

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Microbiology E 303 Universitas Islam Negeri Raden Fatah Palembang. Penelitian ini dilaksanakan mulai dari bulan Oktober sampai November 2022. Penelitian ini merupakan penelitian mengenai uji aktivitas antibakteri ekstrak batang sungkai (*Peronema canescens* Jack) yang diambil dari kota Palembang dan sumbernya berupa buku pedoman praktikum pada siswa SMA/MA.

3.2 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimen dengan rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari 5 perlakuan dan 3 pengulangan. Penelitian eksperimen merupakan penelitian yang melakukan uji coba atau pengamatan khusus untuk membuktikan sesuatu yang bersifat meragukan dan dalam kondisi yang ditentukan oleh peneliti (Nindhia, 2013).

Pada penelitian ini digunakan metode difusi cakram sebagai tolak ukur untuk mengetahui adanya aktivitas ekstrak batang sungkai (*Peronema canescens*) sebagai antibakteri terhadap *Salmonella typhi*. Metode difusi cakram merupakan metode yang sederhana dan mudah dilakukan untuk menentukan aktivitas mikroba, yaitu dengan mengamati zona hambat yang terbentuk pada uji cakram (Kusriani, 2013).

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan (t) dan 3 pengulangan (r). Penggunaan rancangan acak lengkap pada penelitian ini dikarenakan kondisi lingkungan, suhu, media dan alat yang digunakan homogen. Selain itu, RAL digunakan untuk mengetahui pengaruh antar perlakuan dan pengulangan dalam penelitian. Dilakukannya 3 pengulangan dalam penelitian ini yaitu untuk menghasilkan estimasi tentang galat dan menghasilkan ukuran pengaruh perlakuan-perlakuan yang lebih tepat terhadap hasil percobaan (Hanafiah, 2016).

Dalam penelitian ini menggunakan konsentrasi perlakuan 50%, 75%, dan 100% dengan 2 kontrol pembanding yaitu control negatif menggunakan DMSO dan control positif menggunakan *tetrasiklin*. masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali pengulangan.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Pada penelitian ini variabel bebas yang digunakan adalah konsentrasi ekstrak batang sungkai (*Peronema canescens*) 50%, 75% dan 100%.

3.4.2 Variabel Terikat

Pada penelitian variabel terikat yang digunakan adalah hasil pengukuran zona hambat (mm) setelah uji aktivitas antibakteri *Salmonella typhi* pada media Agar Mueller Hinton (MHA).

3.5 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi atau sampel pada metode eksperimen ini merupakan pendekatan penelitian yang cukup khas, kekhasan itu diperlihatkan oleh dua hal, yang pertama penelitian eksperimen menguji secara langsung pengaruh suatu variabel terhadap variabel lain, kedua menguji hipotesis hubungan sebab akibat. Penelitian eksperimen dalam pembelajaran merupakan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui atau tidaknya akibat dari suatu perlakuan kegiatan pembelajaran dengan pendekatan, metode, strategi atau media tertentu (Sukmadinata, 2008).

Dalam penelitian ini populasi yang diambil adalah uji aktivitas antibakteri ekstrak batang sungkai (*Peronema canescens*). Sampel yang digunakan yaitu batang tanaman sungkai (*Peronema canescens*). Dimana sampel diambil di wilayah kota Palembang yang kemudian akan diuji apakah batang pada tanaman sungkai berpotensi sebagai antibakteri.

3.6 Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

Keseluruhan alat yang digunakan ini yaitu: Cawan petri, tabung reaksi, mikro pipet dan tube, pinset, kertas cakram, botol vial, bunsen, cotunbude, autoclave, LAF, colony counter.

3.6.2 Bahan Penelitian

Keseluruhan bahan yang digunakan ini yaitu: Aquades, bakteri *Salmonella typhi*, DMSO, ekstrak batang dengan beberapa konsnetrasi, media MHA.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Pembuatan Ekstrak Batang Sungkai (*Peronema Canescens*)

Batang sungkai (*Peronema canescens* Jack) diperoleh dari sekitaran kawasan daerah Palembang yang kemudian dibersihkan dengan menggunakan air mengalir dan ditiriskan, dipotong-potong halus kemudian dikeringkan tanpa sinar matahari langsung hingga diperoleh simplisia ataupun oven sekitar suhu 50°C. Selanjutnya dilakukan meserasi dengan menggunakan pelarut metanol dan didiamkan selama 2 harian. Kemudian filtrat dipekatkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* (Nasrudin, *et al.*, 2017).

