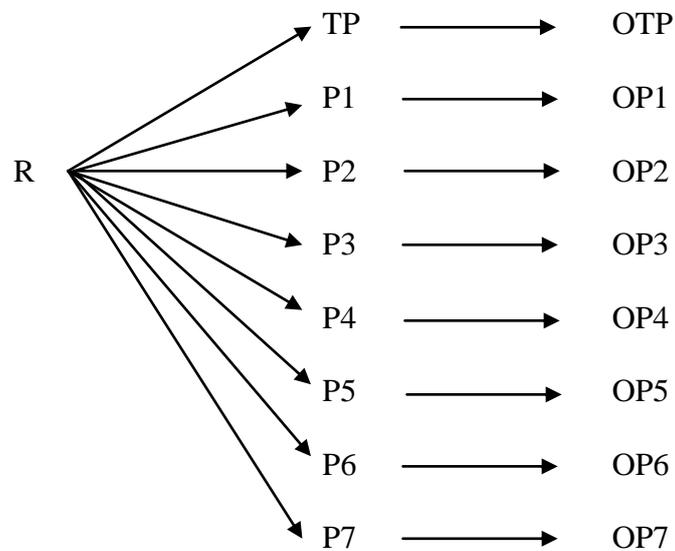


**BAB 3**  
**METODE PENELITIAN**

**3.1. Rancangan Penelitian**

Dalam penelitian ini desain penelitian yang digunakan adalah desain eksperimental, yaitu uji *in vitro* pemberian perasan lobak putih (*Raphanus sativus* Linn) terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*.



Gambar 3.1 : Desain penelitian (Ningrum, 2013).

Keterangan :

- R : Random atau acak
- TP : Perlakuan tanpa pemberian perasan lobak
- P1 : Perlakuan pemberian perasan lobak dengan konsentrasi 1,562%
- P2 : Perlakuan pemberian perasan lobak dengan konsentrasi 3,125%
- P3 : Perlakuan pemberian perasan lobak dengan konsentrasi 6,25%
- P4 : Perlakuan pemberian perasan lobak dengan konsentrasi 12,5%
- P5 : Perlakuan pemberian perasan lobak dengan konsentrasi 25%
- P6 : Perlakuan pemberian perasan lobak dengan konsentrasi 50%
- P7 : Perlakuan pemberian perasan lobak dengan konsentrasi 100%
- OTP : Observasi setelah perlakuan tanpa pemberian perasan lobak
- OP1 : Observasi setelah perlakuan pemberian perasan lobak konsentrasi 1,562%
- OP2 : Observasi setelah perlakuan pemberian perasan lobak konsentrasi 3,125%
- OP3 : Observasi setelah perlakuan pemberian perasan lobak konsentrasi 6,25%
- OP4 : Observasi setelah perlakuan pemberian perasan lobak konsentrasi 12,5%
- OP5 : Observasi setelah perlakuan pemberian perasan lobak konsentrasi 25%
- OP6 : Observasi setelah perlakuan pemberian perasan lobak konsentrasi 50%
- OP7 : Observasi setelah perlakuan pemberian perasan lobak konsentrasi 100%

## 3.2 Populasi, Sampel, dan Tehnik Sampling

### 3.2.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri *Shigella dysentriae* yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya.

### 3.2.2 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah bakteri *Shigella dysentriae* murni yang dipindah dari biakan murni dan tumbuh pada media *MacConkey Agar* (MCA).

Dalam penelitian terdapat 7 kali perlakuan konsentrasi dari lobak putih (*Raphanus sativus* Linn) dan 1 perlakuan sebagai kontrol. Setiap perlakuan dilakukan masing-masing minimal 5 kali pengulangan yang diperoleh dari rumus dalam buku yang ditulis Hidayat (2011) dengan hasil sebagai berikut :

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

$$(8-1)(r-1) \geq 15$$

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

$$7r-7 \geq 15$$

$$7r \geq 34$$

$$r \geq 4.8 \sim 5 \text{ (pengulangan)}$$

#### **Keterangan:**

r : jumlah pengulangan

t : banyak kelompok perlakuan

Jadi jumlah sampel adalah 40

### 3.2.3 Tehnik Sampling

Sampel dalam penelitian ini adalah bakteri *Shigella dysenteriae* murni yang dipindah dari biakan murni dan tumbuh pada media *Mac Conkey Agar* (MCA). Bakteri *Shigella dysenteriae* diambil secara random (acak).

