

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental dengan desain penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL).

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Tempat penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Analis Kesehatan Politeknik Kesehatan Tanjungkarang. Proses determinasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung dan proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Universitas Lampung.

2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Mei - Juni 2021.

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini yaitu daun pare (*Momordica charantia L.*) dengan ciri-ciri yaitu daun pare muda berbentuk bulat telur, berbulu, dan berlekuk, daunnya berwarna hijau tua di bagian permukaan atas dan permukaan bawahnya berwarna hijau muda, panjang 7 cm dan lebarnya 10 cm yang kemudian dibuat ekstrak dengan pelarut etanol 96 % dan dilakukan pengenceran dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100% yang digunakan sebagai larutan uji. Bakteri *Salmonella typhosa* ATCC 14028 diperoleh dari Universitas Indonesia. Jumlah perlakuan ekstrak daun pare masing-masing 10 perlakuan dengan 3 kali pengulangan yang didapatkan dari perhitungan menggunakan rumus Federer, yaitu $(t-1)(r-1) \geq 15$.

D. Variabel Dan Definisi Operasional Penelitian

Tabel 3.1 Variabel Dan Definisi Operasional Penelitian

No	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Variabel Bebas: Ekstrak Daun Pare (<i>Momordica Charantia L.</i>)	Daun Pare dengan ciri-ciri yaitu Daun pare muda berbentuk bulat telur, berbulu, dan berlekuk. Daunnya berwarna hijau tua di bagian permukaan atas dan permukaan bawahnya berwarna hijau muda, panjang 7 cm dan lebarnya 10 cm dibuat ekstrak dan dilakukan pengenceran.	Ekstrak etanol daun pare dengan metode maserasi kemudian diencerkan dengan rumus $V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$	Pipet Ukur dan Labu Ukur	Ekstrak daun pare konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100%.	Interval
2	Variabel terikat : Pertumbuhan bakteri <i>Salmonella typhosa</i> ATCC 14028 dapat dihambat	<i>Salmonella typhosa</i> yang pertumbuhannya dihambat oleh ekstrak daun pare	Diameter zona hambat	Jangka Sorong	Efektif jika diameter zona hambat ≥ 18 cm dan tidak efektif jika diameter zona hambat ≤ 18 mm. Diameter zona hambat dibandingkan dengan antibiotik kloramfenikol 30 μ g	Ordinal

E. Teknik Pengumpulan Data

1. Prosedur Pemeriksaan

- a. Pembuatan surat izin penelitian dan pemesana strain bakteri *Salmonella typhosa* ATCC 14028 yang berasal dari Universitas Indonesia.
- b. Determinasi bahan uji yaitu daun pare di Laboratorium Botani Fakultas MIPA Biologi Universitas Lampung.
- c. Pembuatan simplisia daun pare.
- d. Ekstraksi daun pare menggunakan pelarut etanol 96% dengan metode maserasi lalu dilanjutkan dengan evaporasi untuk menghilangkan zat pelarut di laboratorium Kimia Organik MIPA Universitas Lampung.
- e. Pengenceran ekstrak daun pare menjadi konsentrasi 10%, 20%,30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan 100%.
- f. Identifikasi bakteri *Salmonella typhosa* ATCC 14028.
- g. Peremajaan bakteri *Salmonella typhosa* ATCC 14028.
- h. Pengujian ekstrak daun pare terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhosa* ATCC 14028 dengan metode difusi agar cara Kirby Bauer.
- i. Pengukuran zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi dan diukur menggunakan alat ukur jangka sorong dalam satuan mm.

2. Metode Pemeriksaan

Metode pemeriksaan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu difusi cakram dengan cara Kirby bauer.

3. Prinsip Pemeriksaan

Cakram kertas yang mengandung sejumlah tertentu obat ditempatkan di atas permukaan medium padat yang telah diinokulasi pada permukaan dengan organisme uji. Diameter zona jernih inhibisi di sekitar cakram diukur kekuatan inhibisi obat melawan organisme uji tertentu (Jawetz, 2005).

4. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian yaitu, tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan petri besar, mikropipet dan tip, incubator, autoclave, labu erlenmeyer, pipet ukur, vacum pump, ose, disk cakram steril, lampu spirtus, pinset, neraca analitik, lidi kapas steril, kapas, botol gelap, beaker glass, wadah sampel, kertas kopi, oven, corong gelas, vortec mixe, hot plate, korek api, jangka sorong, termometer, handscoon, dan masker.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu larutan uji ekstrak dan ekstrak daun pare (*Momordica Charantia. L*) dengan konsentrasi 10%, 20%,30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan 100%, aquades steril, NaCl fisiologis (0,85%) steril, stok kuman *Salmonella typhosa*, kontrol negatif aquades steril, dan kontrol positif kloramfenikol 30 μ g.

c. Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini meliputi media Mueller Hinton Agar, media Nutrient Broth, media Nutrient Agar Slant.

5. Cara Kerja

a. Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas yang digunakan dalam penelitian ini dibersihkan dan dikeringkan terlebih dahulu kemudian dibungkus dengan kertas alumunium foil. Disterilkan dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C 1 atm selama 60 menit (Soemarno, 2000).

b. Pembuatan media Nutrient Broth

Media Nutrient Broth ditimbang sebanyak 0,13 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian dilarutkan dalam 10 ml aquades, ditutup dengan kapas yang dibungkus alumunium foil lalu dipanaskan di atas hot plate sampai larut sempurna, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml masing-masing tabung ditutup kapas dan disterilkan dalam autoclave selama 15

menit suhu 121°C pada tekanan 1 atm. Media dapat disimpan di lemari pendingin apabila tidak segera digunakan (Artanti, 2018).

c. Pembuatan media Muller Hinton Agar

Sebanyak 15 gram Mueller Hinton Agar bubuk ditambahkan dengan 390 ml aquades, ditutup dengan kapas yang dibungkus aluminium foil kemudian dipanaskan di atas hot plate. Setelah larut sempurna, lalu media disterilkan di autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm, angkat dan biarkan selama beberapa menit hingga suhu media $\pm 50^{\circ}\text{C}$. Setelah disterilkan media dituang ke dalam cawan petri 20 ml yang telah disterilkan dan dibiarkan dingin. Media dapat disimpan di lemari pendingin apabila tidak segera digunakan. Hal ini serupa dilakukan dengan cara kerja sebelumnya setiap kali pengulangan (Artanti, 2018).

d. Pembuatan NaCl 0,85%

NaCl ditimbang sebanyak 0,85 gram kemudian dimasukkan dalam beaker glass dan dilarutkan dengan aquades kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml di addkan dengan 100 ml aquades. Lalu dimasukkan ke tabung reaksi sebanyak 3 ml/tabung ditutup dengan kapas kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit (Soemarno, 2000).

e. Pembuatan Larutan Standar Mac Farland 0,5

Larutan Barium Chloride Dihidrat ($\text{BaCl}_2\text{H}_2\text{O}$) 1% sebanyak 0,5 ml dicampur dengan asam sulfat (H_2SO_4) 1% sebanyak 99,5 ml. Reagen dikocok hingga homogen. Standar kekeruhan ini dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditutup rapat supaya tidak terjadi penguapan. Kekeruhan Standar Mac Farland 0,5 diukur menggunakan alat nefelometer agar benar-benar setara dengan jumlah bakteri sebanyak 1.500 juta/ml. Setiap akan digunakan dikocok terlebih dahulu (Soemarno, 2000).

f. Identifikasi bakteri *Salmonella typhosa* ATCC 1408

1) Hari Pertama

➤ Pengecatan gram

- (1) Disiapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
- (2) Dibersihkan objek glass menggunakan alkohol ditunggu hingga kering.
- (3) Objek glass yang telah bersih diberi tanda lingkaran menggunakan spidol.
- (4) Ditetaskan 1 tetes NaCl di atas objek glass dan diberi bakteri dari strain murni lalu dihomogenkan.
- (5) Objek glass yang sudah ada bakteri lalu difiksasi diatas spirtus.
- (6) Objek glass yang sudah fiksasi lalu digenangi dengan larutan cat gram A sampai menutupi seluruh preparat biarkan selama 1 menit dan dicuci dengan air mengalir.
- (7) Teteskan larutan cat gram B sampai menutupi seluruh preparat biarkan selama 1 menit dan dicuci dengan air mengalir.
- (8) Teteskan larutan cat gram C sampai menutupi seluruh preparat biarkan selama 30 detik dan dicuci dengan air mengalir.
- (9) Teteskan larutan cat gram D sampai menutupi seluruh preparat biarkan selama 30 detik dan dicuci dengan air mengalir.
- (10) Keringkan dan preparat siap diperiksa dibawah mikroskop.

➤ Penanaman bakteri pada media Endo Agar, Eosin Methylen Blue, Mac Concey, Salmonella Shigella Agar.

