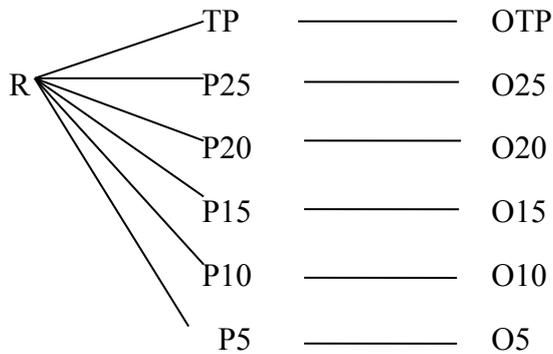


**BAB 3**  
**METODE PENELITIAN**

**3.1 Rancangan Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui uji efektivitas pemberian perasan daun lamtoro (*leucaena leucocephala* (lam.) de wit.) terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* dengan rancangan penelitian sebagai berikut :



**Gambar 3.1 : Rancangan Penelitian (Zainudin, 2006)**

Keterangan :

R : random/acak

TP : Perlakuan tanpa pemberian perasan daun lamtoro/kontrol

P25 : Perlakuan dengan pemberian perasan daun lamtoro konsentrasi 25%

P20 : Perlakuan dengan pemberian perasan daun lamtoro konsentrasi 20%

P15 : Perlakuan dengan pemberian perasan daun lamtoro konsentrasi 15%

P10 : Perlakuan dengan pemberian perasan daun lamtoro konsentrasi 10%

P5 : Perlakuan dengan pemberian perasan daun lamtoro konsentrasi 5%

OTP :Observasi pertumbuhan *Shigella dysenteriae* pada perlakuan tanpa pemberian perasan daun lamtoro

O25: Observasi pertumbuhan *Shigella dysenteriae* pada perlakuan dengan pemberian perasan daun lamtoro konsentrasi 25%

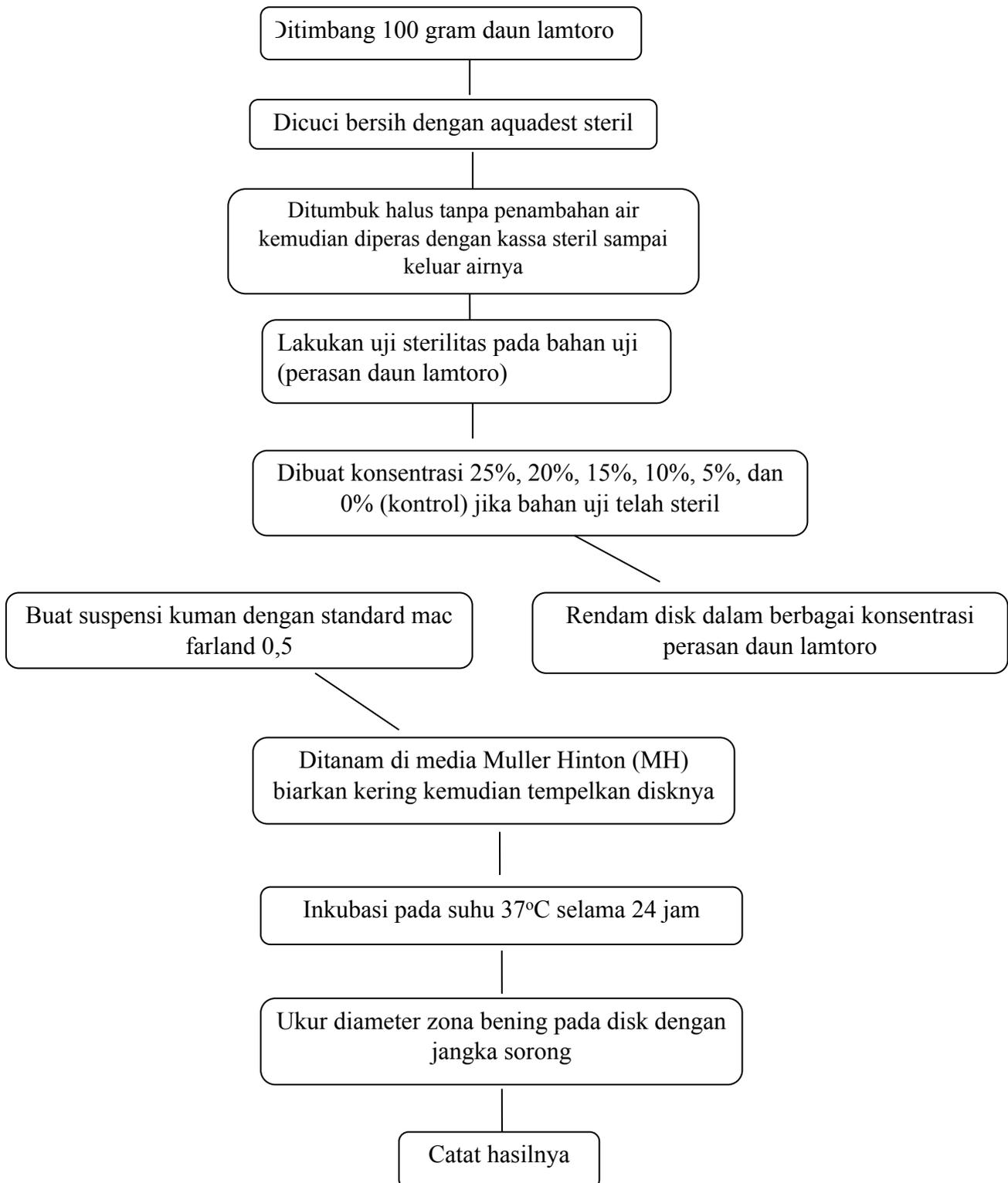
O20: Observasi pertumbuhan *Shigella dysenteriae* pada perlakuan dengan pemberian perasan daun lamtoro konsentrasi 20%

