kuman, volume konsentrasi perasan.

3.4 Definisi Operasional

1. Perasan akar bayam duri dikategorikan menjadi berbagai konsentrasi yaitu :konsentrasi 0% (sebagai kontrol), 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100%
2. Pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* dilihat pada media *Mac Conkey* pada masing - masing konsentrasi dalam bentuk perhitungan jumlah bakteri
3. Suhu inkubasi adalah 37° C, waktu inkubasi 24 jam, jumlah suspensi kuman masing – masing satu mata ose, dan volume perasan di setiap konsentrasi sebanyak 1 ml**.**

3.5 Pengumpulan dan Pengolahan Data

3.5.1 Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian ini diperoleh dengan cara observasi langsung, yaitu melalui uji laboratorium dengan metode dilusi.

3.5.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.5.2.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.5.2.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2015 sampai dengan bulan Juni 2016. Sedangkan waktu pemeriksaan dilaksanakan pada bulan April 2016.

3.5.3 Prosedur Pengumpulan Data

3.5.3.1 Prinsip pemeriksaan

Senyawa antibakteri dimasukkan ke dalam salah satu tabung dengan berbagai konsentrasi. Perlakuan tersebut akan diinkubasi dan diamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri. Larutan uji senyawa antibakteri pada konsentrasi terkecil tanpa adanya pertumbuhan bakteri uji ditetapkan sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM) (Pratiwi, 2008).

3.5.3.2 Alat dan Bahan yang Digunakan

3.5.3.2.1 Alat – alat

Timbangan, Beaker Glass, Erlenmeyer, Petridish, Corong, Api Spirtus, Ose Bulat, Kaki Tiga, Pipet Ukur, Kassa Asbes, Gelas Ukur, Gelas Arloji, Pipet Pasteur, Pushball, Inkubator, Oven, Spatula, Lidi Kapas, dan Autoclave.

3.5.3.2.2 Bahan

Akar Bayam Duri, Suspensi kuman *Shigella dysenteriae.*

3.5.3.2.3 Reagen dan Media

Nutrien Agar (NA), *Mac Conkey* (MC), $BaCl_2$ 1%, H_2SO_4 1%, NaOH, HCL, Aquades steril, dan PZ steril.

3.5.3.3 Prosedur Pembuatan Suspensi Kuman

Pembuatan Suspensi Kuman *Shigella dysenteriae* dengan metode Mc.Farland 1, yaitu :

1. Menyiapkan 2 tabung steril, 1 untuk standart Mac Farland dan tabung 2 untuk suspensi kuman
2. Prosedur pembuatan standart Mc.Farland 1 yaitu :
    a. Membuat campuran $BaCl_2$ 1% dan H_2SO_4 1% dengan perbandingan 1:90
    b. Memipet 0,1 ml $BaCl_2$ 1% ditambahkan 9,9 ml H_2SO_4 1%
    c. Menghomogenkan dengan cara mengocok pelan tabung standart Mac Farland 1. Kekeruhan sama dengan 1 ml suspensi mengandung $3x10^8$ kuman
3. Prosedur membuat suspensi kuman, yaitu :
    a. Mengisi tabung steril dengan PZ steril ±5ml
    b. Mengambil kuman dari biakan *Shigella dysenteriae* dengan ose bulat
    c. Menyelupkan ose bulat yang sudah ada kumannya pada tabung yang berisi PZ steril
    d. Membandingkan kekeruhan suspensi kuman dengan Mc.Farland 1
    e. Apabila suspensi kurang keruh, maka tambahkan kuman, dan apabila terlalu keruh tambahkan PZ steril hingga kekeruhannya samadengan standart Mc.Farland 1
4. Mensetarakan ose yang akan digunakanuntuk penelitian, caranya adalah :
    a. Menyiapkan pipet 1ml dan tabung reaksi
    b. Memipet 0,1ml aquades lalu masukkan kedalam tabung
    c. Menyalakan api spirtus

d. Mengambil 1 mata ose aquades yang sudah dimasukkan kedalam tabung dan memanaskan ose diatas api spirtus. Dilakukan berulang kali hingga aquades dalam tabung habis
e. Didapatkan 45 mata ose aquades steril tersebut habis (perhitungan terlampir)

