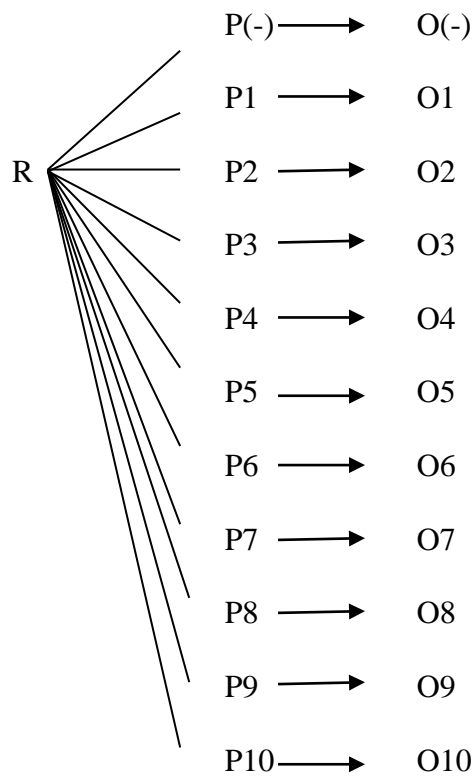


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian rebusan kayu manis terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*. Dengan rancangan penelitian sebagai berikut:



Keterangan:

R : Random

P(-) : Perlakuan yang tidak di beri rebusan kayu manis (*Cinnamomum burmannii*)

- P1 : Perlakuan konsentrasi rebusan kayu manis 100%
- P2 : Perlakuan konsentrasi rebusan kayu manis 50%
- P3 : Perlakuan konsentrasi rebusan kayu manis 25%
- P4 : Perlakuan konsentrasi rebusan kayu manis 12,5%
- P5 : Perlakuan konsentrasi rebusan kayu manis 6,25%
- P6 : Perlakuan konsentrasi rebusan kayu manis 3,125%
- P7 : Perlakuan konsentrasi rebusan kayu manis 1,562%
- P8 : Perlakuan konsentrasi rebusan kayu manis 0,781%
- P9 : Perlakuan konsentrasi rebusan kayu manis 0,390%
- P10 : Perlakuan konsentrasi rebusan kayu manis 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 coloni 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:

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

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

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

$$10n - 10 \geq 15$$

$$10n \geq 15 + 10$$

$$10n \geq 25$$

$$n \geq 25 / 10 = 2,5$$

$$n \sim 3$$

Jadi jumlah pengulangan sebanyak 3 kali

(Hidayat, 2010)

Keterangan:

n : Jumlah kelompok

k : Perlakuan

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 Januari sampai bulan juni 2014

3.4 Variabel dan Definisi Oprasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas : Rebusan Kayu manis (*Cinnamomum burmannii*)

Variabel terikat : Pertumbuhan *Shigella dysenteriae*.

Variabel control :Lama inkubasi, suhu.

3.4.2. Definisi Oprasional

1. Konsentrasi rebusan kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) 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 kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) yang terdapat pada masing- masing konsentrasi.
3. Setelah diinkubasi selama 24 jam 37°C, pertumbuhan dikategorikan menjadi tumbuh dan tidak tumbuh. Untuk melihat ada tidaknya pertumbuhan kuman perlu dilakukan pemeriksaan yaitu dengan cara menanam pada media MC (Mac conkey).

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* diperoleh melalui uji Laboratorium. Dengan menggunakan metode dilusi, metode dilusi ini digunakan untuk menentukan kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM) dari obat anti mikroba. Prinsip dari metode dilusi ini adalah menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi media cair dan sejumlah tertentu sel mikroba yang diuji. Langkah-langkah pemeriksaannya diantaranya sebagai berikut :

3.5.1. Alat- alat

Alat-alat yang di butuhkan dalam melaksanakan penelitian ini adalah : timbangan, gelas arloji, tabung reaksi, gelas ukur, pengaduk, rak tabung, pipet pasteur, api spirtus, kaki tiga, filler, erlenmeyer, ose, autoclave, plate ,pipet ukur, tabung sentrifuge

3.5.2. Bahan Pemeriksaan

1. Rebusan kayu manis (*Cinnamomum burmannii*)
2. Suspensi kuman *Shigella dysenteriae*
3. Aquades steril
4. Media NA
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% : H₂SO₄ 1 % sebesar 1 : 90
 - b. Dipipet 0,05 ml BaCl 1 % + 9,95 ml H₂SO₄ 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.
5. Didapatkan . . . mata ose air tersebut habis.