O15 : Observasi pertumbuhan *Shigella dysenteriae* pada perlakuan dengan pemberian perasan daun lamtoro konsentrasi 15%

O10 : Observasi pertumbuhan *Shigella dysenteriae* pada perlakuan dengan pemberian perasan daun lamtoro konsentrasi 10%

O5 : Observasi pertumbuhan *Shigella dysenteriae* pada perlakuan dengan pemberian perasan daun lamtoro konsentrasi 5%

### 3.2 Kerangka Kerja



**Gambar 3.2 : Kerangka kerja penelitian (Waluyo, 2008)**

### 3.3 Populasi dan Sampel

#### 3.3.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah daun lamtoro yang diperoleh dari halaman sekitar rumah dengan pekarangan yang cukup luas.

#### 3.3.2 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah perasan daun lamtoro dengan berbagai konsentrasi, sedangkan jumlah pengulangan sampelnya diperoleh dari rumus sebagai berikut :

$$(R-1) (T-1) \leq 15$$

$$(R-1) (6-1) \leq 15$$

$$5R - 5 \leq 15$$

$$5R \geq 20$$

$$R \geq 4$$

(Hidayat, 2010)

Keterangan :

R : Jumlah Sampel

T : Perlakuan

#### 3.3.3 Teknik Sampling

Data yang diperoleh dilakukan dengan teknik sampling secara random atau acak.

### 3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel bebas : Pemberian perasan daun lamtoro

3.4.2 Variabel terikat : Pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*

3.4.3 Variabel kontrol : Lama perendaman disk, suhu inkubasi, lama penyimpanan, dan volume konsentrasi perasan.

### **3.5 Definisi Operasional Variabel**

1. Perasan daun lamtoro adalah 100 gram daun lamtoro yang ditumbuk kemudian diperas untuk diambil airnya (konsentrasi 100%).
2. Pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* ditetapkan zona hambat pada paper disk yang diberi perasan daun lamtoro dengan berbagai konsentrasi. Pertumbuhan dikategorikan mengukur diameter zona hambat menggunakan jangka sorong yang menghasilkan angka dengan satuan millimeter (mm).