3.5.3.4 Prosedur Pembuatan Media *Nutrient Agar* Plate (NAP)

1. Melakukan perhitungan media *Nutrien Agar* (NA)

   Membuat NA 5 plate @ plate ± 15-20 ml

   Komposisi NA 20 gr per 1 Liter ⟶ $\frac{20\ gram}{1000\ ml}\ x\ 100\ ml = 2\ gr$

2. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
3. Menimbang media NA sesuai dengan perhitungan
4. Mengukur volume aquades sebanyak 100 ml menggunakan gelas ukur
5. Melarutkan media yang sudah ditimbang dengan aquades yang sudah diukur volumenya kedalam erlenmeyer
6. Memanaskan larutan tersebut diatas api spirtus sampai larut sempurna dan jangan sampai mendidih
7. Mengangkat larutan yang sudah dipanaskan dan letakkan di baskom berisi airhingga suam-suam kuku
8. Mengukur pH media yaitu 7,4. Jika terlalu asam tambahkan dengan NaOH, sedangkan jika terlalu basa tambahkan dengan HCl hingga pH 7,4
9. Menutup erlenmeyer dengan kapas berlemak dan mensterilkan dengan autoclave pada suhu 121^{o}C selama 15menit
10. Setelah keluar dari autoclave, lalu dituangkan ke dalam plate steril
11. Mendiamkan media sampai terlihat padat dan simpan ke dalam almari es

3.5.3.5 Prosedur Pembuatan Media*Mac Conkey* (MC)

1. Melakukan perhitungan media *Mac Conkey* (MC)

   Membuat MC 28 plate @ plate ± 15-20 ml

   Komposisi MC 108 gr per 1 Liter → $\frac{108\ gr}{1000\ ml}\ x\ 560\ ml$ = 60,5 gr
2. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
3. Menimbang media MC sesuai dengan perhitungan yaitu 60,5 gr menggunakan timbangan
4. Mengukur volume aquades sebanyak 560 ml menggunakan gelas ukur
5. Melarutkan media yang sudah ditimbang dengan aquades yang sudah diukur volumenya kedalam erlenmeyer
6. Memanaskan larutan tersebut diatas api spirtus sampai larut sempurna dan jangan sampai mendidih
7. Mengangkat larutan yang sudah dipanaskan dan letakkan di baskom berisi air hingga suam-suam kuku
8. Mengukur pH media yaitu7,2-7,4. Jika terlalu asam tambahkan dengan NaOH, sedangkan jika terlalu basa tambahkan dengan HCl hingga pH 7,4
9. Menutup erlenmeyer dengan kapas berlemak dan mensterilkan dengan autoclave pada suhu 121^{o}C selama 15menit
10. Setelah keluar dari autoclave, lalu dituangkan ke dalam plate steril
11. Mendiamkan media sampai terlihat padat dan simpan ke dalam almari es

3.5.3.6 Prosedur Pembuatan Konsentrasi Perasan Akar Bayam Duri

1. Mencabut akar bayam duri dari tanah
2. Menimbang akar bayam duri sebanyak 100 gr
3. Mencuci akar bayam duri hingga bersih lalu mencuci dengan aquades steril

4. Menumbuk akar bayam duri sampai benar-benar halus
5. Menyaring akar bayam duri yang sudah ditumbuk tadi dengan kasa berlapis yang steril dan saring sampai benar-benar bersih
6. Mengambil satu mata ose perasan yang sudah jernih tadi, kemudian menanamnya pada media NAP dengan cara menggoreskan pada media tersebut
7. Inkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam
8. Mengamati hasil. Jika tidak terjadi pertumbuhan kuman pada media, perasan tersebut benar-benar steril. Namun jika terjadi pertumbuhan kuman pada media perlu dilakukan tindalisasi, yaitu :
    a. Memanaskan perasan akar bayam duri dengan waterbath pada suhu 90^{o}C selama 15menit
    b. Meletakan perasan tersebutpada inkubator pada suhu 37^{o}Cselama 24jam
    c. Mengulangi perlakuan tersebut selama 3 kali
9. Menanam kembali perasan akar bayam duri yang sudah ditindalisasi di media NAP dan menginkubasi pada suhu 37^{o}C selama 24 jam
10. Membuat konsentrasi 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, dan kontrol dengan PZ steril, yaitu :

