

BAB 3

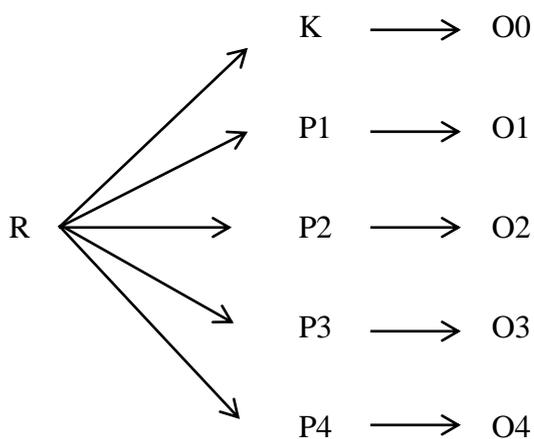
METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan tujuan untuk mengetahui konsentrasi perasan Batang Serai (*cymbopogon citratus*) yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysentriae*.

3.1.1 Desain penelitian

Dalam penelitian ini desain penelitian yang digunakan adalah desain Eksperimental Posttest only, yaitu dengan menempatkan sasaran atau obyek pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Pengamatan dilakukan setelah ada perlakuan.



Gambar 3.1 Desain penelitian (Zainuddin, 2003)

Keterangan :

- R : random
- K : kontrol (tanpa perlakuan) dengan konsentrasi 0%
- P₁ : pemberian perasan batang serai dengan konsentrasi 100%
- P₂ : pemberian perasan batang serai dengan konsentrasi 50%
- P₃ : pemberian perasan batang serai dengan konsentrasi 25%
- P₄ : pemberian perasan batang serai dengan konsentrasi 12,5%
- O₀ : hasil observasi pertumbuhan kuman tanpa adanya perlakuan 0%
- O₁ : observasi setelah pemberian perasan batang serai 100%
- O₂ : observasi setelah pemberian perasan batang serai 50%
- O₃ : observasi setelah pemberian perasan batang serai 25%
- O₄ : observasi setelah pemberian perasan batang serai 12,5%

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian**3.2.1 Populasi Penelitian**

Dalam penelitian ini, populasi yang diambil adalah dari biakan murni *Shigella dysentriae* yang dibeli di Fakultas Ilmu Kesehatan UNAIR.

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah biakan murni *Shigella dysentriae* yang dibeli di Fakultas Ilmu Kesehatan UNAIR. Untuk setiap perlakuan dalam penelitian dilakukan masing-masing sebanyak 5 perlakuan dan 5 pengulangan. Dilakukan 5 kali pengulangan dari rumus $(r - 1) (t - 1) \leq 15$, maka akan diperoleh jumlah ulangan sebagai berikut, jadi sampel sejumlah 25.

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

$$(r - 1) (5 - 1) \leq 15$$

$$(r - 1) 4 \leq 15$$

$$4r - 4 \leq 15$$

$$4r \geq 15 + 4$$

$$r \geq 4,75$$

$$\approx 5$$

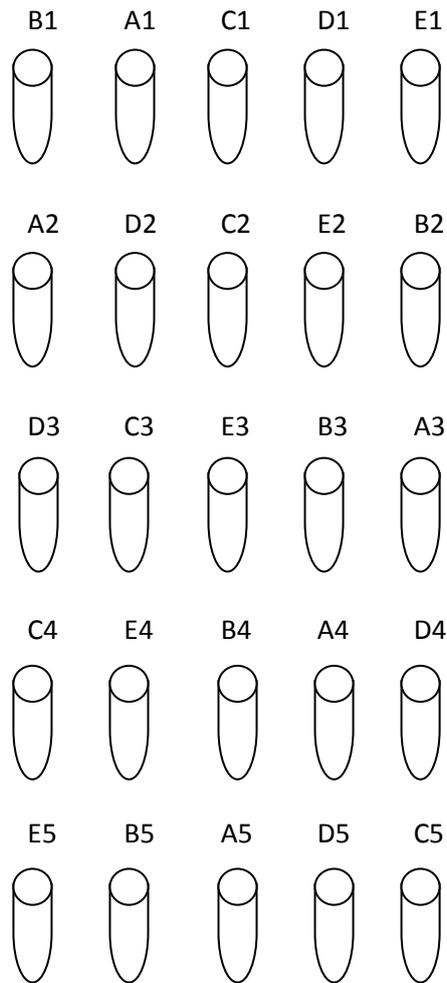
(Hidayat, 2010)

