

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian dalam penelitian ini adalah eksperimental dan desain penelitian adalah *post-test only randomized controlled group design*.

3.2. Lokasi dan Waktu Penelitian

3.2.1. Waktu penelitian:

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober-Desember 2022.

3.2.2. Lokasi penelitian:

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Katolik Soegijapranata Semarang.

3.3. Subyek Penelitian

3.3.1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah *Shigella dysenteriae*.

3.3.2. Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah koloni *Shigella dysenteriae* yang dapat tumbuh pada media SSA (*Salmonella shigella agar*).

3.3.3. Teknik Sampling

Teknik sampling pada penelitian ini menggunakan teknik *simple random sampling*.

3.3.4. Besaran sampel

Pada penelitian ini pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan

rumus *Federer*, yaitu:

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

Dengan; t: banyaknya kelompok perlakuan

r: jumlah replikasi

Sampel yang dibutuhkan di penelitian ini:

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

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

$$6 (r - 1) \geq 15$$

$$6r - 6 \geq 15$$

$$6r \geq 21$$

$$r \geq 3,5 = r \geq 4$$

Rumus *Dropout* 10%:

$$n' = \frac{n}{1-f}$$

$$= \frac{4}{1-0,1} = 5$$

Berdasarkan rumus *Federer* diatas, maka didapatkan jumlah sampel setiap kelompok adalah 4 tetapi berdasarkan WHO terdapat cadangan 10% sehingga minimal jumlah sampel per kelompoknya adalah 5 dimana dalam penelitian ini memiliki 7 kelompok perlakuan sehingga seluruh besaran total sampel minimal 35 koloni *Shigella dysentriae*.

3.3.5. Kriteria Inklusi

1. Dapat tumbuh baik pada media SSA
2. Tidak terdapatnya pertumbuhan baik jamur maupun kontaminasi lain.

3.3.6. Kriteria Eksklusi

1. Terdapatnya pertumbuhan baik jamur maupun kontaminasi lain pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*).

2. Daya hambat yang terbentuk pada media MHA tidak dapat diukur dikarenakan batasnya yang kurang tegas atau tidak bening.
3. *Shigella dysenteriae* tidak terdapatnya pertumbuhan sempurna pada media MHA

3.3.7. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

3.3.7.1. Variabel Dependen

Daya hambat *Shigella dysenteriae*

3.3.7.2. Variabel Independen

Ekstrak bawang putih tunggal

3.3.7.3. Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Definisi operasional

NO	Variabel	Definisi operasional	Alat ukur	Hasil ukur	Skala
1	Ekstrak bawang putih tunggal	Pemberian ekstrak bawang putih tunggal dengan metode difusi disk dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%, 125%.	Mikropipet	Terdapat ekstrak bawang putih tunggal pada cakram dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%, 125%.	Ordinal
2	Daya hambat yang terbentuk	Terbentuknya zona berwarna bening yang menunjukkan hambatan pertumbuhan <i>Shigella dysenteriae</i> , perhitungan diameter zona bening menggunakan penggaris dengan skala mm	Penggaris	Diameter zona hambat sesuai dengan kontrol positif	Rasio

3.4. Instrumen Penelitian

3.4.1. Alat:

1. Tabung reaksi
2. Ose bulat
3. Bunsen
4. Mikropipet
5. Pinset
6. Cawan petri
7. Korek api
8. Tisu
9. Penggaris
10. Timbangan analitik
11. Lidi kapas
12. Blender
13. Spidol
14. Oven
15. Pisau
16. Stop watch
17. Kertas saring
18. Sarung tangan
19. Waterbath
20. Kertas bungkus
21. Rak tabung
22. Kamera
23. *Autoclave*
24. Alat tulis
25. Label
26. Inkubator
27. Gelas ukur
28. Tabung erlenmeyer
29. Lampu Spiritus

3.4.2. Bahan:

1. Bawang putih tunggal
2. Koloni *Shigella dysentriae* dalam media MHA
3. Pelarut etanol 96%
4. Media SSA
5. Cakram antibiotik ciprofloxacin
6. Cakram kosong
7. Aquadest
8. Barium clorida (BaCl_2) 1%
9. Asam sulfat (H_2SO_4) 1%
10. Media MHA

3.5. Prosedur pengambilan data

3.5.1. Sterilisasi alat dan bahan ⁴³

Alat-alat yang digunakan sebelumnya dilakukan sterilisasi terlebih dahulu dengan cara memasukan ke dalam *autoclave* dalam posisi terbungkus dengan kertas selama 15 menit pada suhu 121°C , dengan tekanan 1 atm.

3.5.2. Pembuatan Media SSA ⁴³

1. Siapkan alat dan bahan.
2. Suspensikan 5,68 gram media SSA dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer dan dilarutkan dengan 90 ml.
3. Dipanaskan sampai larut dengan baik.
4. Jangan dimasukkan ke dalam *autoclave* atau sampai panas karena dapat merusak selektifitas media.