    Konsentrasi 100% : Tabung 1 diisi 1 ml perasan akar bayam duri

    Konsentrasi 90% : Tabung 2 diisi 0,1 ml PZ steril ditambah perasan akar bayam duri sebanyak 0,9 ml perasan dari konsentrasi 100% kemudian homogenkan

Konsentrasi 80% : Tabung 3 diisi 0,2 ml PZ steril ditambah perasan akar bayam dur isebanya 0,8 ml perasan dari konsentrasi 100% kemudian homogenkan

Konsentrasi 70% : Tabung 4 diisi 0,3 ml PZ steril ditambah perasan akar bayam duri sebanyak 0,7 ml perasan dari konsentrasi 100% kemudian homogenkan

Konsentrasi 60% : Tabung 5 diisi 0,4 ml PZ steril ditambah perasan akar bayam duri duri sebanyak 0,6ml perasan dari konsentrasi 100% kemudian homogenkan

Konsentrasi 50% : Tabung 6 diisi 0,5 ml PZ steril ditambah perasan akar bayam duri duri sebanyak 0,5ml perasan dari konsentrasi 100% dan homogenkan

Kontrol (0%) : Tabung 7 diisi 1 ml PZ steril

3.5.3.7 Prosedur Pemeriksaan Sampel

A. Hari pertama:

a. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
b. Menyalakan api spirtus dengan korek api
c. Memberi label masing-masing tabung sesuai dengan konsentrasinya, yaitu konsentrasi 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50% dan 0%(kontrol)
d. Memanaskan ose bulat diatas api spirtus sampai membara dan
e. Mengambil suspensi kuman *Shigella dysenteriae* sebanyak 1 mata ose dan masukkan kedalam tabung yang berisi perasan konsentrasi 100% dengan cara menggesekkan ose ke dinding permukaan media cair sebanyak 3-5 kali

f. Melewatkan mulut tabung pada nyala api dan menutup tabung dengan kapas berlemak

g. Melakukan prosedur diatas pada semua konsentrasi

h. Menginkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam

B. Hari kedua :

a. Mengamati masing-masing tabung, apakah terjadi kekeruhan atau tidak

b. Mengamati konsentrasi terkecil yang mulai terlihat keruh dan menguji kembali ke media padat MC dengan tujuan untuk memastikan apakah kuman tersebut adalah *Shigella dysenteriae*

c. Memanaskan ose bulat diatas nyala api spirtus, mengambil 1 mata ose kuman yang ada pada konsentrasi terkecil tadi

d. Menanamnya pada media MC dengan cara menggoreskannya di permukaan media

e. Inkubasi pada suhu 37^{o}C selama 24jam

C. Hari ketiga :

a. Mengamati hasilnya pada media padat apakah terbentuk koloni yang mengidentifikasikan kuman tersebut adalah *Shigella dysenteriae*

b. Mencatat konsentrasi terkecil tadi sebagai daya hambat pertumbuhan kuman *Shigella dysenteriae*

c. Menghitung jumlah koloni dan mencatat hasilnya sebagai data

3.5.4 Cara Analisis Data

3.5.4.1 Tabulasi Data

Data yang diperoleh ditabulasikan sebagai berikut :

Tabel 3.1 Tabel Hasil PemeriksaanPertumbuhan *Shigella dysenteriae* pada perasan akar bayam duri (*Amaranthus spinosus* Linn)

No.	Kode Sampel	Jumlah koloni yang tumbuh pada media *Mac Conkey* (MC)						
		100%	90%	80%	70%	60%	50%	0%
1.	A1							
2.	A2							
3.	A3							
4.	A4							
Jumlah								
Rata-rata								
SD								

Keterangan :

A1 : Pengulangan kesatu

A2 : Pengulangan kedua

A3 : Pengulangan ketiga

A4 :Pengulangan keempat

3.5.4.2 Metode Analisis Data

Data yang diperoleh diuji menggunakan uji *Anova* dengan tingkat kesalahan 5% (0,05).