keterangan :

r : banyaknya pengulangan dari setiap perlakuan

t : jumlah dari setiap perlakuan

Teknik pengambilan sampel randomisasi secara kelompok



Gambar 3.2 Rancangan sampel randomisasi secara kelompok

Keterangan :

- A : Konsentrasi perasan batang serai 100%
- B : Konsentrasi perasan batang serai 50%
- C : Konsentrasi perasan batang serai 25%
- D : Konsentrasi perasan batang serai 12,5%
- E : Konsentrasi perasan batang serai 0%

3.3 Lokasi dan Waktu penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Jln Sutorejo, sedangkan pemeriksaan 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 Juli 2015, sedangkan Waktu pelaksanaan dilakukan pada bulan April 2015.

3.4 Variabel dan Definisi Oprasional

3.4.1 Variabel Penelitian

- Variabel bebas : Pemberian Konsentrasi perasan batang serai (*Cymbopogon citratus*).
- Variabel terikat : Pertumbuhan *Shigella dysenteriae*.
- Variabel kontrol : Lama inkubasi, suhu, volume perasan, jumlah suspensi kuman *Shigella dysenteriae*.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

1. Konsentrasi perasan batang serai dikategorikan menjadi 100%, 50%, 25%, 12,5% dan 0% (kontrol).
2. Pertumbuhan *Shigella dysenteriae* adalah jumlah koloni bakteri *Shigella dysenteriae* yang tumbuh di media MC (Mac Conkey) dengan satuan CFU.
3. Inkubasi 24 jam, suhu 37⁰ C, volume perasan 4ml.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data pertumbuhan bakteri *Shigella dysentriae* diperoleh dengan cara observasi tidak langsung, yaitu dengan melalui uji Laboratorium. Pemeriksaan jumlah koloni pada bakteri *Shigella dysentriae* ini menggunakan metode pengenceran. Langkah-langkah pemeriksaannya di antaranya sebagai berikut :

3.5.1 Prinsip Pemeriksaan

Senyawa antibakteri diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi. Kemudian masing-masing konsentrasi ditambahkan suspensi bakteri uji dalam media cair. Perlakuan tersebut akan diinkubasi dan diamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan terjadinya kekeruhan. Dilanjutkan masing-masing konsentrasi yang sudah ditambahkan suspensi bakteri diuji dalam media Mac Conkey. Perlakuan tersebut akan diinkubasi dan diamati jumlah koloni yang tumbuh.

3.5.2 Pembuatan suspensi kuman *Shigella dysentriae*

a. Alat :

Alat yang digunakan tabung reaksi, rak tabung, pipet ukur, ose bulat, api spirtus, filler, spuit.

b. Bahan yang digunakan untuk membuat suspensi kuman

Bahan yang digunakan suspensi kuman *Shigella dysentriae* dan Pz steril.