- (1) Bakteri ditanam di media Endo Agar, Eosin Methylen Blue, Mac Concey, Salmonella Shigella Agar.
- (2) Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

2) Hari Kedua

- (1) Diamati pertumbuhan bakteri yang telah tumbuh pada hari pertama pada media Endo Agar, Eosin Methylen Blue, Mac Concey, Salmonella Shigella Agar..
- (2) Bakteri yang tersangka *Salmonella* dari media ditanam pada media Biokimia yaitu media SIM (Sulfur Indol Mutility), Urea, MrVp, SC (Simmon Citrat), TSIA (Triple Sugar Iron Agar), dan pada media gula-gula yaitu Glukosa, Laktosa, Manitol, Maltosa, Sukrosa.
- (3) Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C.

3) Hari Ketiga

- (1) Diamati pertumbuhan yang telah tumbuh pada hari kedua pada media SIM (Sulfur Indol Mutility), Urea, MrVp, SC (Simmon Citrat), TSIA (Triple Sugar Iron Agar), dan media gula-gula yaitu Glukosa, Laktosa, Maltosa, Manitol, Sukrosa serta tes kimia.
- (2) Dicocokkan hasil dengan ciri *Salmonella typhosa* untuk identifikasinya (Soemarno, 2000).

g. Pembuatan Suspensi Bakteri *Salmonella typhosa* ATCC 1408

Dibiakan bakteri dalam media Nutrient Broth (NB), dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 4 jam. Suspensi kuman dalam media Nutrient Broth (NB) kemudian disamakan dengan standar Mac Farland. Jika suspensi terlalu keruh ditambahkan NaCl 0,85% atau jika suspensi terlihat jernih, ditambahkan lagi dengan kuman hingga kekeruhannya sama dengan standar Mac Farland 0,5 (Soemarno, 2000).

h. Persiapan dan Determinasi Daun Pare

Daun pare diperoleh dari petani pare yang berada di daerah desa Gantimulyo, Pekalongan, Lampung Timur. Kemudian daun pare tersebut dideterminasi di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung untuk memastikan kebenaran dari tanaman yang digunakan. Dengan cara mencocokkan

morfologi yang ada pada daun pare terhadap kepustakaan dan dibuktikan dibidang Botani Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.

i. Pemilihan Daun Pare

Daun pare yang akan diekstraksi adalah daun pare muda berbentuk bulat telur, berbulu, dan berlekuk, daunnya berwarna hijau tua di bagian permukaan atas dan permukaan bawahnya berwarna hijau muda atau kekuningan, panjang 7 cm dan lebarnya 10 cm.

6. Pembuatan Larutan Uji

a. Pembuatan Simplisia

- 1) Daun pare diambil sebanyak 5kg dalam kondisi masih segar.
- 2) Daun pare dicuci di air mengalir lalu dipotong tipis dengan ukuran 1mm.
- 3) Daun Pare lalu dikeringkan dibawah sinar matahari selama 7 hari, selama pengeringan daun pare ditutup dengan menggunakan kain berwarna hitam.
- 4) Daun pare yang telah kering lalu diblender sehingga menjadi bentuk serbuk dan diayak supaya benar-benar didapatkan serbuk yang halus.
- 5) Serbuk daun pare disimpan dalam wadah yang kering dan tertutup.

b. Pembuatan Ekstrak Daun Pare

- 1) Timbang 500 gram simplisia.
- 2) Masukkan ke dalam botol gelap volume 3,0 liter.
- 3) Masukkan pelarut hingga simplisia terendam dan pelarut yang ditambahkan di lebihkan tingginya dari simplisia sebanyak 2 liter.
- 4) Homogenkan botol yg telah terisi simplisia dan pelarut tersebut.
- 5) Kemudian tutup botol, catat jam mulai perendaman.
- 6) Diamkan selama 24 jam, setelah 24 jam kemudian siapkan corong gelas dan kertas saring.