3.7.2 Pembuatan Media MHA

Untuk membuat MHA yang diperlukan yakni 4 gram/ 600 ml aquades kemudian timbang medium menggunakan timbangan analitik agar lebih presisi lalu larutkan 4 gram MHA medium kedalam 600 ml aquades dengan cara dipanaskan pada suhu 80°C sambil diaduk menggunakan hot plate, pastikan medium larut dengan sempurna dan tidak terjadi penggumpalan. Media Mueller Hinton Agar (MHA) adalah media terbaik untuk pemeriksaan sensibilitas tes (Dengan metode Kirby-Bauer) pada bakteri non-fastidirus (Baik aerob dan anaerob fakultatif), Media MHA ini digunakan untuk uji zona hambat dalam cawan petri dimana MHA sendiri memiliki kandungan nutrisi yang baik untuk kultur kebanyakan bakteri selain itu MHA juga bersifat netral sehingga tidak menimbulkan pengaruh terhadap prosedur uji antibakteri (Girardello, *et al.*, 2012).

3.7.3 Sterilisasi Media dan Alat

Untuk antibakteri yang perlu di sterilisasi adaah Media MHA, Cawan Petri, Tabung reaksi yang sudah diisi media kemudian aquades secukupnya, Cakram, Cottonbu, Pipet tip. Sterilisasi adalah suatu proses untuk membuat atau benda menjadi steril atau proses untuk membunuh semua jasad renik yang ada sehingga jika ditumbuhkan didalam suatu medium tidak ada jasad renik yang berkembang biak sterilisasi harus dapat membunuh jasad renik yang paling tahan panas yaitu spora bakteri (Dewi, *et al.* 2017).

3.7.4 Tuang Media pada Cawan Petri

Media yang telah disediakan kemudian tuang media pada cawan petri sampai padat dan tuang juga media di tabung rekasi. Media tuang adalah suatu teknik untuk menumbuhkan mikroorganisme didalam media agar dengan cara mencampurkan media yang masih cair dengan stok kultur bakteri sehingga sel- sel tersebar merata dan diam dengan baik dipermukaan agar atau didalam agar (Krisno, 2011) Kemudian tanam bakteri pada media padat selama 1x24 jam.

3.7.5 Uji Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram pada media dalam cawan petri kemudian digoreskan pada media MHA dengan cotunbude yang sudah di steril diatas media uji (Milanda, 2017). Uji Antibakteri adalah teknik untuk mengukur berapa besar potensi atau konsentrasi suatu senyawa untuk dapat memberikan efek bagi Mikroorganisme. (Dart, 1996 ; Ayu, 2004). Uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan untuk mengetahui sejauh mana aktivitas suatu bakteri terhadap antibakteri. Antibakteri dalam definisi yang luas diartikan suatu zat yang

dapat mencegah terjadinya pertumbuhan dan reproduksi bakteri. Mikroorganisme dapat dihambat atau dibunuh dengan proses fisik dan kimia.

1. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak

Pengambilan bahan untuk pembuatan konsentrasi ekstrak dilakukan dengan menggunakan mikropipet. Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 50%, 75% dan 100%. Menurut Prasetyo (2013), pembuatan konsentrasi ekstrak dilakukan berdasarkan rumus sebagai berikut:

$$N1 \cdot V1 = N2 \cdot V2$$

Keterangan:

N1 = Konsentrasi awal

V1 = Volume yang dicari

N2 = Konsentrasi yang diinginkan

V2 = Volume yang diinginkan

Dimana untuk pembuatan konsentrasi ekstrak sebagai berikut :

a. 100%

$$= 100\% \cdot V1 = 100\% \cdot 5 \text{ ml}$$

$$V1 = \frac{100\%}{100\%} \times 5 \text{ ml}$$

$$= 5 \text{ ml} = 5 \text{ gram} + 5 \text{ DMSO}$$

b. 75%

$$= 100\% = 75\% \cdot 5 \text{ ml}$$

$$= \frac{75\%}{100\%} \times 5 \text{ ml} = 3,75\%$$

= ekstrak dari 100%

= 1,25 DMSO

c. 50%

100% = 50% . 5 ml

$$= \frac{50\%}{100\%} \times 5 \text{ ml} = 2,5 \text{ ml} + 2,5 \text{ DMSO}$$

2. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri diawali dengan mengencerkan bakteri *Salmonella typhi* berumur 24 jam ke dalam 1 ml aquades. Homogenisasikan suspensi tersebut sampai warna menjadi keruh. Kemudian diambil menggunakan mikropipet sebanyak 100 µl ke dalam cawan petri berisi media MHA lalu digores secara zigzag menggunakan jarum ose sampai suspensi bakteri merata di seluruh media menggunakan cotunbude. Lakukan hal yang sama sampai mendapatkan 6 petri suspensi bakteri.

3. Pengujian Antibakteri

Aktivitas antimikrobal dilakukan dengan berdasarkan metode Kirby-Bauer atau yang disebut dengan cakram kertas. Cakram kertas yang akan dilakukan untuk uji antimikrobal disterilisasi terlebih dahulu sebelum digunakan untuk uji aktivitas antimikroba. Kertas cakram yang steril, dimasukkan ke dalam masing-masing botol vial berisi konsentrasi ekstrak fungi yang telah dibuat yaitu 50%, 75% dan 100% masing-masing diberi sebanyak 3 cakram lalu ditiriskan. Kertas cakram yang telah ditiriskan kemudian diletakkan menggunakan pinset steril di atas medium MHA yang berisi bakteri *Salmonella typhi*. Letakkan sesuai label yang ditandai dengan menekan sedikit kertas cakram ke dalam media.

