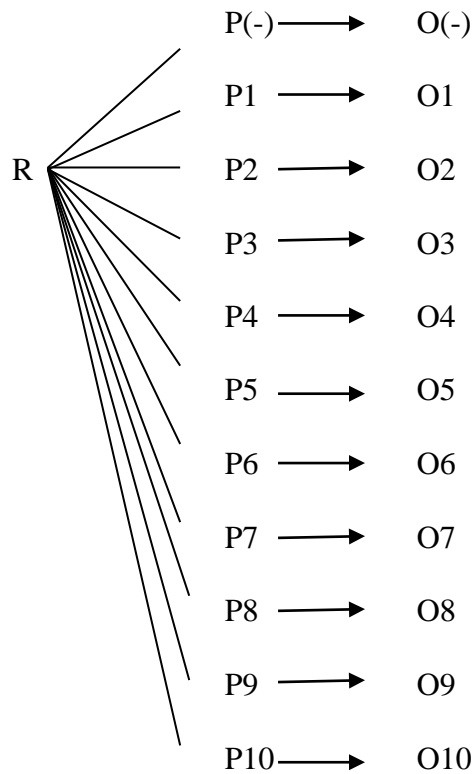


BAB 3
METODE PENELITIAN

3.1 Jenis penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi perasan buah mengkudu terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*. Dengan rancangan penelitian sebagai berikut:



Gambar 3.1 : Rancangan penelitian

Keterangan:

R : Random

P(-) : Perlakuan yang tidak di beri perasan buah mengkudu

- P1 : Perlakuan konsentrasi perasan buah mengkudu 100%
- P2 : Perlakuan konsentrasi perasan buah mengkudu 50%
- P3 : Perlakuan konsentrasi perasan buah mengkudu 25%
- P4 : Perlakuan konsentrasi perasan buah mengkudu 12,5%
- P5 : Perlakuan konsentrasi perasan buah mengkudu 6,25%
- P6 : Perlakuan konsentrasi perasan buah mengkudu 3,125%
- P7 : Perlakuan konsentrasi perasan buah mengkudu 1,5625%
- P8 : Perlakuan konsentrasi perasan buah mengkudu 0,78125%
- P9 : Perlakuan konsentrasi perasan buah mengkudu 0,390%
- P10 : Perlakuan konsentrasi perasan buah mengkudu 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 1,5625%
- O8 : Observasi setelah perlakuan konsentrasi 0,78125%
- 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* sp 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*. Jumlah sampel yang digunakan yaitu 33 juta kuman. Berasal dari 1 mata ose (Standart Mac Farland = 1 juta kuman/ml). Sehingga dalam 33 tabung sampel yang digunakan sebanyak 33 juta kuman, sedangkan jumlah pengulangan sampelnya diperoleh dari rumus sebagai berikut:

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

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

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

$$10n - 10 \geq 15$$

$$10n \geq 15 + 10$$

$$10n \geq 25$$

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

$$n \sim 3$$

(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 April 2014.

3.4 Variabel dan Definisi Oprasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas	: Konsentrasi perasan buah mengkudu
Variabel terikat	: Pertumbuhan <i>Shigella dysenteriae</i> .
Variabel control	: Lama inkubasi, suhu.

3.4.2. Definisi Oprasional

1. Konsentrasi perasan buah mengkudu 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 perasan buah mengkudu pada masing-masing konsentrasi. Selanjutnya, pertumbuhan *Shigella dysenteriae* dikategorikan menjadi tumbuh dan tidak tumbuh. Untuk melihat adtidaknya pertumbuhan kuman perlu dilakukan pemeriksaan yaitu dengan cara menanam pada media MC (Mac conkey). Bakteri tumbuh dengan ciri pada media MC koloni kuman transparan dan media berwarna kuning karena bakteri ini

tidak meragi laktosa. Bakteri tidak tumbuh dengan ciri pada media MC tetap berwarna merah karena tidak ada pertumbuhan kuman.

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

Timbangan, tabung reaksi, pengaduk, pipet pasteur, mortar + mortir, erlenmeyer, autoclave, pipet ukur, gelas arloji, gelas ukur, rak tabung, api spirtus, kaki tiga, filler, ose, plate, tabung sentrifuge.

3.5.2. Bahan Pemeriksaan

1. Perasan buah mengkudu
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*

Peralatan yang digunakan adalah tabung steril, ose bulat, pipet ukur.

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 1 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 15 mata ose air tersebut habis.

3.5.5. Prosedure Pembuatan media NAP

Peralatan yang digunakan adalah gelas arloji, batang pengaduk, pipet pastur, timbangan, petridisk, erlenmeyer, kaki tiga, autoclave, hot plate, kertas Ph, api spirtus dan bunsen.

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. Didiemkannya sampai terlihat padat dan menyimpannya ke almari es.

3.5.6. Uji sterilitas konsentrasi Perasan Buah Mengkudu

Peralatan yang digunakan adalah bak tempat mengkudu, kain kasa steril, tabung reaksi steril, centrifuge, pipet ukur steril.