c. Reagen yang digunakan untuk standart Mc Farlan I

Reagen yang digunakan BaCL 1% dan H₂SO₄ 1%

d. Prosedure suspensi kuman sesuai dengan metode Mc Farlan I

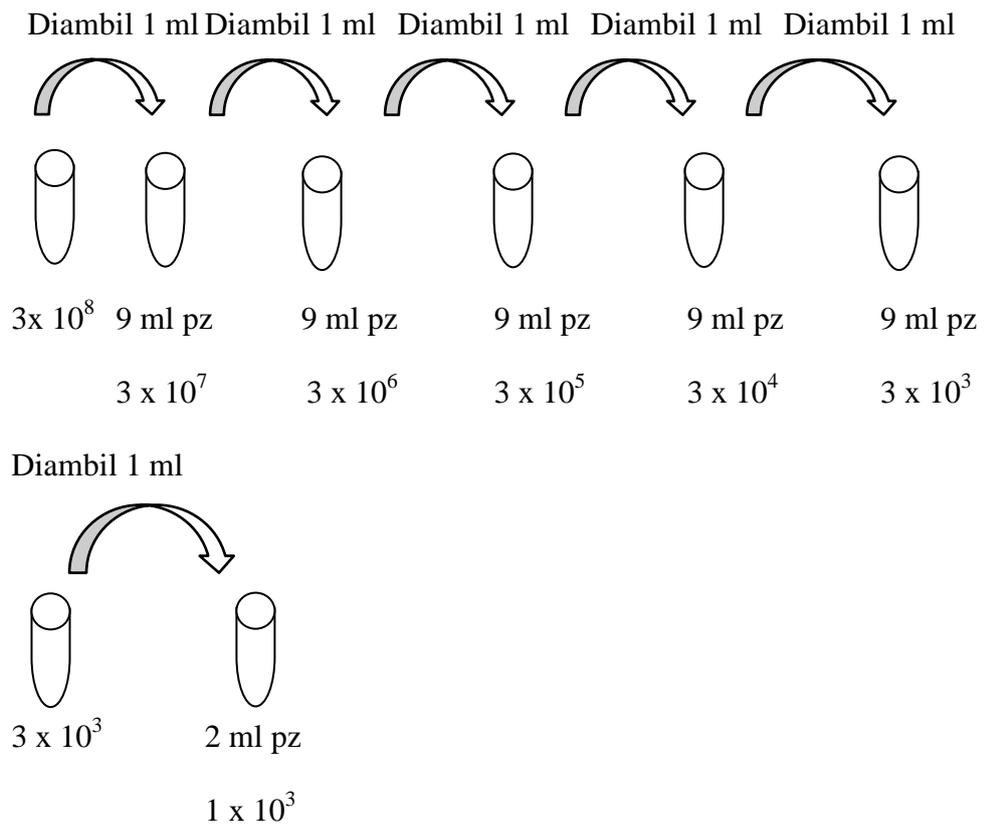
(Soemarno, 2000).

1. Prosedur membuat standart Mc Farlan I yaitu:
 - a. Menyiapkan tabung steril lalu membuat perbandingan antara BaCl 1% : H₂SO₄ 1 % sebesar 1 : 90
 - b. Memipet 0,1 ml BaCl 1 % + 9,9 ml H₂SO₄ 1 %
 - c. Menghomogenkan dengan cara kocok pelan tabung

Standart Mc Farlan I ini sama dengan tiap 1 ml nya mengandung 300 juta kuman.
2. Prosedur membuat suspensi kuman, yaitu:
 - a. Menyiapkan tabung steril lalu masukkan pz(NaCl 0,85%) steril.
 - b. Mengambil kuman dari biakan *Shigella dysentryae* murni yang sudah ditanam di media NAS dengan ose steril.
 - c. Menyelupkan ose steril yang sudah ada kumannya pada tabung yang berisi pz.
 - d. Membandingkan warna suspensi kuman dengan Mc Farlan 1.
 - e. Apabila warna kurang keruh, maka menambahkan kuman dengan ose steril dan apabila terlalu keruh menambahkan pz hingga warnanya sama dengan standart Mc Farlan I.

3. Pengenceran suspensi kuman

- a. Setelah didapatkan kuman yang sesuai standart Mc Farlan didapatkan hasil 1 : 300.000.000.
- b. Mengencerkan suspensi kuman sehingga mendapatkan hasil 1 : 1000.



4. Menstandartkan ose yang akan dipakai dalam penelitian:

- a. Menyiapkan pipet 0.1 ml dan filler serta tabung.
- b. Memipet aquadest 0.1 ml, kemudian menuanginya kedalam tabung.
- c. Menyalakan api spirtus.
- d. Mengambil 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.

e. Didapatkan 10 mata ose air tersebut habis.

$$\frac{0,1 \text{ ml}}{10} = \frac{1}{100}$$

1 mata ose = 100 (bila suspensi kuman permililiternya 1000 kuman)
(Soemarno, 2000).