- 7) Letakkan corong gelas dan kertas saring tersebut dengan botol penampung dan dilakukan penyaringan simplisia yang sudah direndam dengan pelarut.
- 8) Maserasi dilakukan hingga pelarut yang digunakan mendekati jernih yaitu sebanyak 3 kali.
- 9) Ekstrak yang diperoleh dari hasil ekstraksi maserasi masukkan ke dalam labu didih pada rotary evaporator.
- 10) Diatur temperatur water bath pada temperatur 40°C.
- 11) Setelah temperatur sesuai, air pendingin dialirkan.
- 12) Dinyalakan pompa vakum hingga tekanan -13 Psi, biarkan hingga pelarut terpisah dari ekstrak.
- 13) Pekerjaan ini dilakukan hingga pelarut mendekati habis dan didapat ekstrak pekatnya .
- 14) Ekstrak kemudian disimpan pada wadah berbahan gelas yang steril, bersih, dan kering (BPOM RI, 2010).
- 15) Lakukan pengenceran ekstrak dengan konsentrasi 10%, 20%,30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan 100%.

Rumus Pengenceran:

$$V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$$

Keterangan :

V_1 = Volume larutan uji yang dipipet (ml)

$\%_1$ = Konsentrasi larutan Uji (100%)

V_2 = Volume larutan uji dengan aquadest steril (ml)

$\%_2$ = Konsentrasi yang akan dibuat (%)

Tabel 3.2 Pengenceran Larutan Ekstrak Daun Pare

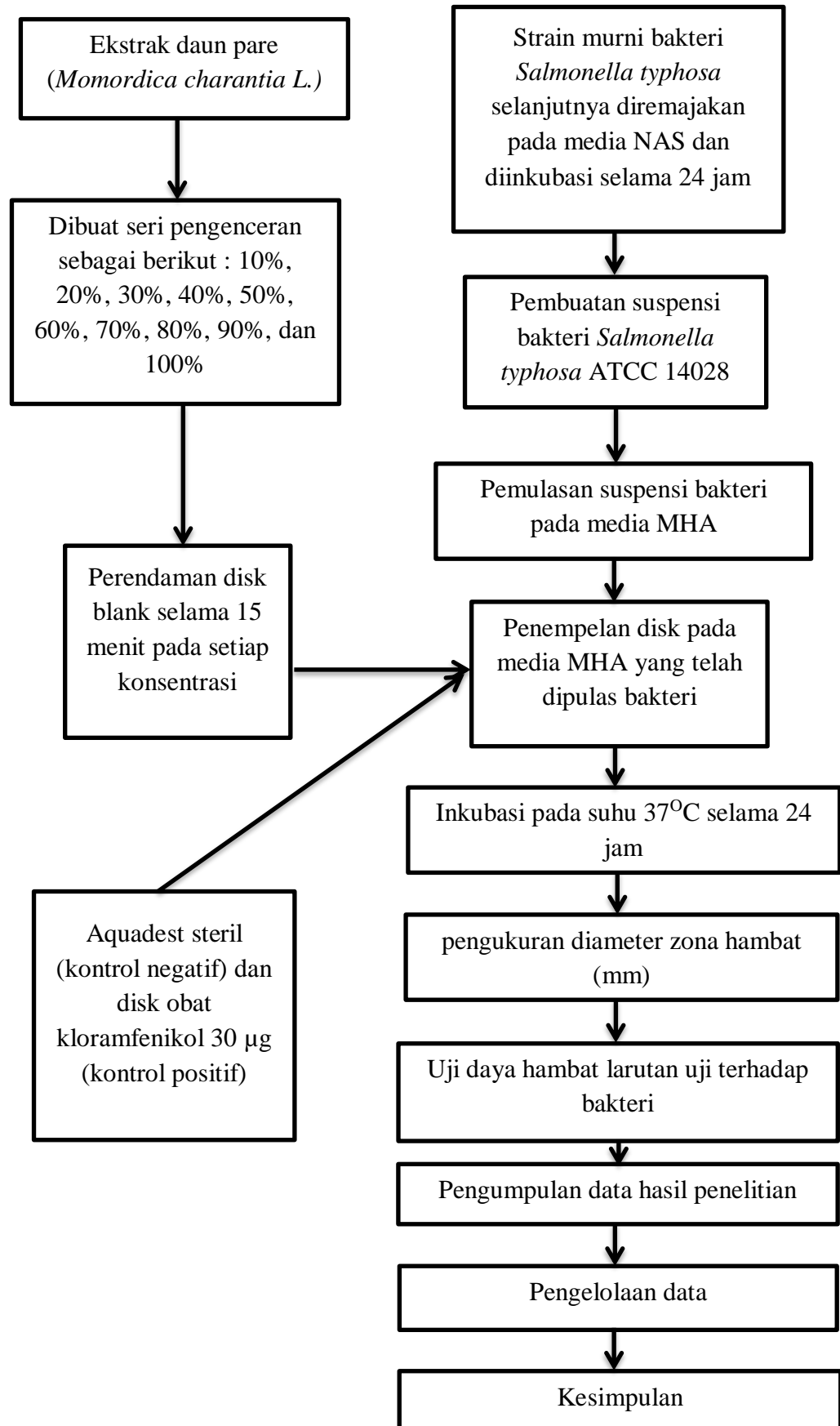
Konsentrasi (%)	Volume Ekstrak Daun Pare (ml)	Volume Aquadest Steril (ml)	Volume Larutan (ml)
10	0,5	4,5	5
20	1	4	5
30	1,5	3,5	5
40	2	3	5
50	2,5	2,5	5
60	3	2	5
70	3,5	1,5	5
80	4	1	5
90	4,5	0,5	5
100	5	0	5

