

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *eksperimental laboratories*, dengan menggunakan desain *One-shot Case Study* yaitu desain penelitian dengan perlakuan terhadap variabel *independent* (Sugiyono, 2011)

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Kendari, yang dilaksanakan pada bulan Januari – Juni 2020.

C. Subjek dan Objek Penelitian

Subjek dari penelitian ini adalah umbi bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr). Sedangkan objek penelitian ini adalah bakteri *Salmonella typhi*.

D. Bahan Uji

Bahan uji dari penelitian ini adalah bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) sebagai tanaman antibakteri terhadap *Salmonella typhi*. Bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) yang digunakan adalah umbinya, diambil secara manual dan dicuci lalu ditiriskan airnya dan ditimbang sebanyak 500 gram dengan timbangan digital kemudian dipotong-potong lalu kemudian diblender dan disaring dengan kertas saring sehingga mendapatkan saribawang dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) yang pekat dan dimasukkan dalam erlenmeyer kemudian sari bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) dibuat dalam 4 variasi konsentrasi yaitu pada konsentrasi 40%, 60%, 80% dan 100% yang akan di uji terhadap pertumbuhan *Salmonella typhi*.

E. Prosedur Pengumpulan Data

Data pada penelitian ini dikumpulkan dari buku dan jurnal-jurnal penelitian sebelumnya. Data yang diambil meliputi tinjauan umum tentang *Salmonella typhi*, tinjauan umum tentang bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) dan tinjauan umum tentang uji daya hambat.

F. Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian yang digunakan di laboratorium terdiri atas alat dan bahan, yang dapat dilihat pada table berikut:

1. Alat

Tabel 4.1 Alat yang akan digunakan

No.	Nama Alat	Fungsi
1.	Cawan Petri	Sebagai wadah untuk menguji daya hambat.
2.	Tabung Reaksi	Untuk membuat suspensi bakteri uji dan standar Mc Farland.
3.	Oven	Untuk mensterilkan alat.
4.	Neraca Analitik	Untuk menimbang media dan bawang dayak sesuai takaran yang diinginkan.
5.	Cawan Porselen	Wadah untuk penimbangan dan menampung sari serta mencelupkan <i>paper disk</i> .
6.	Sendok Tanduk	Untuk mengambil bubuk media.
7.	Gelas Kimia 250 mL	Untuk pembuatan variasi konsentrasi sari bawang dayak, yaitu konsentrasi 40%, 60%, 80% dan 100%.
8.	Gelas Kimia 500 mL	Untuk menampung aquadest.
9.	Gelas ukur	Untuk mengukur aquadest dan sari bawang dayak yang akan digunakan.
10.	Autoclave	Untuk mensterilkan alat dan media.
11.	Jarum Ose	Untuk mengambil koloni bakteri pada biakan murni.
12.	Lampu spritus	Untuk pemanasan media yang telah dilarutkan, mensterilkan ose dan

		pinset serta menjaga kontaminasi bakteri saat diambil dari media.
13.	Drigalsky	Untuk meratakan mikroba diatas media agar merata.
14.	Spoit 1 cc	Untuk memindahkan suspensi bakteri.
15.	Pinset	Digunakan sebagai penjepit <i>paper disk</i> .
16.	Jangka Sorong	Untuk mengukur besarnya zona hambat yang terbentuk.
17.	Batang Pengaduk	Untuk mengaduk media saat dilarutkan.
18.	Erlenmeyer	Sebagai wadah media yang telah dilarutkan dengan aquadest untuk dipanaskan menggunakan lampu spritus.
19.	Inkubator	Untuk menginkubasi bakteri uji.
20.	Corong	Untuk membantu proses pemindahan cairan yang akan dipindahkan dari wadah satu ke wadah yang lain.
21.	Pisau	Untuk memotong bawang dayak.
22.	Kaki Tiga	Untuk penyangga asbes pada saat pembuatan media.
23.	Asbes	Untuk penyangga erlenmeyer pada saat pembuatan media.
24.	Pipet ukur dan karet penghisap	Untuk memipet $BaCl_2$ dan H_2SO_4 .
25.	Blender	Untuk menghaluskan bawang dayak.

2. Bahan

Tabel 4.2 Bahan yang Digunakan

No.	Nama Bahan	Fungsi
1.	Sari bawang dayak	Sampel
2.	Antibiotik Chloramphenicol 250 mg	Kontrol positif
3.	Aluminium Foil	Untuk menutup wadah pada saat sterilisasi dan menutup wadah lain yang berisi larutan agar tidak terkontaminasi.
4.	Bakteri <i>Salmonella typhi</i>	Bakteri uji.
5.	NaCl 0,9 %	Larutan dalam suspensi.
6.	Kertas Label	Untuk memberikan penanda.
7.	Kertas pH	Untuk mengukur pH media.
8.	Media <i>Nutrien Agar</i> (NA)	Media pertumbuhan bakteri.
9.	Paper Disk	Digunakan sebagai disk sari.
10.	Aquadest	Pelarut.
11.	Kertas Saring	Untuk menyaring sari bawang dayak.
12.	Kapas	Untuk menutup erlenmeyer pada saat pembuatan media dan untuk menutup suspensi bakteri.