### **3.6 Pengumpulan dan Pengolahan Data**

#### **3.6.1 Instrumen Penelitian**

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

#### **3.6.2 Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### **3.6.2.1 Lokasi Penelitian**

Lokasi penelitian dan pemeriksaan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya Jalan Sutorejo No.59 Surabaya.

##### **3.6.2.2 Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2015 sampai bulan Juni 2016, sedangkan waktu pemeriksaan dilaksanakan pada bulan April 2016.

### **3.6.3 Prosedur Pengumpulan Data**

#### **3.6.3.1 Prinsip Pemeriksaan**

Penghambatan terhadap pertumbuhan mikroorganisme, yaitu zona hambatan akan terlihat sebagai daerah jernih di sekitar cakram kertas yang mengandung zat antibakteri. Diameter zona hambatan pertumbuhan bakteri menunjukkan sensitivitas bakteri terhadap zat antibakteri. Selanjutnya dikatakan bahwa semakin lebar diameter zona hambatan yang terbentuk bakteri tersebut semakin sensitive (Waluyo, 2008).

Sensitivitas adalah suatu keadaan dimana mikroba sangat peka terhadap antibiotik atau sensitivitas adalah kepekaan suatu antibiotik yang masih baik untuk memberikan daya hambat terhadap mikroba. Uji sensitivitas terhadap suatu antimikroba untuk dapat menunjukkan pada kondisi yang sesuai dengan efek daya hambatnya terhadap mikroba. Suatu penurunan aktivitas antimikroba akan dapat menunjukkan perubahan kecil yang tidak dapat ditunjukkan oleh metode kimia, sehingga pengujian secara mikrobiologis dan biologi dilakukan. Biasanya metode merupakan standar untuk mengatasi keraguan tentang kemungkinan hilangnya aktivitas antimikroba (Djide, 2008).

#### **3.6.3.2 Alat-alat Pemeriksaan**

Alat yang digunakan dalam pemeriksaan ini adalah sebagai berikut : neraca triple beam balance, gelas arloji, tabung reaksi, gelas ukur, pengaduk, rak tabung, pipet pasteur, api spirtus, hot plate, kapas, filler, erlenmeyer, kasa berlapis, ose bulat, autoclave, inkubator, oven, plate, pipet ukur, paper disk, mortal, spatula, kertas pH, lidi kapas, kertas saring, pinset, dan jangka sorong.

### 3.6.3.3 Bahan Pemeriksaan

Bahan yang digunakan dalam pemeriksaan ini adalah sebagai berikut : daun lamtoro, suspensi kuman *Shigella dysenteriae*, Mac Farland 0.5, dan media Muller Hinton Agar (MHA).

### 3.6.3.4 Reagen Pemeriksaan

Reagen yang digunakan dalam pemeriksaan ini adalah sebagai berikut : Aquadest steril, pz steril, NaOH 0.1N, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%, BaCl<sub>2</sub> 1%, dan HCl 0.1N.

### 3.6.3.5 Prosedur Pembuatan Suspensi Kuman

Prosedur pembuatan suspensi kuman metode Mc.Farland 0,5 , yaitu :

1. Menyiapkan dua tabung steril, tabung satu untuk standard mc farland dan tabung dua untuk suspensi kuman.
2. Prosedur pembuatan standard Mc.Farland 0.5 yaitu :
  - a. Membuat perbandingan antara BaCl<sub>2</sub> 1% : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%.
  - b. Memipet 0,05ml BaCl<sub>2</sub> 1% + 9,95ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%.
  - c. Menghomogenkan dengan cara mengocok pelan tabung.
  - d. Standard Mc.farland 0,5 ini kekeruhannya sama dengan setiap 1ml suspensi kuman mengandung 150 juta kuman (Soemarno, 2000).
3. Prosedur membuat suspensi kuman, yaitu :
  - a. Mengisi tabung steril dengan pz ±5ml.
  - b. Mengambil kuman dari biakan *Shigella dysenteriae* murni.
  - c. Menyelupkan lidi kapas steril yang sudah ada kumannya pada tabung yang berisi pz steril.
  - d. Membandingkan kekeruhan suspensi kuman dengan standard Mc.farland 0,5.

- e. Apabila suspensi kurang keruh, maka tambahkan kuman dengan lidi kapas steril dan apabila terlalu keruh tambahkan pz steril hingga kekeruhannya sama dengan standard Mc.farland 0,5 (Sutton, 2011).
4. Menstandard ose yang akan dipakai dalam penelitian/tera ose :
    - a. Menyiapkan pipet ukur, filler, dan tabung.
    - b. Memipet aquadest steril 0,1ml kemudian menuangnya kedalam tabung.
    - c. Menyalakan api spirtus.
    - d. Mengambil satu mata ose air yang sudah dituang kedalam tabung kemudian memanaskan ose tersebut di atas api spirtus, lakukan berulang-ulang sampai air dalam tabung habis (didapatkan 43 mata ose).

#### **3.6.3.6 Prosedur Pembuatan Media Muller Hinton Agar (MHA)**

Prosedur pembuatan media MHA yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan.
2. Melakukan perhitungan terhadap jumlah bahan/media MHA yangdibutuhkan:  
 Membuat MHA ( 6 plate, @ ± 20 ml ——— 120 ml)  
 Komposisi MHA 34 gr per 1 liter ———  $\frac{34 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times 120 \text{ ml} = 4.08 \text{ gram}$
3. Melakukan penimbangan bahan sesuai dengan yang diperlukan yaitu 4.1 gram menggunakan neraca triple beam balance.
4. Mengukur volume aquadest yang dibutuhkan yaitu sebanyak 120 ml menggunakan gelas ukur.
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang tadi dengan aquadest yang sudah diukur volumenya ke dalam erlenmeyer.

6. Memanaskannya diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih.
7. Mengangkat larutan yang sudah larut sempurna dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan di baskom sampai suam-suam kuku.
8. Mengukur pH yaitu 7.6, jika pH terlalu asam tambahkan NaOH 0.1 N jika terlalu basa tambahkan HCL 0.1 N sampai pH yang telah ditentukan.
9. Menutup larutan yang ada di erlenmeyer dengan kapas berlemak dan bungkus dengan koran serta mengikatnya dengan benang wol atau karet gelang.
10. Melakukan sterilisasi di autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit bersama dengan plate yang dibutuhkan serta alat – alat yang perlu disteril.
11. Menuangkannya ke dalam plate yang steril sampai rata  $\pm$  15 ml secara steril dan dekat dengan api.
12. Mendiarkannya sampai terlihat padat dan menyimpannya ke lemari es.

(Fadhlan, 2010)

### **3.6.3.7 Prosedur Pembuatan Konsentrasi Perasan Daun Lamtoro**

Prosedur pembuatan konsentrasi perasan daun lamtoro yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Menimbang daun lamtoro sebanyak 100 gram.
2. Mencuci daun lamtoro hingga bersih menggunakan aquadest steril, setelah itu ditumbuk sampai benar-benar halus.
3. Menyaring daun lamtoro yang sudah ditumbuk tadi dengan kasa berlapis yang steril dan saring sampai benar-benar bersih.

4. Mengambil satu mata ose perasan yang sudah jernih tadi, kemudian menanamnya pada media NAP, dengan cara menggoreskan pada media tersebut.
5. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
6. Mengamati hasil, jika tidak terjadi pertumbuhan pada media berarti perasan tersebut benar-benar steril. Namun jika pada media NAP terdapat pertumbuhan kuman berarti perlu dilakukan tindalisasi yaitu :
  - a. Memanaskan perasan daun lamtoro dalam waterbath pada suhu 90°C selama 15 menit.
  - b. Meletakkan perasan tadi pada inkubator selama 24 jam suhu 37°C.
  - c. Mengulangi perlakuan tersebut selama 3 kali.
  - d. Menanam kembali perasan daun lamtoro yang sudah mengalami proses tindalisasi di media NAP dan menginkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.

7. Membuat konsentrasi 25%, 20%, 15%, 10%, 5% dan 0% (sebagai kontrol), yaitu:

Konsentrasi 100% : Tabung A diisi 1 ml perasan murni sebagai konsentrasi 100%

Konsentrasi 25% : Tabung 1 diisi 0,75 ml pz steril ditambah sebanyak 0,25 ml perasan daun lamtoro konsentrasi 100% dan homogenkan.

Konsentrasi 20% : Tabung 2 diisi 0,8 ml pz steril ditambah sebanyak 0,2 ml perasan daun lamtoro konsentrasi 100% dan homogenkan.

Konsentrasi 15% : Tabung 3 diisi 0,85 ml pz steril ditambah sebanyak 0,15 ml perasan daun lamtoro konsentrasi 100% dan homogenkan.

Konsentrasi 10% : Tabung 4 diisi 0,9 ml pz steril ditambah sebanyak 0,1 ml perasan daun lamtoro konsentrasi 100% dan homogenkan.

Konsentrasi 5% : Tabung 5 diisi 0,95 ml pz steril ditambah sebanyak 0,05 ml perasan daun lamtoro konsentrasi 100% dan homogenkan.

Konsentrasi 0% : Tabung 6 diisi 1 ml pz steril tanpa diberi tambahan perasan daun lamtoro.

(Zainudin, 2003)

### **3.6.3.8 Prosedur Pemeriksaan Sampel**

#### **A. Hari pertama :**

1. Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan.
2. Menyalakan api spirtus dengan korek api.
3. Mengisi tabung dengan pz steril  $\pm$  5ml.
4. Mengambil kuman *Shigella dysenteriae* pada biakan murni dengan lidi kapas steril.
5. Menyelupkan lidi kapas steril yang sudah ada kumannya pada tabung yang berisi pz steril.
6. Membandingkan kekeruhan suspensi kuman dengan standard Mc.farland 0,5.
7. Apabila suspensi kurang keruh, maka tambahkan kuman dengan lidi kapas steril dan apabila terlalu keruh tambahkan pz steril hingga kekeruhannya sama dengan standard Mc.farland 0,5.
8. Mengambil lidi kapas steril, celupkan pada suspensi yang telah distandarisasi dengan Mc.farland 0,5.

9. Menanam pada media Muller Hinton Agar (MHA) dengan cara menggosokkan, biarkan hingga media agak kering.
10. Menempelkan paper disk yang sudah direndam dalam perasan daun lamtoro sesuai konsentrasinya.
11. Menginkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

**B. Hari kedua :**

1. Mengamati hasilnya pada media Muller Hinton Agar (MHA) dengan menggunakan jangka sorong untuk mengukurnya.
2. Mengukur zona bening yang bisa dihambat oleh perasan daun lamtoro pada konsentrasi 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, dan 0% (kontrol).
3. Mencatat konsentrasi terkecil tadi sebagai daya hambat pertumbuhan kuman *Shigella dysenteriae*.
4. Mencatat hasil yang diamati sebagai data (Waluyo, 2008).

**3.6.4 Cara Analisis Data**

**3.6.4.1 Tabulasi Data**

**Tabel 3.1 : Contoh Tabulasi Data**

No.	Kode Sampel	Konsentrasi Perasan Daun Lamtoro (%)					
		25	20	15	10	5	0
1	A						
2	B						
3	C						
4	D						
Jumlah							
Rata-rata							

**3.6.4.2 Metode Analisis Data**

Data yang diperoleh diuji menggunakan uji annova dengan tingkat kesalahan 5% atau 0,05.