7. Uji Daya Hambat

a. Metode Difusi Kirby Bauer

- 1) Siapkan media MHA yang telah mengeras.
- 2) Lidi kapas steril dimasukkan ke dalam suspensi bakteri dalam media Nutrient Broth yang telah distandarisasi kekeruhannya dengan standar Mac Farland 0,5. Ditunggu selama 1 menit agar suspensi bakteri dapat meresap ke dalam lidi kapas steril, kemudian lidi kapas diangkat, dan diperas dengan cara menekan pada dinding bagian dalam sambil memutar lidi kapas.
- 3) Lidi kapas yang berisi bakteri dipulaskan pada seluruh permukaan Mueller Hinton Agar plate. Semua permukaan media dipulas dengan bakteri. Dibiarkan media MHA yang telah dipulas dengan bakteri selama 5 menit supaya suspensi bakteri meresap ke dalam media.
- 4) Disc obat direndam pada tabung pengenceran masing-masing konsentrasi ekstrak daun pare selama 15 menit, kemudian diambil dengan pinset steril, dan ditempelkan pada permukaan media Mueller Hinton Agar yang telah dipulas dengan suspensi bakteri, dan diberi jarak 15 mm antar disk, kemudian disk ditekan sedikit dengan menggunakan pinset steril pada permukaan media, sehingga terdapat kontak yang baik antar disk dan permukaan media, selanjtnya diinkubasi di inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.
- 5) Diameter zona hambatan yang diukur yaitu daerah jernih sekitar disc obat (tidak ada pertumbuhan bakteri), diukur dari ujung yang satu ke ujung yang lain melalui tengah-tengah disc obat menggunakan jangka sorong.
- 6) Zona hambat yang terbentuk disekitar disk diukur diameternya sebagai diameter daya hambat ekstrak daun pare terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhosa* (Soemarno, 2000).

A. Skema Penelitian



B. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

Data diperoleh dengan cara

- a. Dilakukan pengujian efektivitas ekstrak daun pare (*Momordica Charantia L.*) dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan 100% terhadap pertumbuhan *Salmonella typhosa*.
- b. Dilakukan pengukuran zona hambat dari masing-masing konsentrasi pada tiap pengulangan menggunakan alat ukur dalam satuan mm.
- c. Data zona hambat yang diperoleh disajikan dalam tabel.

2. Analisis Data

Analisis data yang digunakan yaitu analisa data univariat dan analisa data bivariat.

- a. Analisa univariat adalah data terhadap variabel dari hasil penelitian dengan masing-masing konsentrasi yang diukur diameter koloni dengan pengulangan sebanyak 3 kali kemudian diakumulasikan dan dihitung rata-rata.
- b. Analisis bivariat adalah analisis yang digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan signifikan antar rata-rata diameter koloni dengan menggunakan uji *One-Way Anova (Analysis of Variance)*, apabila terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata diameter koloni, maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Kecil) dengan taraf kesalahan 5% atau tingkat kepercayaan 95%.

C. Etical Clearance

Penelitian yang dilakukan atas izin komisi etik No.119/KEPK-TJK/VI/2001, penelitian ini tidak akan menimbulkan bahaya bagi lingkungan, limbah yang dihasilkan dari proses penelitian ini akan dikumpulkan dan dimusnahkan dalam penanganan limbah. Limbah media pada plate serta limbah suspensi bakteri pada tabung dimusnahkan dengan cara perebusan pada suhu 100°C selama 30 menit, air bekas ekstrak dibuang pada saluran pembuangan, lalu plate dan tabung direbus kembali

dengan penambahan deterjen pada air mengalir. Limbah larutan uji ditangani dengan cara langsung dibuang pada saluran pembuangan.