3.5.3 Prosedur pembuatan Media Mac Conkey.

a. Alat :

Alat yang digunakan petridish steril, erlenmeyer, pipet pasteur, neraca triple beam balance, corong, gelas arloji, batang pengaduk, gelas ukur, api spirtus, inkubator.

b. Bahan yang digunakan untuk membuat media Mac Conkey

Bahan yang digunakan Mac Conkey, aquadest, dan kertas indikator pH.

c. Reagen yang digunakan untuk penetral media

Reagen yang digunakan HCL 0,1 N dan NaOH 0,1 N.

d. Prosedur pembuatan Mac Conkey

1. Melakukan perhitungan media Mac Conkey.

Membuat MC 25 plate, @ plate ± 17 ml

$$\text{Komposisi MC 50 gr per 1 liter} \rightarrow \frac{50 \text{ gr} \times 425 \text{ ml}}{1000} = 21,25 \text{ gr}$$

2. Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan.

3. Menimbang bahan (media MC) sesuai dengan perhitungan menggunakan timbangan neraca analitik.

4. Mengukur volume aquadest 425 ml menggunakan gelas ukur.
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest yang sudah diukur volumenya dalam erlenmeyer.
6. Memanaskan larutan diatas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih.
7. Mengangkat larutan yang sudah dipanaskan dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam – suam kuku.
8. Mengukur 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. Menutup 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. Mendinginkan sampai terlihat padat dan menyimpannya ke almari es (Soewarsono, 1993).

3.5.4 Prosedur pembuatan Media Nutrient Agar Plate.

a. Alat :

Alat yang digunakan Petridish steril, erlenmeyer, pipet pasteur, neraca triple beam balance, corong, gelas arloji, batang pengaduk, gelas ukur, api spirtus, inkubator.

b. Bahan yang digunakan untuk membuat media Nutrient Agar Plate

Bahan yang digunakan Nutrient agar, aquadest, dan kertas indikator pH.

c. Reagen yang digunakan untuk penetral media

Reagen yang digunakan HCL 0,1 N dan NaOH 0,1 N.

d. Prosedur pembuatan NAP

1. Melakukan perhitungan media NA

Membuat NAP 5 plate, @ plate ± 17 ml

Komposisi NA 20 gr per 1 liter → $\frac{20 \text{ gr} \times 85 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 1.7 \text{ gr}$

2. Menyiapkan alat dan bahan yang digunakan
3. Menimbang bahan (media NA) sesuai dengan perhitungan menggunakan timbangan neraca analitik.
4. Mengukur volume aquadest 85 ml menggunakan gelas ukur
5. Melarutkan bahan yang sudah ditimbang dengan aquadest yang sudah diukur volumenya dalam erlenmeyer.
6. Memanaskan larutan di atas api spirtus sampai larut sempurna, jangan sampai mendidih.
7. Mengangkat larutan yang sudah dipanaskan dan mendinginkannya dengan air yang sudah disiapkan dibaskom sampai suam – suam kuku.

8. Mengukur 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. Menutup 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. Mendinginkan sampai terlihat padat dan menyimpannya ke almari es (Soewarsono, 1993).

3.5.5. Prosedure pembuatan perasan batang serai.

a. Alat :

Alat yang digunakan Erlenmeyer, blender, corong, kertas saring, mortar, tabung, kasa steril, rak tabung, inkubator.

b. Bahan yang digunakan untuk membuat perasan batang serai

Bahan yang digunakan Batang serai dan Aquadest steril.

c. Teknik pengolahan batang serai yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mencuci bersih batang serai, kemudian dibilas dengan aquadest steril, setelah itu diblender sampai benar- benar halus.
2. Menyaring batang yang sudah ditumbuk tadi dengan kasa berlapis yang steril, menyaring sampai benar- benar jernih.