### 3.3 Variabel Penelitian

**3.3.1 Variabel Bebas** : konsentrasi lobak putih (*Raphanus sativus* Linn)

**3.3.2 Variabel Terikat** : Pertumbuhan *Shigella dysenteriae*

**3.3.3 Variabel Kontrol** : Sterilisasi, lama inkubasi, suhu, Cara inokulasi, volume suspensi bakteri, volume perasan lobak

### 3.4 Definisi Operasional

1. Konsentrasi lobak putih adalah lobak yang di hancurkan dan diambil hasil perasannya. Hasil tersebut sebagai konsentrasi 100%. Kemudian dilakukan pengenceran per volume dengan Pz steril menjadi konsentrasi bertingkat 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,562% dan 0% (kontrol).

2. Pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* merupakan pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* yang tumbuh pada media *Mac Conkey Agar* (MCA) pada masing-masing konsentrasi dalam bentuk perhitungan banyak koloni dengan satuan CFU.

3. Perlakuan dengan cara sterilisasi dalam autoclave menggunakan suhu 121°C selama 15 menit dalam tekanan 1,5 atm, inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C, sedangkan cara inokulasi yaitu dengan memindahkan bakteri dari medium lama ke medium baru, volume perasan lobak yang digunakan sebanyak 1 ml dan volume suspensi bakteri yang dibuat setara dengan pembuatan standart Mac Farlan 1.

### **3.5 Pengumpulan dan Pengolahan Data**

#### **3.5.1 Instrumen Penelitian**

Data pertumbuhan bakteri *Shigella dysentriae* diperoleh dengan cara observasi langsung, yaitu dengan melalui uji laboratorium. Pemeriksaan jumlah koloni pada bakteri *Shigella dysentri* ini menggunakan metode perhitungan Angka Lempeng Total (ALT) yang tumbuh pada media *Mac Conkey Agar* (MCA).

#### **3.5.2 Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### **3.5.2.1 Lokasi Penelitian**

Lokasi penelitian dan pemeriksaan dilakukan di laboratorium BALAI BESAR LABORATORIUM KESEHATAN (BBLK) Surabaya.

##### **3.5.2.2 Waktu Penelitian**

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2016 – Juli 2017. Sedangkan waktu pemeriksaan dilakukan pada bulan April 2017.

### **3.5.3 Prosedur Pengumpulan Data.**

#### **3.5.3.1 Prinsip pemeriksaan**

Mengamati ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri *Shigella dysenteriae* setelah diberi perlakuan perasan lobak dengan berbagai konsentrasi dan ditanam di media *Mac Conkey Agar* (MCA). Pertumbuhan dilihat setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Larutan uji senyawa antibakteri pada konsentrasi terkecil tanpa adanya pertumbuhan bakteri uji ditetapkan sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM).

#### **3.5.3.2 Persiapan pemeriksaan**

##### **A. Persiapan Alat dan Bahan yang digunakan dalam Penelitian**

Alat yang digunakan adalah : timbangan neraca analitik, kaki tiga dan kasa esbes, blender, kertas pH, Pipet volume, erlenmeyer, pipet ukur, tabung reaksi, gelas ukur, kertas saring, corong, ose bulat, kasa steril, spidol permanen, etiket, koran, rak tabung reaksi, spatula, beaker glass, autoclave, thermometer, colony counter, api spirtus dan centrifuge.

Bahan yang digunakan adalah : lobak putih, aquadest, biakan murni *Shigella dysenteriae*, media MCA dan MH Broth, raegen BaCl<sub>2</sub> 1% dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%, NaOH 0,1 N dan HCl 0,1N, dan PZ steril.

#### **3.5.3.3 Prosedur Penelitian**

##### **A. Sterilisasi alat yang akan digunakan**

Semua alat yang akan digunakan dalam penelitian ini, sebelumnya disterilkan dengan autoclave. Sterilisasi dalam autoclave menggunakan suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit dalam tekanan 1,5 atm.

## **B. Pembuatan suspensi bakteri *Shigella dysentriae***

### **1. Cara Pembuatan Standart *Mac Farland 1***

Alat yang digunakan adalah pipet ukur 1 ml dan 10 ml, tabung reaksi dan filler. Bahan yang digunakan adalah reagen BaCl<sub>2</sub> 1% dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%

Langkah kerja :

- a) Disiapkan tabung reaksi yang sudah dibersihkan
- b) Dipipet 0,1 ml BaCl<sub>2</sub> 1% dan masukkan kedalam tabung reaksi.
- c) Dipipet 9,9 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% dan tambahkan kedalam tabung sebelumnya.
- d) Dicampur kedua larutan dalam tabung hingga homogen sehingga di dapatkan standart *Mac Farlan 1* dan setara dengan jumlah bakteri  $3 \times 10^8$  CFU/ml.