Masing-masing sampel uji aktivitas bakteri diinkubasi pada suhu 37°C 24 jam. Eksperimen ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Aktivitas antimikroba akan ditandai dengan terbentuknya zona hambat yang mengindikasikan terhambatnya aktivitas mikroorganisme oleh ekstrak batang sungkai (*Peronema canescens*). Aktivitas antibakteri dan diameter zona hambat ditentukan dengan rumus (Elfita *et al.* 2022) : Kuat ($\frac{A}{B} \times 100\% > 70\%$) ; Sedang ($50\% < \frac{A}{B} \times 100\% < 70\%$); Lemah ($\frac{A}{B} \times 100\% < 50\%$).

4. Kontrol Negatif dan Kontrol Positif

Pada penelitian ini digunakan 2 kontrol sebagai pembanding yakni kontrol positif (tetrasiklin) dan negatif DMSO. Pembuatan suspensi kontrol positif yaitu dengan cara menimbang tetrasiklin sebanyak 0,003 gram lalu dilarutkan ke dalam 1 ml DMSO. Sedangkan untuk kontrol negatif menggunakan 1 ml DMSO. Kertas cakram yang steril kemudian direndam dalam larutan kontrol positif dan kontrol negatif, masing-masing diberi 3 kertas cakram kemudian ditiriskan. Kertas cakram yang telah ditiriskan kemudian diletakkan menggunakan pinset steril di atas medium MHA yang berisi bakteri *Salmonella typhi*. Letakkan sesuai label yang ditandai dengan menekan sedikit kertas cakram ke dalam media. Masing-masing sampel uji aktivitas bakteri diinkubasi pada suhu 37°C 24 jam. Eksperimen ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

3.7.6 Tahap pengamatan

Setelah medium pembiakan bakteri diberikan perlakuan dan diinkubasi dengan suhu 37°C selama 1×24 jam, selanjutnya melakukan pengamatan dengan

cara mendokumentasikan hasil tersebut dan diukur zona hambat dari setiap konsentrasi dan kontrol menggunakan aplikasi imagej.

3.8 Teknik Pengumpulan Data

Adapun teknik pengumpulan data yang digunakan adalah mengetahui adanya aktivitas antibakteri pada ekstrak batang sungkai terhadap bakteri *Salmonella typhi* kemudian data hasil penelitian berupa hasil pengukuran zona hambat (mm) disajikan dalam bentuk tabel, sedangkan data berupa zona hambat. Data berupa hasil pengukuran dibuat dengan standar deviasi, dimana nilai standar deviasi berasal dari zona hambat yang terbentuk dari hasil uji antibakteri yang diperlukan pada beberapa pengulangan. Zona hambat tersebut diukur diameternya dalam satuan milimeter (mm) menggunakan aplikasi imagej.

3.9 Teknik Analisis Data

Analisis data yang digunakan untuk mengetahui aktivitas ekstrak batang tanaman sungkai (*Peronema canescens*) dengan bakteri *Salmonella typhi* dilakukan uji statistik ANOVA *One Way* dengan menggunakan software excel, dan uji lanjut menggunakan Beda Nyata Jujur (BNJ) 5 %. Perhitungan dilakukan dengan mengukur zona hambat terluar dengan konsentrasi 50%, 75%, dan 100% menggunakan 5 perlakuan dan 3 pengulangan.

Sedangkan untuk sumbangsih berupa buku pedoman praktikum analisis datanya berisikan tata tertib praktikum dan praktikum sederhana uji aktivitas antibakteri. Setelah diperoleh data kualitatif selanjutnya data akan diubah menjadi data kuantitatif untuk mengetahui tingkat kevalidan buku pedoman praktikum yang dikembangkan. Terdapat rumus yang digunakan untuk memperoleh rata-rata skor

yang diperoleh pada angket validitasi, yaitu sebagai berikut (Nugroho & Hendrastomo, 2021) :

$$\tilde{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Keterangan :

\tilde{x} = Skor rata-rata

$\sum x$ = Jumlah Skor

n = Jumlah butir

Tabel 3.9. Pedoman Hasil Validasi Ahli

Setelah pengambilan keputusan validasi dari para validator maka pedoman hasilnya dapat dilihat pada tabel berikut ini :

| No | Rumus | Kategori |
|----|--------------------|---------------------|
| 1 | $X > 4,2$ | Sangat Layak |
| 2 | $3,4 < X \leq 4,2$ | Layak |
| 3 | $2,6 < X \leq 3,4$ | Cukup Layak |
| 4 | $1,8 < X \leq 2,6$ | Kurang layak |
| 5 | $X \leq 1,8$ | Sangat Kurang Layak |

Sumber : (Nugroho & Hendrastomo, 2021)