

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Uji Efektivitas Getah Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) sebagai Antibakteri *Shigella flexneri* Resisten Antibiotik dilaksanakan di Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Palembang pada bulan Agustus sampai September 2019.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan ialah Laminar Air Flow (LAF), autoclave, neraca analitik, inkubator, hot plate and magnetic stirrer, jarum ose, cawan petri, spatula, pinset, gelas ukur, tabung reaksi, labu erlenmeyer, becker glass, bunsen, rak tabung, penggaris, dan kertas cakram

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan ialah getah jarak pagar, bakteri *Shigella flexneri* resisten antibiotik, medium SSA (Salmonella Shigella Agar), medium MHA (Muller Hilton Agar), Alkohol 70 %, BaCl₂, H₂SO₄, dan Aquades.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan Eksperimen Laboratorium dengan rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100%, dan kontrol positif dengan lima kali ulangan (Darmawi dkk, 2013). Pengulangan dilakukan sebanyak 5 kali yang mengacu pada rumus federer yaitu:

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

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

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 5$$

Keterangan:

t: Jumlah Perlakuan

r: Jumlah Ulangan

Percobaan ini melibatkan 5 perlakuan konsentrasi (K) yaitu K₀ untuk kontrol, konsentrasi (K₁) 25%, konsentrasi (K₂) 50%, konsentrasi (K₃) 75%, dan konsentrasi (K₄) 100%. Pengulangan dilakukan sebanyak 5 kali pada setiap perlakuan. Oleh karena itu melibatkan 25 unit percobaan dan perlakuan dilakukan pengacakan terhadap 25 unit percobaan tersebut, sehingga bagan pengacakannya sebagai berikut.

Tabel 3.1 Kombinasi Perlakuan dan Ulangan yang Digunakan dalam Penelitian

Perlakuan	Ulangan				
	1	2	3	4	5
P₀	P ₀₁	P ₀₂	P ₀₃	P ₀₄	P ₀₅
P₁	P ₁₁	P ₁₂	P ₁₃	P ₁₄	P ₁₅
P₂	P ₂₁	P ₂₂	P ₂₃	P ₂₄	P ₂₅
P₃	P ₃₁	P ₃₂	P ₃₃	P ₃₄	P ₃₅
P₄	P ₄₁	P ₄₂	P ₄₃	P ₄₄	P ₄₅

Tabel 3.2 Kombinasi Perlakuan Hasil Pengacakan

No.	Baris Ke-				
	1	2	3	4	5
1	P ₁₄	P ₂₂	P ₄₁	P ₀₁	P ₁₅
2	P ₃₂	P ₁₁	P ₀₃	P ₄₄	P ₃₁
3	P ₂₄	P ₀₂	P ₁₂	P ₀₅	P ₄₅
4	P ₄₃	P ₃₃	P ₄₂	P ₂₅	P ₂₁
5	P ₀₄	P ₂₃	P ₁₃	P ₃₅	P ₃₄

Keterangan:

n : 1, 2, 3, 4, 5

P_{0n} : Perlakuan Kontrol Ulangan Ke- n

P_{1n} : Perlakuan 25% Ulangan Ke- n

P_{2n} : Perlakuan 50% Ulangan Ke- n

P_{3n} : Perlakuan 75% Ulangan Ke- n

P_{4n} : Perlakuan 100% Ulangan Ke- n

3.3.2 Prosedur Kerja

Adapun prosedur kerja penelitian ini ialah sebagai berikut:

1. Pembuatan Media

Media ditimbang dengan menggunakan neraca analitik lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian dilarutkan dalam air suling kemudian dilakukan pengaturan pH yaitu 7,0. Sterilisasi

media dilakukan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit (Yusraini, 2016).

2. Sterilisasi Alat

Sterilisasi menggunakan sterilisasi basah dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Yusraini, 2016).

3. Peremajaan Kultur Bakteri

Biakan murni bakteri *Shigella flexneri* resisten antibiotik diinokulasi pada media SSA (Salmonella Shigella Agar). Setelah itu diinkubasi dalam inkubator pada suhu $\pm 37^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam (Rahayu, 2016).

4. Pengambilan dan Pembuatan Konsentrasi Getah Jarak Pagar

Pengambilan getah tanaman dimodifikasi dari penelitian Chairani dkk (2018) dan Lestari dkk (2016) yaitu, batang percabangan pada pucuk dekat pertumbuhan buah disayat dan ditampung getahnya ke dalam botol steril yang bertutup dan berwarna coklat sebanyak 50 ml sebagai stok. Setelah itu, getah jarak pagar segar langsung dibawa ke laboatorium untuk dibuatkan pengenceran konsentrasi.

Pembuatan pengenceran konsentrasi getah yaitu 0, 25%, 50%, 75%, dan 100%. Menurut Saridewi dkk (2017), pengenceran dapat dilakukan dengan rumus sebagai berikut:

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

Keterangan:

M_1 : Konsentrasi sebelum pengenceran

M_2 : Konsentrasi setelah pengenceran

V_1 : Volume sebelum pengenceran

V_2 : Volume sesudah pengenceran

a. Konsentrasi 0 %

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 100\% = 10 \text{ ml} \times 0\%$$

$$V_1 = 0 \text{ ml}$$

b. Konsentrasi 25 %

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 100\% = 10 \text{ ml} \times 25\%$$

$$V_1 = 2,5 \text{ ml}$$

c. Konsentrasi 50 %

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 100\% = 10 \text{ ml} \times 50 \%$$

$$V_1 = 5 \text{ ml}$$

d. Konsentrasi 75 %

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 100\% = 10 \text{ ml} \times 75 \%$$

$$V_1 = 7,5 \text{ ml}$$

e. Konsentrasi 100 %

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 100\% = 10 \text{ ml} \times 100 \%$$

$$V_1 = 10 \text{ ml}$$

Berdasarkan perhitungan di atas didapat konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% seperti pada Tabel di bawah ini:

No.	V_1 (ml)	M_1	V_2 (ml)	M_2	Aquades (ml)
1.	2,5	100 %	10	25 %	7,5
2.	5	100 %	10	50 %	5
3.	7,5	100 %	10	75 %	2,5
4.	10	100 %	10	100 %	0

Keterangan:

V_1 : Volume getah konsentrasi 100% yang akan diencerkan.

V_2 : Volume getah yang akan dibuat yaitu 10 ml.

M_1 : Konsentrasi getah yang akan diencerkan yaitu konsentrasi 100%.

M_2 : Konsentrasi getah yang akan dibuat.

5. Pembuatan Larutan Kontrol

Larutan kontrol berfungsi sebagai berupa antibiotik ciprofloxacin (K+) dan aquades steril (K-). Cara pembuatan larutan ciprofloxacin (K+) dapat dilakukan sebagai berikut (Wangkanusa dkk, 2016):

- Satu tablet ciprofloxacin 500 mg digerus hingga halus.
- Kemudian ditimbang sebanyak 65 mg
- Setelah itu dilarutkan dalam 50 ml aquades

d. Selanjutnya diambil 1 ml larutan dan ditambahkan aquades hingga 10 ml untuk memperoleh larutan ciprofloxacin $5\mu\text{g} / 50\mu\text{l}$.

6. Pembuatan Standar Kekeruhan Mc. Farland

Standar Mc.farland 0,5 terdiri dari 0,05 mL larutan BaCl_2 dan 9,95 mL larutan H_2SO_4 1%, setara dengan kepadatan bakteri 10^8 CFU/mL (Sutton, 2011).

7. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Pembuatan suspensi bakteri uji dimodifikasi dari penelitian Rahayu (2016), adalah sebagai berikut:

- a. Diambil stok kultur bakteri *Shigella flexneri* resisten antibiotik dengan menggunakan jarum ose steril.
- b. Kemudian disuspensikan dalam ampul yang berisi 10 ml larutan NaCl fisiologis 0,9% sampai diperoleh kekeruhan yang sama dengan larutan standar Mc. Farland 0,5.

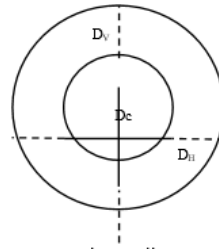
8. Pengujian Antibakteri

Metode pengujian antibakteri adalah Kirby Bauer, adapun cara pengujiannya dimodifikasi dari penelitian Darmawi dkk (2013) dan Sartika dkk (2013) yaitu sebagai berikut:

- a. Biakan *Shigella flexneri* resisten antibiotik yang homogen dengan standar kekeruhan Mc. Farland 0,5 ditanam pada permukaan media MHA dengan metode swab sebanyak $1000\mu\text{l}$ dan diratakan menggunakan kapas lidi steril.
- b. Kemudian diambil kertas cakram ditetaskan dengan menggunakan pipet mikro sebanyak $20\mu\text{l}$ pada masing-masing konsentrasi 25; 50; 75; dan 100% serta kontrol positif (Ciprofloxacin).
- c. Setelah itu kertas cakram diletakkan pada permukaan media Muller Hinton Agar (MHA) yang telah merata dengan biakan bakteri uji.
- d. kemudian diinkubasi suhu 37°C selama 24 jam dalam keadaan cawan petri terbalik.

9. Pengamatan Zona Hambat

Menurut Darmawi dkk (2013), pengamatan dilakukan dengan mengukur zona hambat yang terbentuk. Zona hambat dapat diartikan sebagai petunjuk adanya respon penghambatan mikroba oleh suatu zat tertentu. Pengukuran zona hambat dilakukan seperti pada gambar berikut (Toy dkk, 2015):



Gambar 3.1 Pengukuran Zona Hambat Antibakteri. Ket D_v Diameter vertikal; D_h Diameter horizontal; dan D_c Diameter cakram.

Rumus Pengukuran diameter zona hambat berikut ini (Tiwa dkk, 2017)

$$\frac{D_h + D_v}{2}$$

Keterangan:

D_v = Diameter vertikal

D_h = Diameter horizontal

Berdasarkan kekuatan daya hambat bakteri maka dapat dikategorikan adalah sebagai berikut (Davis dan Stout, 1971):

- Tidak terdapat zona hambat.
- Kekuatan daya hambat lemah yaitu zona hambat yang terbentuk < 5 mm.
- Kekuatan daya hambat sedang yaitu zona hambat yang terbentuk 5-10 mm.
- Kekuatan daya hambat kuat yaitu zona hambat yang terbentuk 11-20 mm.

e. Kekuatan daya hambat sangat kuat yaitu zona hambat yang terbentuk 21-30 mm.

Efektivitas zona hambat dapat dihitung berdasarkan persamaan berikut (Azis, 2019):

$$E = \left(\frac{D}{Da} \right) \times 100\%$$

Keterangan:

E = Efektivitas daya hambat (%)

D = Diameter zona hambat ekstrak bahan tumbuhan (mm)

Da = Diameter zona hambat antibiotik (mm)

3.4 Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis sidik ragam, kemudian dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ).

1. Analisis Sidik Ragam

Tabel 3.3 Tabulasi Data Hasil Pengamatan

Perlakuan	Ulangan					Jumlah (TP)	Rerata (\bar{y}_A)
	1	2	3	4	5		
P₀	P ₀₁	P ₀₂	P ₀₃	P ₀₄	P ₀₅	PA ₀	
P₁	P ₁₁	P ₁₂	P ₁₃	P ₁₄	P ₁₅	PA ₁	
P₂	P ₂₁	P ₂₂	P ₂₃	P ₂₄	P ₂₅	PA ₂	
P₃	P ₃₁	P ₃₂	P ₃₃	P ₃₄	P ₃₅	PA ₃	
P₄	P ₄₁	P ₄₂	P ₄₃	P ₄₄	P ₄₅	PA ₄	
Jumlah	T _{i1}	T _{i2}	T _{i3}	T _{i4}	T _{i5}	T _{ij}	

2. Jumlah Kuadrat (JK)

- FK = $\frac{T_{ij}^2}{r \times t}$
- JK_{total} = T(Y_{ij}²) - FK
= (Y₁₁² + Y_{ij}² ...) - FK
- JK_{perlakuan} = $\frac{TA^2}{r} - FK$
= $\frac{(TA_1^2 + TA_2^2 \dots) - FK}{r}$
- JK_{galat} = JK_{total} - JK_{perlakuan}

Tabel 3.4 Analisis Sidik Ragam (ANOVA) RAL

SK	DB	JK	KT	F hitung	F tabel 5% 1%
Perlakuan	t-1 = V ₁	JKP	$JKP/V_1 =$	KTP/KTG	F (V ₁ , V ₂)
Galat	(rt-1)-(t-1) = V ₂	JKG	$JKG/V_2 =$ KTP KTG		
Total	r-1	JKT			

KK =%

Keterangan : * = nyata (F hitung > F 5%)
** = sangat nyata (F hitung > 1 %)

e. Koefisien Keragaman (KK)

$$KK = \frac{\sqrt{KT \text{ galat}}}{\bar{y}} \times 100\%$$

$$\bar{y} = \frac{T_{ij}}{rt} = \frac{\sum y_{ij}}{rt}$$

Keterangan :

JK = jumlah kuadrat

KT = Kuadrat tengah

FK = faktor koreksi

t = perlakuan

r = ulangan

T = jumlah perlakuan

G = galat

Untuk melihat tiap perlakuan yang berbeda nyata maka dapat dilakukan uji lanjutan. Menurut Hanafiah (1997), untuk menentukan uji lanjut maka nilai koefisien keragaman harus diketahui terlebih dahulu. Ketentuan uji lanjut berdasarkan nilai KK sebagai berikut:

1. Nilai KK kurang dari 5 % maka uji lanjut yang dipakai ialah uji beda nyata jujur (BNJ).
2. Nilai KK 5 - 10 % maka uji lanjut yang dipakai ialah uji beda nyata terkecil (BNT).
3. Nilai KK lebih dari 10 % maka uji lanjut yang dipakai ialah uji Duncan.