### **2. Prosedur pembuatan suspensi kuman**

Langkah kerja:

- a) Disiapkan tabung reaksi dan diisi dengan pz steril  $\pm 2$  ml.
- b) Diambil 1 mata ose biakan murni *Shigella dysentriae* dengan ose bulat kemudian dimasukkan kedalam tabung yang berisi Pz steril.
- c) Dihomogenkan dan dibandingkan kekeruhan dengan standart *Mac Farland 1* yang sudah dibuat.
- d) Apabila didapat kekeruhan suspensi bakteri *Shigella dysentriae* melebihi standart maka perlu ditambahkan Pz. Begitu juga bila kekeruhan kurang dari standart maka perlu ditambahkan suspensi

bakteri *Shigella dysentriae*, dilakukan terus menerus hingga sesuai dengan standart *Mac Farlan 1*.

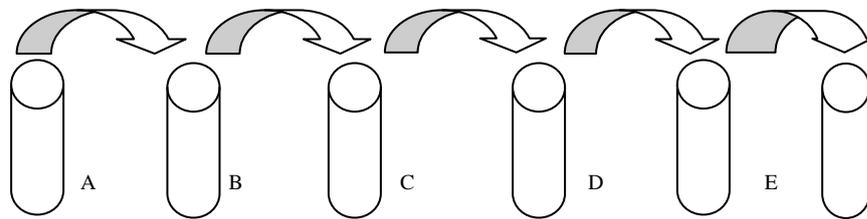
- e) Setelah suspensi bakteri distandardkan dengan *Mac Farlan 1* dimana setara dengan jumlah bekteri  $3 \times 10^8$

### 3. Pengenceran suspensi kuman

- a. Setelah didapatkan kuman yang sesuai standart *Mc Farlan 1* didapatkan hasil 1:3.000.000 ( $3 \times 10^8$  CFU/ml).
- b. Mengencerkan suspensi kuman sehingga mendapatkan hasil 1 : 1000 ( $3 \times 10^3$  CFU/ml).

#### Gambar 3.5 Prosedur pengenceran suspensi kuman :

Diambil 1 ml Diambil 1 ml Diambil 1 ml Diambil 1 ml Diambil 1 ml



Tab 1	Tab 2	Tab 3	Tab 4	Tab 5	Tab 6
$3 \times 10^8$	9 ml Pz				
	$3 \times 10^7$	$3 \times 10^6$	$3 \times 10^5$	$3 \times 10^4$	$3 \times 10^3$

- c. Diambil suspense kuman pada tabung pertama sebanyak 1 ml dari standart *Mc Farland 1* ( $3 \times 10^8$  CFU/ml), memasukkan ke dalam tabung kedua dan menambahkan 9 ml Pz, itu setara dengan  $3 \times 10^7$  CFU/ml.

- d. Diambil suspensi kuman pada tabung kedua 1 ml dari pengenceran suspensi kuman  $3 \times 10^7$  CFU/ml, memasukkan ke dalam tabung ketiga dan menambahkan 9 ml Pz, itu setara dengan  $3 \times 10^6$  CFU/ml. Melanjutkan pengenceran seperti diatas sampai tabung terakhir (tabung 6). Sehingga tabung terakhir diperoleh hasil pengenceran  $3 \times 10^3$  CFU/ml.

#### 3.5.3.4 Prosedur pembuatan media *Nutrient Agar plate* (NAP)

1. Melakukan perhitungan media Nutrien Agar (NA)

Membuat NAP 5 plate, @plate  $\pm$  20 ml

$$\text{Komposisi NA 20 gr per liter} \longrightarrow \frac{20 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml} = 2 \text{ gr}$$

2. Disiapkan alat dan bahan yang digunakan.
3. Ditimbang bahan media *Nutrien Agar* sesuai dengan perhitungan menggunakan timbangan.
4. Diukur volume aquades 100 ml menggunakan gelas ukur
5. Dilarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquades yang sudah diukur volume 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 menambahkan dengan NaOH 0,1 N, sedangkan jika terlalu basa menambakkannya dengan HCL 0,1 N sampai pH 7.4.

9. Ditunggalkan erlenmeyer dengan kapas berlemak dan menyeterilkannya dengan autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.
10. Setelah turun dari autoclave, dituangkan ke dalam plate yang steril sampai rata.
11. Didiamkan sampai terlihat padat dan menyimpannya ke almari es (Sumarsono, 1996 dalam penelitian Meirisa, 2014).