5. Dinginkan pada suhu 45-50 °C.
6. Aduk rata dan tuangkan pada cawan petri.

3.5.3. Pembuatan media MHA (Mueller Hinton Agar) ⁴³

1. Siapkan alat dan bahan.
2. Suspensikan 38,0 gram media MHA dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer dan dilarutkan dengan 1000 ml.
3. Dipanaskan sampai larut dengan baik.
4. Masukkan ke dalam *autoclave* pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 lbs pada waktu 15 menit.
5. Dinginkan pada suhu 45-50 °C
6. Aduk rata dan tuangkan pada cawan petri.

3.5.4. Pembuatan biakan pada media SSA ⁴³

1. Siapkan alat dan bahan.
2. Media SSA dibagi menjadi 4 kuadran.
3. Ambil ose bulat kemudian panaskan sampai merah membara dan tunggu sampai panasnya hilang.
4. Panaskan mulut tabung dengan lampu spiritus.
5. Ambil suspensi bakteri menggunakan ose bulat dan goreskan pada media SSA pada kuadran 1, kuadran 2, kuadran 3, kuadran 4.
6. Tutup kembali cawan petri tersebut dan bungkus dengan kertas.
7. Inkubasi pada suhu 37 °C selama waktu 24 jam.
8. Semua prosedur dilakukan secara aseptis.

3.5.5. Pembuatan Ekstrak Bawang Putih Tunggal ⁸

1. Siapkan alat dan bahan.
2. Sebanyak 300 gram bawang putih tunggal dikupas terlebih dahulu.
3. Setelah dikupas kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 70°C selama 4,2 jam.
4. Lakukan penghalusan dengan blender sampai menjadi serbuk kering.
5. Lakukan perendaman dengan larutan etanol 96% sebanyak 3000 ml dan dicampur sekali-sekali selama 6 jam.
6. Ditunggu sampai 24 jam.
7. Lakukan penyaringan sebanyak dua kali menggunakan kertas saring.
8. Hasil saringan kemudian diuapkan dengan *waterbath* sampai kental.
9. Hasil ekstrak kemudian disimpan dalam suhu ruangan.

3.5.6. Pembuatan Konsentrasi Bawang Putih Tunggal ⁴³

1. Pembuatan konsentrasi ekstrak 0% : 10 ml aquades steril sebagai kontrol negatif.
2. Pembuatan konsentrasi ekstrak 25% : 2,5 gram ekstrak etanol bawang putih tunggal dan ditambahkan aquades sampai dengan 10 ml
3. Pembuatan konsentrasi ekstrak 50% : 5 gram ekstrak etanol bawang putih tunggal dan ditambahkan aquades sampai dengan 10 ml.
4. Pembuatan konsentrasi ekstrak 75% : 7,5 gram ekstrak etanol bawang putih tunggal dan ditambahkan aquades sampai dengan 10 ml

5. Pembuatan konsentrasi ekstrak 100% : 10 gram ekstrak etanol bawang putih tunggal dan ditambahkan aquades sampai dengan 10 ml
6. Pembuatan konsentrasi ekstrak 125% : 12,5 gram ekstrak etanol bawang putih tunggal dan ditambahkan aquades sampai dengan 10 ml
7. Rendam cakram kosong ke setiap konsentrasi selama 15-30 menit.

3.5.7. Proses pengujian ekstrak bawang putih tunggal terhadap *Shigella dysenteriae*

3.5.7.1. Pembagian kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

1. Kontrol negatif : *Shigella dysenteriae* + cakram tanpa ekstrak.
2. Kontrol positif : *Shigella dysenteriae* + cakram ciprofloxacin.
3. Kelompok perlakuan 1 : *Shigella dysenteriae* + ekstrak bawang putih tunggal 25%.
4. Kelompok perlakuan 2 : *Shigella dysenteriae* + ekstrak bawang putih tunggal 50%.
5. Kelompok perlakuan 3 : *Shigella dysenteriae* + ekstrak bawang putih tunggal 75%.
6. Kelompok perlakuan 4 : *Shigella dysenteriae* + ekstrak bawang putih tunggal 100%.
7. Kelompok perlakuan 5 : *Shigella dysenteriae* + ekstrak bawang putih tunggal 125%.

3.5.7.2. Cara pembuatan larutan Mc Farland ⁴⁴

1. Siapkan alat dan bahan.

2. Suspensikan 0,05 ml Barium Clorida (BaCl_2) 1% ke dalam aquades.
3. Tambahkan 9,95 ml asam sulfat (H_2SO_4) 1%.
4. Disimpan dalam tempat yang terhindar dari cahaya matahari.

3.5.7.3. Cara kerja penanaman *Shigella dysenteriae* pada media MHA⁴¹

1. Siapkan alat dan bahan.
2. Ambil suspensi bakteri menggunakan lidi kapas dan diperas pada dinding tabung.
3. Goreskan secara menyeluruh pada media MHA.
4. Lakukan inkubasi pada suhu selama 24 jam.