Teknik pembuatan konsentrasi perasan buah mengkudu yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Buah mengkudu ditimbang 100 gram atau mengambil sejumlah mengkudu sesuai dengan volume perasan yang dibutuhkan.
2. Buah mengkudu di cuci bersih, kemudian di bilas dengan aquadest steril, setelah itu diperas.
3. Disaring buah mengkudu yang sudah diperas tadi dengan kasa berlapis yang steril. disaring sampai benar-benar jernih.
4. Disentrifuge kembali perasan tadi ditabung sentrifuge yang steril sehingga didapatkan perasan yang benar- benar jernih
5. Diambil 1 mata ose perasan yang sudah jernih secara steril, kemudian menanamnya ke media NAP, dengan cara menggoreskannya dipermukaan media
6. Inkubasi selama 24 jam 37° C
7. Diamati hasilnya, jika tidak terjadi pertumbuhan kuman berarti perasan buah mengkudu tadi sudah benar – benar steril. Namun jika pada media NAP terdapat pertumbuhan kuman berarti perlu dilakukan proses tindalisasi, yaitu:

- a. Dipanaskan perasan buah mengkudu 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 perasan buah mengkudu yang sudah melalui proses tindalisasi di media NAP dan menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37°C

3.5.7. Prosedur pembuatan konsentrasi perasan buah mengkudu

Peralatan yang digunakan adalah tabung reaksi steril, pipet ukur steril, api spirtus dan bunsen.

Konsentrasi 100%	:Tabung 1 diisi 2 ml perasan awal, itu sebagai konsentrasi 100%
Konsentrasi 50%	:Tabung 2 diisi 2 ml perasan 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 1,5625%	:Tabung 7 diisi 2 ml yang berasal konsentrasi 3,125%, ditambahkan 2 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
Konsentrasi 0,78125%	:Tabung 8 diisi 2 ml yang berasal konsentrasi 1,5625%, ditambahkan 2 ml Pz steril kemudian dihomogenkan.
Konsentrasi 0,390%	:Tabung 9 diisi 2 ml yang berasal konsentrasi 0,78125%, 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 perasan buah mengkudu.

3.5.8. Prosedure pembuatan media MC (Mac Conkey)

Peralatan yang digunakan adalah gelas arloji, batang pengaduk, pipet pastur, timbangan, petridisk, erlenmeyer, kaki tiga, autoclave, hot plate, kertas Ph, api spirtus dan bunsen.

Teknik pembuatan media MC (Mac Conkey) yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Disiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan

2. Dilakukan perhitungan terhadap jumlah bahan / media MC yang dibutuhkan.

Membuat MC15 plate, @ plate 17 ml

$$\text{Komposisi MC50 gr per 1 liter} \longrightarrow \frac{50\text{gr} \times 225 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 12,75 \text{ gr}$$

3. Dilakukan penimbangan bahan sesuai dengan yang diperlukan menggunakan timbangan.
4. Diukur volume aquadest yang di butuhkan yaitu sebanyak 225ml 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.

3.5.9. Prosedur Pemeriksaan Sampel

Hari pertama pemeriksaan :

Peralatan yang digunakan adalah ose bulat, kaki tiga, inkubator, api spirtus dan bunsen.

Prosedur pemeriksaan sampel yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
2. Menyalakan api spirtus dengan korek api.
3. Dilabeli masing-masing tabung sesuai dengan konsentrasinya, yaitu konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5625%, 0,78125%, 0,390%, 0,195% dan 0% atau C (Control).
4. Memanaskan ose bulat diatas nyala api spirtus, mengambil suspensi kuman *Shigella dysenterae* 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 dysenteriae* pada suspensi kuman dan membiakkannya pada tabung berlabel 50%, begitu seterusnya sampai pada tabung Control. Semua perlakuan dilakukan secara steril dekat dengan api.
5. Menutup kembali tabung dengan kapas berlemak
6. Menginkubasi 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.
5. Inkubasi kembali pada suhu 37°C selama 24 jam.

Hari ketiga :

1. Diamati hasilnya pada media padat apakah terbentuk koloni (abu-abu transparan) yang mengidentifikasi kuman tersebut adalah *Shigella dysenteriae*.
2. Dicatat konsentrasasi terkecil tadi sebagai daya hambat pertumbuhan kuman
3. Dicatat hasil yang di amati sebagai data.
4. Hasil yang positif ditanam ke media TSIA.

Hari keempat :

Mengamati hasil dari media TSIA yaitu bersifat alkali atau acid pada lereng dan dasar, H₂S, dan gas. Mencatat hasil dari media TSIA yang mengidentifikasi kuman tersebut adalah *Shigella dysenteriae*.

3.5.10. Tabulasi Data

Data yang diperoleh ditabulasikan sebagai berikut :

Tabel 3.1. Contoh tabulasi data

Pertumbuhan bakteri	Konsentrasi Perasan Buah Mengkudu											
	100 %	50 %	25 %	12,5 %	6,25 %	3,125 %	1,562 %	0,781 %	0,390 %	0,195 %	K	T
Tumbuh												
Tidak tumbuh												
Total												

Dengan keterangan :

Negatif (-) : Tidak terdapat pertumbuhan bakteri (jernih).

Positif (+) : Terdapat pertumbuhan bakteri (keruh) atau agak 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).