#### **3.5.3.5 Uji sterilitas konsentrasi perasan lobak.**

1. Diambil 1 mata ose perasan lobak yang sudah jernih secara steril, kemudian menanam ke media *Nutrient Agar Plate* (NAP), dengan cara menggoreskannya di permukaan media.
2. Inkubasi selama 24 jam 37<sup>0</sup> C.
3. Diamati hasilnya, jika tidak tumbuh kuman berarti perasan lobak tadi sudah benar-benar steril. Namun jika pada media *Nutrient Agar Plate* (NAP) terdapat pertumbuhan kuman berarti perlu dilakukan proses tindalisasi, yaitu:
  - a. Dipanaskan perasan lobak dengan waterbath pada suhu 90<sup>0</sup>C selama 15 menit.
  - b. Kemudian meletakkannya diinkubator selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C.
  - c. Diulangi perlakuan tersebut 3 kali.
  - d. Ditanam kembali perasan lobak yang sudah melalui proses tindalisasi di media NAP dan menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C.

### 3.5.3.6 Prosedur Pembuatan konsentrasi perasan lobak

Alat yang digunakan adalah neraca analitik, blender, batang pengaduk, kasa steril, kertas saring, tabung reaksi, pipet volume 5 ml, pipet ukur 1 ml.

Bahan yang digunakan adalah lobak dan Aquades steril.

Teknik pembuatan konsentrasi perasan lobak yang dilakukan dalam penelitian adalah sebagai berikut :

1. Dicuci hingga bersih lobak yang akan dipakai untuk penelitian.
2. Ditimbang lobak sebanyak 100 gram.
3. Lobak yang bersih kemudian dibilas dengan aquades steril, memotong kecil-kecil dan kemudian dimasukkan dalam blender.
4. Menyaring lobak yang sudah halus dengan menggunakan kasa berlapis yang steril, menyaring sampai benar-benar jernih sehingga menghasilkan perasan.
5. Perasan yang sudah dalam tahap penyaringan dimasukkan kedalam tabung yang steril sehingga didapatkan perasan dengan konsentrasi 100%.
6. Dilanjutkan dengan membuat konsentrasi 50%, sampai dengan 1,562%, dengan cara sebagai berikut :
  1. Konsentrasi 100% : Tabung 1 diisi 10 ml perasan lobak, tanpa pengenceran.
  2. Konsentrasi 50% : Tabung 2 diisi 10 ml PZ steril ditambah perasan lobak sebanyak 10 ml perasan dari konsentrasi 100% kemudian homogenkan.

3. Konsentrasi 25% : Tabung 3 diisi 10 ml PZ steril ditambah perasan lobak sebanyak 10 ml perasan dari konsentrasi 50% kemudian homogenkan.
4. Konsentrasi 12,5% : Tabung 4 diisi 10 ml PZ steril ditambah perasan lobak sebanyak 10 ml perasan dari konsentrasi 25% dan homogenkan.
5. Konsentrasi 6,25% : Tabung 5 diisi 10 ml PZ steril ditambah perasan lobak sebanyak 10 ml perasan dari konsentrasi 12,5% dan homogenkan.
6. Konsentrasi 3,125% : Tabung 6 diisi 10 ml PZ steril ditambah perasan lobak sebanyak 10 ml perasan dari konsentrasi 6,25% dan homogenkan.
7. Konsentrasi 1,562% : Tabung 7 diisi 10 ml PZ steril ditambah perasan lobak sebanyak 10 ml perasan dari konsentrasi 3,125% dan homogenkan.
8. Kontrol (-) : Tabung 9 diisi 1 ml PZ steril.

### **3.5.3.7 Prosedure pembuatan media *Mueller Hinton Broth* (MHB)**

1. Disiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
2. Membuat MHB 9 tabung, @ tabung 10 ml
 

Komposisi MH 38 gr/l  $\longrightarrow$   $\frac{38 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}} \times 90 \text{ ml} = 3,5 \text{ gr}$
3. Dilakukan penimbangan bahan sesuai dengan yang diperlukan menggunakan timbangan
4. Diukur volume aquadest yang dibutuhkan yaitu sebanyak 90 ml dengan gelas ukur

5. Dilarutkan bahan yang sudah ditimbang tadi dengan aquadest yang sudah diukur volumenya ke dalam erlenmeyer.
6. Dipanaskan diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih.
7. Diangkat larutan yang sudah larut sempurna dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan di baskom sampai suam-suam.
8. Diukur pH dengan cara menambahkan NaOH 0,1 N jika terlalu asam dan menambahkan HCl 0,1 N jika terlalu basa sampai pHnya 6,9-7,3.
9. Ditungkat 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<sup>0</sup>C selama 15 menit.
10. Setelah turun dari autoclave, dituangkan ke dalam plate yang steril sampai rata.
11. Ditungkat larutan tadi ke dalam plate. Masing-masing plate  $\pm$  20 ml secara steril dekat dengan api (BBLK, 2017).