3.5.7.4. Uji ekstrak bawang putih tunggal dengan masing-masing konsentrasi⁴³

1. Letakkan cakram kontrol negatif, kontrol positif dan kelompok perlakuan 1-7 pada masing-masing koloni bakteri dan diberi keterangan.
2. Lakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
3. Amati dan hitung zona hambat yang terbentuk.
4. Zona hambat yang terbentuk akan diukur diameter vertikal dan horizontal dengan satuan milimeter (mm) dengan penggaris dan diukur dengan rumus sebagai berikut:

$$\frac{(D_v - D_c) + (D_h - D_c)}{2}$$

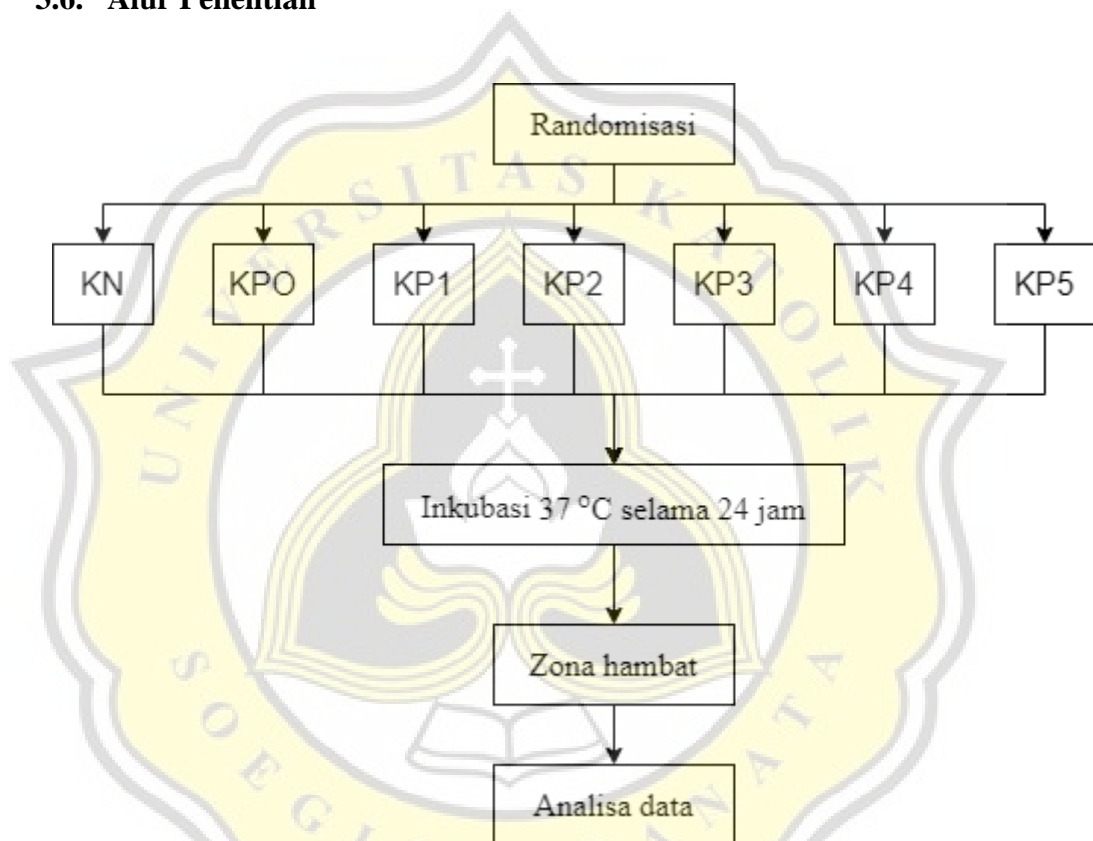
Keterangan:

Dv : Diameter vertikal

Dh : Diameter horizontal

Dc : Diameter cakram

3.6. Alur Penelitian



Bagan 3. 1 Alur Penelitian

Keterangan bagan:

1. KN (kontrol negatif) : *Shigella dysenteriae* + cakram tanpa ekstrak
2. KPO (kontrol positif) : *Shigella dysenteriae* + cakram ciprofloxacin
3. KP1 (kontrol perlakuan 1) : *Shigella dysenteriae* + ekstrak bawang putih tunggal 25%
4. KP2 (kontrol perlakuan 2) : *Shigella dysenteriae* + ekstrak bawang putih tunggal 50%

5. KP3 (kontrol perlakuan 3) : *Shigella dysenteriae* + ekstrak bawang putih tunggal 75%
6. KP4 (kontrol perlakuan 4) : *Shigella dysenteriae* + ekstrak bawang putih tunggal 100%
7. KP5 (kontrol perlakuan 5) : *Shigella dysenteriae* + ekstrak bawang putih tunggal 125%

3.7. Pengolahan dan Analisis Data

Pada penelitian ini dilakukan uji univariat untuk mendapatkan rata-rata yang dibuat dalam bentuk tabel atau grafik. Kemudian dilanjutkan dengan uji analisis bivariat dimana sebelumnya data dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Didapatkan distribusi tidak normal dan tidak homogen maka untuk mengetahui pengaruh ekstrak bawang putih tunggal terhadap daya hambat *Shigella dysenteriae* maka dilakukan uji *Kruskal-Wallis* dan jika terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok.