BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental *post control group design* dengan menggunakan metode dilusi tabung untuk mengetahui pengaruh dekok seledri sebagai antimikroba terhadap *Shigella dysenteriae.*

4.2 Estimasi Jumlah Pengulangan Sampel

Jumlah pengulangan yang dipakai dalam penelitian ini dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$p\ (n-1) \geq 15$ (Solimun, 2001)

Keterangan: n = pengulangan

p = jumlah perlakuan

Dalam penelitian ini digunakan lima konsentrasi bertingkat dekok seledri, maka didapatkan pengulangan:

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

$5\ (n-1) \geq 15$

$5n-5 \geq 15$

$5n \geq 20$

$n \geq 4$

Jadi jumlah pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah 4 pengulangan.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan April 2013.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian terdiri atas variabel bebas dan variabel tergantung.

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi dekok seledri (*Apium graveolens* L.).

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kejernihan pada medium Nutrient Broth dan jumlah koloni *Shigella dysenteriae* yang tumbuh pada medium Nutrient Agar.

4.5 Definisi Operasional

- *Shigella dysenteriae* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- Seledri yang digunakan adalah seledri yang dibeli di pasar Blimbing kota Malang. Bagian tanaman yang digunakan adalah daun.
- Dekok seledri (*Apium graveolens* L.) yang digunakan dalam penelitian kali ini menggunakan pelarut air dengan metode dekok.
- Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan dekok seledri *(Apium graveolens)* yang mampu menghambat

pertumbuhan *Shigella dysenteriae* ditandai dengan penampakan yang jernih pada biakan, setelah diinkubasikan selama 18-24 jam.

- Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan dekok seledri (*Apium graveolens* L.) yang mampu membunuh *Shigella dysenteriae* ditandai dengan tidak terdapatnya pertumbuhan bakteri atau pertumbuhan koloninya < 0,1% dari jumlah koloni inokulum awal (*original inoculum*/OI).
- *Original inoculum* (OI) adalah inokulum bakteri dengan konsentrasi 10^6CFU/mL yang diinokulasikan pada media agar padat sebelum diinkubasi dan digunakan untuk menentukan kategori KBM.

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat

Spektrofotometer, filter Satorius, oven, rotavapor, waterbath, cawan petri, timbangan digital, labu erlenmeyer, ose lurus, gelas ukur, autoklaf, inkubator, pinset, mikropipet, rak tabung, bunsen, tebung reaksi, sarung tangan, dan masker.

4.6.2 Bahan

Nutrient Agar, Nutrient Broth, NaCl steril, dekok seledri, bakteri *Shigella dysenteriae,* dan akuades*.*

4.7 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian meliputi identifikasi *Shigella dysenteriae*, pembuatan dekok seledri (*Apium graveolens* L.), persiapan suspensi

Shigella dysenteriae, dan uji antimikroba dekok seledri (*Apium graveolens* L.) terhadap *Shigella dysenteriae.*

4.7.1 Identifikasi *Shigella dysenteriae*

4.7.1.1 Pewarnaan Gram

Bersihkan gelas obyek dengan kapas steril, kemudian lewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak. Biarkan dingin. Satu tetes aquades steril atau larutan saline diteteskan pada gelas obyek. Dengan ose jarum yang steril, diambil sedikit koloni *Shigella dysentriae* yang tumbuh pada medium padat kemudian disuspensikan dengan satu tetes aquades steril atau larutan saline yang sudah diteteskan terlebih dahulu pada gelas obyek. Hapusan sebaiknya dibuat tipis. Hapusan dibiarkan kering di udara. Setelah kering, fiksasi dengan cara melewatkan sediaan sebanyak 3 kali diatas api. Sediaan siap diwarnai.

Tuangi sediaan dengan *kristal violet* selama 1 menit, kemudian buang sisa *kristal violet* dan bilas dengan air. Tuangi sediaan dengan *lugol* selama 1 menit, kemudian buang sisa *lugol* dan bilas dengan air. Tuangi sediaan dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur, kemudian buang sisa alkohol dan bilas dengan air. Tuangi sediaan dengan *safranin* selama 30 detik, kemudian buang sisa *safranin* dan bilas dengan air. Keringkan dengan kertas penghisap. Lihat di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa obyektif 100x. Hasil positif : bakteri *Shigella dysentriae* berbentuk batang dan tercat merah (Gram negatif).