3.5.5. Prosedure Pembuatan media NAP

1. Dilakukan perhitungan media NA (Nutrient Agar)

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 NA) 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. Didiarkannya sampai terlihat padat dan menyimpannya ke lemari es.

3.5.6 Prosedure Pembuatan konsentrasi rebusan kayu manis (*Cinnamomum burmannii*)

Teknik pembuatan konsentrasi rebusan kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) dicuci sebanyak 3 kali dengan menggunakan aquades. Setelah kering ditimbang sebanyak 100 gram dan di tambah aquades steril sebanyak 100 ml, direbus pada suhu 90^o C selama 15 menit, kemudian disaring, karena hasil rebusan agak keruh maka rebusan kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) dicentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan rebusan kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) yang jernih. Rebusan kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) yang didapatkan adalah rebusan kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) dengan konsentrasi 100 %. Kemudian dilakukan uji sterilisasi dengan ditanam pada media *Nutrient Agar Plate* (NAP) lalu inkubasi pada suhu 37^o C selama 24 jam. Apabila tidak terdapat pertumbuhan kuman maka sampel kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) dinyatakan telah steril, setelah itu dilakukan pengenceran. Namun jika pada media NAP terdapat pertumbuhan kuman berarti perlu dilakukan proses tindalisasi, yaitu:

- a. Dipanaskan rebusan kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) 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 kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) yang sudah melalui proses tindalisasi di media NAP dan menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37° C
- e. Dibuat konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,562%, 0,781%, 0,390%, 0,195%, yaitu :

Konsentrasi 100% : Tabung 1 diisi 2 ml rebusan awal, itu sebagai konsentrasi 100%

Konsentrasi 50% : Tabung 2 diisi 2 ml rebusan awal, ditambahkan 2 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.

Konsentrasi 25% : Tabung 3 diisi 2 ml yang berasal konsentrasi 50%, ditambahkan 2 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.

Konsentrasi 12,5% : Tabung 4 diisi 2 ml yang berasal konsentrasi 25%, ditambahkan 2 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.

Konsentrasi 6,25% : Tabung 5 diisi 2 ml yang berasal konsentrasi 12,5%, ditambahkan 2 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.

Konsentrasi 3,125%	:Tabung 6 diisi 2 ml yang berasal konsentrasi 6,25%, ditambahkan 2 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
Konsentrasi 1,562%	:Tabung 7 diisi 2 ml yang berasal konsentrasi 3,125%, ditambahkan 2 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
Konsentrasi 0,781%	:Tabung 8 diisi 2 ml yang berasal konsentrasi 1,562%, ditambahkan 2 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
Konsentrasi 0,390%	:Tabung 9 diisi 2 ml yang berasal konsentrasi 0,781%, ditambahkan 2 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
Konsentrasi 0,195%	:Tabung 10 diisi 2 ml yang berasal konsentrasi 0,390%, ditambahkan 2 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
Konsentrasi 0%	:Pada tabung 11 diisi 1 ml Pz steril tanpa diberi tambahan rebusan kayu manis.

3.5.7 Prosedure pembuatan media MC (Mac Conkey)

1. Disiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
2. Dilakukan perhitungan terhadap jumlah bahan / media MC yang dibutuhkan

Membuat MC 15 plate, @ plate 17 ml

$$\text{Komposisi MC 50 gr per 1 liter} \longrightarrow \frac{50 \text{ gr} \times 225 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 12,75 \text{ gr}$$

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.

3.5.8 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 *Shigella disentriae* 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.

Dengan keterangan :

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

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

3.6 Metode Analisis Data

Data yang diperoleh diuji menggunakan uji chi – square dengan tingkat kesalahan 5% (0,05).