

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 1 bulan, pada bulan Desember 2018 - Januari 2019 di Laboratorium IPA Universitas Islam Negeri Raden Fatah Palembang dan di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Palembang.

B. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen melalui pola Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima perlakuan (t) dan tiga kali ulangan (r). Penggunaan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pada penelitian ini dikarenakan kondisi lingkungan, suhu, alat, dan media yang digunakan homogen. RAL juga digunakan untuk mengetahui pengaruh antar perlakuan dalam penelitian. Sedangkan dilakukannya tiga kali ulangan dalam penelitian ini yaitu untuk menghasilkan estimasi (perkiraan) tentang galat dan menghasilkan ukuran pengaruh perlakuan-perlakuan yang lebih tepat terhadap hasil percobaan (Hanafiah, 2016).

Peneliti melakukan kombinasi konsentrasi dari penelitian sebelumnya, yaitu sebesar 20%, 40%, 60%, dan 80% dan satu perlakuan dengan menggunakan DMSO 10% sebagai kontrol negatif (Dandirwalu & Theopilus, 2015). Adapun perlakuan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Perlakuan dalam Penelitian

Konsentrasi Ulangan	K₀	K₁	K₂	K₃	K₄
1	K ₀₁	K ₁₁	K ₂₁	K ₃₁	K ₄₁
2	K ₀₂	K ₁₂	K ₂₂	K ₃₂	K ₄₂
3	K ₀₃	K ₁₃	K ₂₃	K ₃₃	K ₄₃

Keterangan : n = 1,2,3

K_{0n} = Kontrol negatif (dengan DMSO 10%) ulangan ke n

K_{1n} = Konsentrasi 20% ulangan ke n

K_{2n} = Konsentrasi 40% ulangan ke n

K_{3n} = Konsentrasi 60% ulangan ke n

K_{4n} = Konsentrasi 80% ulangan ke n

C. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, oven, soklet, ayakan, autoklaf, alluminium foil, gelas ukur, erlenmeyer, neraca analitik, penggaris, jarum ose, bunsen, pinset, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *hot plate*, blender, kertas cakram (*paper dish*), kertas saring, kapas, kamera, kalkulator, karet, pipet tetes, gunting, solasi, kertas payung, dan alat tulis.

2. Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak sirih cina (*Peperomia pellucida* L. Kunth) dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80% masing-masing sebanyak 20 ml, biakan murni *Shigella dysenteriae*,

metanol 96%, aquadest steril, medium *Nutriet Agar* (NA), NaCl fisiologi 0,9%, alkohol 70%, DMSO (*dimethylsulfoxide*) 10%.

D. Cara Kerja Penelitian

1. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian seperti *erlenmeyer*, cawan petri, tabung reaksi, gelas ukur, pipet tetes dan pengaduk disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan tekanan udara 1 atm pada suhu 121°C selama 15 menit, sedangkan alat-alat seperti jarum ose dan pinset disterilkan dengan alkohol 70 %. Namun untuk jarum ose dan pinset setelah disterilkan dengan alkohol 70% dibakar sebentar pada pembakar api bunsen (Assidqi, Wahyu, & Setyawati, 2012).

2. Pembuatan Medium *Nutriet Agar* (NA)

Nutrient agar ditimbang seberat 15 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer, ditambahkan dengan 1000 ml aquades, lalu dipanaskan di atas *hot plate* hingga mendidih sambil diaduk sampai homogen. Kemudian media disterilkan dengan cara bagian mulut erlenmeyer ditutup dengan kapas dan dengan kertas yang diikat dengan karet gelang. Setelah itu dimasukkan ke dalam autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C untuk disterilkan (Misna & Khusnul, 2016).

3. Peremajaan Bakteri Uji

Bakteri *Shigella dysenteriae*, diinokulasikan ke medium NA miring dengan cara mengambil sebanyak satu mata jarum ose secara aseptis lalu diinokulasikan dengan menggores pada medium NA miring. Selanjutnya

diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C sampai terjadi pertanaman (Muharni, Fitriya, & Sofa, 2017).

4. Pembuatan Suspensi Bakteri

Membuat larutan suspensi bakteri *Shigella dysenteriae* diambil 1 ose bakteri, dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan NaCl fisiologi 0,9% kemudian dihomogenkan. Kemudian disamakan dengan standar Mc. Farland yaitu dengan cara menyetarakan kekeruhannya dengan larutan standar Mc. Farland no. 0,5 yang setara dengan kepadatan bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (Misna & Khusnul, 2016).

5. Pembuatan Serbuk Simplisia Sirih Cina (*Peperomia pellucida* L. Kunth)

Sampel tanaman sirih cina (*Peperomia pellucida* L. Kunth) yang telah dikumpulkan ditimbang sebanyak 1000 gram, kemudian dibersihkan dari pengotor, dan dicuci dibawah air mengalir sampai bersih. Setelah itu ditiriskan, lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Sampel yang telah kering dihaluskan dengan menggunakan blender sampai menjadi serbuk. Serbuk yang dihasilkan diayak menggunakan ayakan, hingga diperoleh serbuk yang halus dan seragam. Hasilnya dimasukkan ke dalam wadah gelas tertutup (Pinta, Widya, & Paulin, 2017).

6. Pembuatan Ekstrak Sirih Cina (*Peperomia pellucida* L. Kunth) dengan Sokletasi

Alat sokletasi dipasang, sebanyak 100 gram serbuk sirih cina (*Peperomia pellucida* L. Kunth) dibungkus dengan kertas saring, diikat

dengan benang, dimasukkan ke dalam tabung soklet, labu soklet diisi dengan pelarut metanol 96% sebanyak 900 ml. Proses sokletasi dilakukan pada suhu 70°C sampai tetesan siklus tidak berwarna lagi. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian dievaporasi atau diuapkan di atas *hot plate* pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental (Nurhasnawati, Sukarmi, & Fitri, 2017).

Ekstrak kental yang diperoleh kemudian dibuat larutan konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80% dengan menambahkan pelarut DMSO 10%, menggunakan rumus sebagai berikut (Lampiran 3) (Petrucci, Harwood, Herring, & Madura, 2011):

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

Keterangan:

M_1 = Konsentrasi larutan stok ekstrak sirih cina

V_1 = Volume larutan stok ekstrak sirih cina yang harus dilarutkan

M_2 = Konsentrasi larutan ekstrak sirih cina yang diinginkan

V_2 = Volume larutan perlakuan yang diperlukan

7. Penanaman Bakteri Uji

Penanaman bakteri ke dalam medium menggunakan metode tuang, dimana suspensi bakteri sebanyak 1 ml dituang dahulu ke dalam cawan petri steril kemudian ditungkan medium NA sebanyak 18-20 ml. Medium NA yang dituang tidak dalam keadaan panas, tetapi dituangkan sebelum menjadi padat (Tandah, 2016).

8. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode cakram kertas. Kertas cakram (*paper dish*) berdiameter 5 mm direndam dalam ekstrak sirih cina (*Peperomia pellucida* L. Kunth) selama 15 menit sesuai dengan perlakuan. Kertas cakram yang telah direndam ditiriskan sampai tidak ada larutan yang menetes. Kemudian kertas cakram tersebut diletakkan diatas permukaan medium NA yang sebelumnya ditanam bakteri *Shigella dysenteriae* dengan jarak 2-3 cm dari pinggir cawan petri dengan menggunakan pinset steril dan ditekan sedikit. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Sari, Hasni, & Masroatun, 2017). Selama inkubasi akan terlihat diameter hambatan pertumbuhan bakteri disekitar cakram. Setelah itu dilakukan pengukuran zona hambatan yang terbentuk pada permukaan media.

Pengukuran zona hambatan dilakukan dengan mengukur area bening yang terbentuk di sekitar cakram kertas (Pratiwi, Tjiptasurasa, & Retno, 2011). Area bening merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap bahan antibakteri yang digunakan sebagai bahan uji yang dinyatakan dengan lebar diameter zona hambatan (Rastina, Mirnawati, & Letje, 2015). Zona hambatan yang terbentuk disekitar kertas cakram diukur diameter vertikal dan diameter horizontal dengan satuan mm menggunakan penggaris. Diameter zona hambatan diukur dengan rumus sebagai berikut (Toy, Benedictus, & Bernet, 2015):

$$\frac{(D_V - D_C) + (D_H - D_C)}{2}$$

Keterangan:

D_V : Diameter vertikal

D_H : Diameter Horizontal

D_C : Diameter cakram

Tabel 2. Kategori Penghambatan Antibakteri Berdasarkan Diameter Zona Hambat

Diameter Zona Hambat	Respon Hambat Pertumbuhan
≤ 5 mm	Lemah
6-10 mm	Sedang
11-20 mm	Kuat
≥ 21 mm	Sangat Kuat

Sumber: Riska & Puguh (2014) “dalam” Yanti & Sucia (2017)

E. Analisis Data

1. Analisis Varian (ANOVA)

Data uji aktivitas antibakteri dianalisis menggunakan ANOVA (uji F). Uji ANOVA (uji F) digunakan untuk menguji adanya pengaruh atau perbedaan antar perlakuan variasi konsentrasi ekstrak sirih cina (*Peperomia pellucida* L. Kunth) terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*. Perhitungan uji ANOVA (uji F) dilakukan dengan menggunakan program SPSS versi 16.

Untuk menentukan zona hambat bakteri diantara perlakuan dilakukan dengan menggunakan uji F, yaitu dengan membandingkan F_{hitung} dengan F_{tabel} dengan ketentuan sebagai berikut:

1. Jika $F_{hitung} > F_{1\%}$ maka H_a diterima pada taraf uji 1%, artinya sangat berbeda nyata. Hal ini ditunjukkan dengan menempatkan dua bintang (**) pada nilai F_{hitung} dalam sidik ragam.

2. Jika $F_{hitung} < F_{1\%}$ maka H_0 diterima pada taraf 1%, artinya tidak berbeda nyata = (*non significant difference*). Hal ini ditunjukkan dengan menempatkan tanda (^{tn}) pada nilai F_{hitung} dalam sidik ragam.

2. Uji Lanjut Penelitian

Setelah H_0 ditolak, maka langkah selanjutnya ingin diketahui antar perlakuan (rata-rata) mana yang berbeda nyata. Maka untuk mengetahui hal tersebut dalam hal ini dilakukan uji nilai tengah (rata-rata) antar perlakuan dengan menggunakan Uji Beda Jarak Nyata Duncan (BJND). Penggunaan uji lanjut pada parameter penelitian ini berdasarkan atas nilai KK dengan kriteria sebagai berikut (Hanafiah, 2016):

1. Jika KK besar, (minimal 10% pada kondisi homogen atau minimal 20% pada kondisi heterogen), uji lanjut yang sebaiknya digunakan adalah uji Duncan, karena uji ini dapat dikatakan yang paling teliti.
2. Jika KK sedang, (antara 5-10% pada kondisi homogen atau antara 10-20% pada kondisi heterogen), uji lanjut yang sebaiknya digunakan adalah uji BNT (Beda Nyata Terkecil) karena uji ini juga dapat berketelitian sedang.
3. Jika KK kecil, (antara 5% pada kondisi homogen atau maksimal 10% pada kondisi heterogen), uji lanjut yang sebaiknya digunakan adalah uji BNJ (Beda Nyata Jujur) karena uji ini kurang teliti.