#### **3.5.3.8 Prosedur pembuatan media *Mac Conkey Agar* (MCA)**

1. Disiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
2. Dibuat MCA 40 plate, @ plate 20 ml
 
$$\text{Komposisi MC } 50 \text{ gr/l} \longrightarrow \frac{50 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}} \times 800 \text{ ml} = 40 \text{ gr}$$
3. Dilakukan penimbangan bahan sesuai dengan yang diperlukan menggunakan timbangan.

4. Diukur volume aquadest yang dibutuhkan yaitu sebanyak 800 ml dengan gelas ukur.
5. Dilarutkan bahan yang sudah ditimbang tadi dengan aquadest yang sudah diukur volumenya ke dalam erlenmeyer.
6. Dipanaskan 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.
8. Diukur pH dengan cara menambahkan NaOH 0,1 N jika terlalu asam dan menambahkan HCl 0,1 N jika terlalu basa sampai pHnya 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 diautoclave pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit.
10. Setelah turun dari autoclave, dituangkan ke dalam plate yang steril sampai rata.
11. Dituang larutan tadi kedalam plate. Masing-masing plate  $\pm$  20 ml secara steril dekat dengan api (Sumarsono, 1996 dalam penelitian Meirissa, 2015).

### 3.5.3.9 Prosedure Pemeriksaan Sampel

#### Hari pertama pemeriksaan

1. Disiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
2. Dinyalakan api spirtus dengan korek api.
3. Diberi label masing-masing tabung sesuai dengan konsentrasinya, yaitu konsentrasi bertingkat 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,562% , dan kontrol (-).
4. Dipipet 1ml MHB kemudian ditambahkan 1ml perasan konsentrasi 100 % dan tambahkan 100 $\mu$ l suspensi kuman *Shigella dysentriae* dengan steril, homogenkan agar suspensi tercampur sempurna. Melakukan hal yang sama pada konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,562%, dan kontrol (-). Tujuan hal ini dilakukan agar perbandingan suspensi bakteri dengan perasan sama, yaitu 1:1.
5. Ditutup kembali tabung dengan kapas berlemak.
6. Diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam.

#### Hari kedua

1. Diamati masing-masing tabung, apakah terjadi kekeruhan atau tidak.
2. Bila kekeruhan sulit diamati secara visual maka menguji kembali ke media *Mac Conkey* (MC) dengan tujuan untuk memastikan apakah kuman tersebut adalah *Shigella dysentriae*.
3. Dipipet 1 $\mu$ l kuman yang ada pada masing-masing konsentrasi.

4. Ditanam pada media *Mac Conkey* (MC) dengan menggoreskan di permukaan media.
5. Diinkubasi kembali pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam.

### **Hari ketiga**

1. Diamati hasilnya pada media padat apakah terbentuk koloni bulat (abu-abu transparan) yang mengidentifikasi kuman tersebut adalah *Shigella dysenteriae*.
2. Dicatat konsentrasi terkecil sebagai sumber daya hambat kuman dan menghitung koloni.
3. Dicatat hasil yang diamati sebagai data.

### 3.5.4 Cara Analisa Data (Sederhana)

Adapun data yang di peroleh dari pengamatan tersebut dimasukkan dalam tabel pengamatan sebagai berikut :

Tabel 3.1 Contoh tabulasi data hasil pemeriksaan Perasan Lobak Putih (*Raphanus sativus* Linn) terhadap *Shigella dysentriae*.

No	Pengulangan	Jumlah koloni pada perlakuan konsentrasi							
		0%	1,562%	3,125%	6,25%	12,%	25%	50%	100%
1.	A1								
2.	A2								
3.	A3								
4.	A4								
5.	A5								
	<b>Jumlah</b>								
	<b>Rata-rata</b>								
	<b>SD</b>								

Setelah diperoleh hasil dalam bentuk tabel, data dianalisis dengan uji Anova dengan tingkat kesalahan  $\alpha$  (0,05).