3. Mengambil 1 mata ose perasan yang sudah jernih secara steril, kemudian menanamnya ke media, dengan cara menggoreskannya dipermukaan media
4. Memasukan dalam inkubator dan Inkubasi selama 24 jam 37° C
5. Mengamati hasilnya, jika tidak terjadi pertumbuhan kuman berarti perasan batang serai tadi sudah benar– benar steril. Namun jika pada media *Nutrien Agar Plate* (NAP) terdapat pertumbuhan kuman, berarti perlu dilakukan proses tindalisasi, yaitu:
 - a. Memanaskan perasan batang serai dengan waterbath pada suhu 90⁰C selama 15 menit.
 - b. Kemudian meletakkannya diinkubator selama 24 jam pada suhu 37⁰C.
 - c. Mengulangi perlakuan tersebut sampai 3 kali.
 - d. Menanam kembali perasan batang serai yang sudah melalui proses tindalisasi dimedia Nutrient Agar Plate (NAP) dan menginkubasinya selama 24 jam pada suhu 37⁰C.
6. Mengamati hasilnya, jika tidak terjadi pertumbuhan kuman berarti perasan batang serai tadi sudah benar – benar steril.

3.5.6 Prosedur Pembuatan Konsentrasi Perasan Batang Serai

Membuat konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 0% Aquadest steril, yaitu:

Konsentrasi 100% :Tabung 1 mengisi 4 ml perasan awal, itu sebagai konsentrasi 100%

- Konsentrasi 50% :Pada tabung 2 mengisi 2 ml Aquadest steril menambahkan perasan batang serai konsentrasi 100% sebanyak 2 ml, menghomogenkan.
- Konsentrasi 25% :Pada tabung 3 mengisi 2 ml Aquadest steril menambahkan perasan batang serai konsentrasi 50% sebanyak 2 ml, menghomogenkan.
- Konsentrasi 12,5% :Pada tabung 4 mengisi 2 ml Aquadest steril menambah perasan batang serai konsentrasi 25% sebanyak 2 ml, menghomogenkan!
- Konsentrasi 0% :Pada tabung 5 diisi 2 ml Aquadest steril tanpa memberi tambahan perasan batang serai.

Hari pertama pemeriksaan :

1. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan
2. Menyalakan api spirtus dengan korek api.
3. Melabeli masing-masing tabung sesuai dengan konsentrasinya, yaitu konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5% dan 0% atau C (Control).
5. Memanaskan ose bulat di atas nyala api spirtus, mengambil suspensi kuman *Shigella dysentriae* sebanyak 1 mata ose dan membiakkan ditabung 100% dengan cara menggesekkan ose didinding permukaan

media cair sebanyak 3 kali. Kemudian mengambil 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.

6. Menutup kembali tabung dengan kapas berlemak.

7. Menginkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam.

Hari kedua :

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

2. Mengambil konsentrasi terkecil yang mulai terlihat keruh, dan menguji kembali pada media padat Mac Conkey (MC) dengan tujuan memastikan apakah kuman tersebut adalah *shigella dysenteriae*.

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

4. Menanam pada media padat dengan cara menggoreskan pada permukaan media.

5. Menginkubasi kembali pada suhu 37⁰C selama 24 jam

Hari ketiga :

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

2. Mencatat konsentrasasi terkecil tadi sebagai daya hambat pertumbuhan kuman.

3. Mencatat hasil yang di amati sebagai data.

3.6 Tabulasi Data

Data yang diperoleh ditabulasikan sebagai berikut :

Tabel 3.1. Contoh tabulasi data

No	Pengulangan	Jumlah koloni pada perlakuan konsentrasi,				
		100%	75%	50 %	25%	0% Kontrol
1	1					
2	2					
3	3					
4	4					
5	5					
Jumlah						
Rata-rata						

3.7 Metode Analisis Data

Setelah hasil diperoleh dari pemeriksaan laboratorium dan dikumpulkan dalam bentuk tabel, maka selanjutnya akan dianalisa menggunakan Anova dengan tujuan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian perasan batang serai (*Cymbopogon citratus*) terhadap koloni kuman *Shigella dysentriae* dengan tingkat kesalahan α (0,05).