4.7.1.2 *Mac Conkey's Agar*

Dilakukan inokulasi bakteri *Shigella dysentriae* dengan metode *streaking* pada medium *Mac Conkey's Agar*. Inkubasikan pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18 - 24 jam dan diamati hasilnya. Hasil positif : ditemukan morfologi koloni bakteri *Shigella dysentriae* yang berbentuk oval, permukaannya datar dan halus, tepi tidak rata, tidak berbau dan khas didapatkan koloninya berwarna pucat (*non lactose fermenter*).

4.7.1.3 *Triple Sugar Iron Agar*

Dengan menggunakan ose, *Shigella dysentriae* ditanam dengan cara menusuk sampai dekat dasar tabung, kemudian menggoreskan ose tersebut secara zig-zag pada permukaan media. Tabung tidak boleh ditutup rapat. Kemudian inkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati hasilnya. Hasil positif : *Shigella dysentriae* meragikan glukosa, sehingga terbentuk dasar (*butt)* asam dan cekungan (*slant*) alkali pada *Triple Sugar Iron* (TSI) atau dapat dituliskan Alk/As. Bakteri ini tidak menghasilkan gas dan H_2S.

4.7.2 Pembuatan Dekok Seledri (*Apium graveolens* L.)

Pembuatan dekok seledri dimulai dari persiapan sampel seledri dan dilanjutkan pembuatan dekok seledri melalui proses dekok.

4.7.2.1 Persiapan sampel seledri (*Apium graveolens* L.)

Seledri dikumpulkan lalu di cuci bersih dan ditiriskan, kemudian daun dipotong kecil-kecil.

4.7.2.2 Pembuatan dekok seledri (*Apium graveolens* L.)

Daun seledri yang sudah disiapkan ditimbang sebanyak 100 gram, lalu daun tersebut dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer steril. Kemudian, ditambahkan 100 ml akuades steril ke dalam labu erlenmeyer. Labu erlenmeyer ditutup kapas lalu dipanaskan di dalam waterbath 100°C dan dibiarkan selama 30 menit. Kemudian, dekok disaring menggunakan filter Sartorius untuk sterilisasi. Lalu masukkan kedalam labu ukur dan ditambah akuades steril sehingga volumenya 100 ml. Dekok ini adalah konsentrasi inti 100% berat per volume.

4.7.3 Persiapan Suspensi *Shigella dysenteriae*

Dzen, *et al*. (2003) menjelaskan cara persiapan suspensi yang jumlah koloninya ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer. OD = 0,1 disebutkan setara dengan standar McFarland 0,5. Sementara itu, standar McFarland 0,5 setara dengan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 CFU/ml. Dengan demikian, persiapan suspensi uji *Shigella dysenteriae* dapat dilakukan sebagai berikut:

1) Dipersiapkan bakteri *Shigella dysenteriae.*
2) Ambil 5 koloni (d ≥ 1mm) dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,9% steril. Kemudian diukur *Optical Density* (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada λ = 625 nm. Dari hasil yang diperoleh dibuat suspensi sel yang mengandung $1x10^8$ CFU/ml dengan rumus:

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Keterangan :

N_1 = Hasil spektrofotometri

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N_2 = OD (0,1 setara dengan 10^8 CFU/ml)

V_2 = Volume suspensi bakteri uji (10 ml)

3) Untuk mendapatkan suspensi bakteri yang mengandung 10^6 CFU/ml yaitu dengan cara mengambil 1 ml (dari tabung yang mengandung 10^8 CFU/ml) untuk dicampur dengan 9 ml NaCl 0,9% steril. Maka akan didapatkan suspensi dengan kepadatan 10^7 CFU/ml. Dilanjutkan lagi dengan mengambil 1 ml lagi (dari tabung yang mengandung 10^7 CFU/ml) untuk dicampur dengan 9 ml Nutrient Broth sehingga didapatkan suspensi dengan kepadatan 10^6 CFU/ml.

4.7.4 Uji Antimikroba Dekok Seledri (*Apium graveolens* L.)

Sebelum dosis konsentrasi ditentukan, dilakukan eksplorasi (penelitian pendahuluan) terlebih dahulu. Penelitian pertama dilakukan dengan memakai konsentrasi 50%, 40%, 30%, 20%, dan 10%. Hasil pengamatan menunjukkan pada konsentrasi 50% koloni dapat dihitung dan pada konsentrasi yang lain koloni tumbuh menumpuk sehingga tidak dapat dihitung. Oleh karena itu pada penelitian selanjutnya dipakai konsentrasi 50%, 60%, 70%, 80%, dan 90%.

Hasil penelitian kedua menunjukkan bahwa tidak ada koloni yang tumbuh di Nutrient Agar pada konsentrasi 70%, 80%, dan 90% sehingga untuk uji antimikroba dekok seledri (*Apium graveolens* L.) terhadap *Shigella*

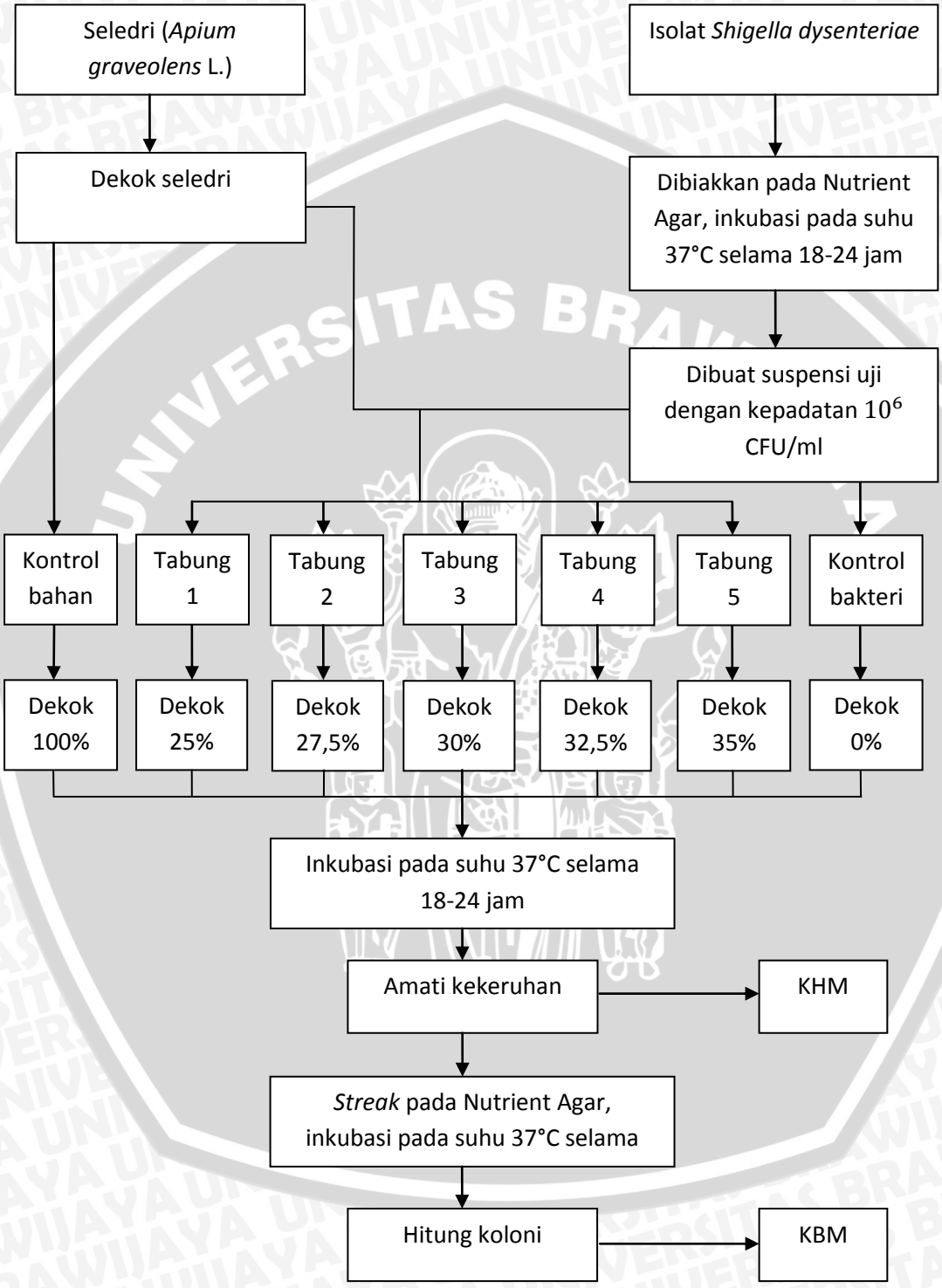
dysenteriae selanjutnya digunakan dosis konsentrasi dasar 50%, 55%, 60%, 65%, dan 70%.

Langkah-langkah dalam menyiapkan dosis konsentrasi bahan uji adalah sebagai berikut:

- Siapkan 7 tabung steril, beri tanda KK (kontrol bakteri), 1, 2, 3, 4, 5 dan KB (kontrol bahan). Kontrol bahan adalah dekok seledri 100%. Sementara kontrol kuman adalah biakan *Shigella dysenteriae* dengan kepadatan 10^6 CFU/ml.
- Pada tabung KK, masukkan 2 ml biakan *Shigella dysenteriae* dengan kepadatan 10^6 CFU/ml.
- Pada tabung 1, masukkan 0,5 ml aquades steril, lalu tambahkan 0,5 ml dekok seledri.
- Pada tabung 2, masukkan 0,45 ml aquades steril, lalu tambahkan 0,55 ml dekok seledri.
- Pada tabung 3, masukkan 0,4 ml aquades steril, lalu tambahkan 0,6 ml dekok seledri.
- Pada tabung 4, masukkan 0,35 ml aquades steril, lalu ditambahkan 0,65 ml dekok seledri.
- Pada tabung 5, masukkan 0,3 ml aquades steril, lalu ditambahkan 0,7 ml dekok seledri.
- Tambahkan 1 ml biakan cair *Shigella dysenteriae* kedalam tabung 1, 2, 3, 4, dan 5 sehingga didapatkan konsentrasi akhir masing-masing tabung 25%, 27,5%, 30%, 32,5%, dan 35%.
- Masukkan 2 ml dekok seledri ke dalam tabung bertanda KB (kontrol bahan).

- Semua tabung divortex kemudian diinkubasikan pada suhu 37^{o} C selama 18-24 jam.
- Setelah 18-24 jam, keluarkan semua tabung dari inkubator kemudian amati derajat kekeruhan pada tabung 1-5. Konsentrasi dekok seledri paling rendah yang tidak menunjukkan kekeruhan adalah KHM.
- Untuk mengetahui KBM, ambil satu ose larutan dari masing-masing tabung dilusi, kemudian lakukan penggoresan pada media Nutrient Agar, dan diinkubasikan pada suhu 37^{o} C selama 18-24 jam.
- Setelah 18-24 jam hitung jumlah koloni *Shigella dyseteriae* yang tumbuh dengan *colony counter*, konsentrasi terendah dengan jumlah koloni kurang dari 0,1% original inokulum adalah KBM.

Skema prosedur penelitian dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



Gambar 4.1 Alur Uji Antimikroba Dekok Seledri Terhadap *Shigella dysenteriae*

4.8 Analisis Data

Analisa data yang digunakan adalah uji statistik *One-Way ANOVA* dan uji statistik korelasi-regresi. Dengan menggunakan *One-Way ANOVA*, maka akan diketahui apakah ada pengaruh dari berbagai konsentrasi dekok seledri (*Apium graveolens* L.) terhadap *Shigella dysenteriae*. Sedangkan uji korelasi-regresi digunakan untuk menentukan besarnya pengaruh serta arah hubungan antara konsentrasi dekok seledri terhadap pertumbuhan *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*. Syarat untuk menggunakan uji *One-Way ANOVA* adalah distribusi data harus normal dan varians data harus homogen. Apabila syarat tidak terpenuhi maka dilakukan uji alternatif, yaitu uji *Kruskall-Wallis*. Analisis data dilakukan pada derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).