G. Prosedur Penelitian

1. Pra Analitik :

- a. Persiapan sampel : Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia (L.) Merr*)
- b. Metode : Difusi Agar

- c. Prinsip : Piringan yang berisi agen antimikroba diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme akan berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar.
- d. Persiapan alat dan bahan
- e. Sterilisasi alat :
- Disterilkan dalam oven untuk alat-alat yang terbuat dari kaca atau logam yang memiliki tingkat skala atau keakuratan rendah dengan suhu 170°C selama 1 jam. Sedangkan alat-alat yang terbuat dari kaca yang memiliki tingkat tinggi dan berbahan plastic, disterilkan dalam autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit.
- f. Pembuatan media *Nutrient Agar* (NA)
- 1) Timbang 3,9 gram media *Nutrient Agar* (NA)
 - 2) Pindahkan serbuk *Nutrient Agar* (NA) ke dalam erlenmeyer, lalu tambahkan aquadest sebanyak 140 ml.
 - 3) Homogenkan larutan dengan bantuan pemanasan dan pengadukan. Pelarutan tidak boleh sampai mendidih (pelarutan harus sempurna sehingga tidak ada kristal yang tersisa).
 - 5) Cek pH larutan sesuai dengan petunjuk media ($\text{pH} = 7,2 \pm 0,2$) pada suhu 25°C .
 - 6) Sterilkan media menggunakan autoclave dengan suhu 121°C dalam waktu 15 menit.
 - 7) Tuangkan media ke dalam cawan petri steril yang telah disediakan.
 - 8) Biarkan media pada cawan petri mengagar sempurna.
 - 9) Masukkan ke dalam kulkas dan media siap digunakan.
- g. Pembuatan sari bawang dayak
- 1) Timbang 500 gram bawang dayak.
 - 2) Cuci bawang dayak hingga bersih.
 - 3) Potong kecil-kecil bawang dayak dan hancurkan menggunakan blender.

- 4) Kemudian saring dengan kertas saring/kain saring sampai cairan terpisah, maka diperoleh larutan uji.
- 5) Di tampung pada erlenmeyer steril dan ditutup.

Berdasarkan perlakuan diatas, maka cara pembuatan sari dengan varian konsentrasi 40%, 60%, 80% dan 100% adalah sebagai berikut :

1. Konsentrasi 40%

Pembuatan bawang dayak dengan volume larutan yang akan dibuat 50 mL pada konsentrasi sari 40%. Perhitungannya yaitu :

$$\begin{aligned}
 V1.M1 &= V2.M2 && \text{(Purwiyanto, 2013)} \\
 V1 . 100\% &= 50 \text{ mL} . 40\% \\
 V1 . 100\% &= 2000 \\
 V1 &= \frac{2000}{100} \\
 V1 &= 20 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

Jadi untuk pembuatan sari bawang dayak dengan konsentrasi 40% yaitu dipipet 20 mL sari bawang dayak pekat dan ditambahkan 30 mL aquadest, kemudian dihomogenkan.

2. Konsentrasi 60%

Pembuatan bawang dayak dengan volume larutan yang akan dibuat 50 mL pada konsentrasi sari 60%. Perhitungannya yaitu :

$$\begin{aligned}
 V1.M1 &= V2.M2 && \text{(Purwiyanto, 2013)} \\
 V1 . 100\% &= 50 \text{ mL} . 60\% \\
 V1 . 100\% &= 3000 \\
 V1 &= \frac{3000}{100} \\
 V1 &= 30 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

Jadi untuk pembuatan sari bawang dayak dengan konsentrasi 60% yaitu dipipet 30 mL sari bawang dayak pekat dan ditambahkan 20 mL aquadest, kemudian dihomogenkan.

3. Pembuatan bawang dayak dengan volume larutan yang akan dibuat 50 mL pada konsentrasi sari 80%. Perhitungannya yaitu :

$$\begin{aligned}
 V_1.M_1 &= V_2.M_2 && \text{(Purwiyanto, 2013)} \\
 V_1 . 100\% &= 50 \text{ mL} .80\% \\
 V_1 . 100\% &= 4000 \\
 V_1 &= \frac{4000}{100} \\
 V_1 &= 40 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

Jadi untuk pembuatan sari bawang dayak dengan konsentrasi 60% yaitu dipipet 40 mL sari bawang dayak pekat dan ditambahkan 10 mL aquadest, kemudian dihomogenkan.

4. Pembuatan bawang dayak dengan volume larutan yang akan dibuat 50 mL pada konsentrasi sari 100%. Perhitungannya yaitu :

$$\begin{aligned}
 V_1.M_1 &= V_2.M_2 && \text{(Purwiyanto, 2013)} \\
 V_1 . 100\% &= 50 \text{ mL} .100\% \\
 V_1 . 100\% &= 5000 \\
 V_1 &= \frac{5000}{100} \\
 V_1 &= 50 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

Jadi untuk pembuatan sari bawang dayak dengan konsentrasi 100% yaitu dipipet 50 mL sari bawang dayak pekat (tanpa penambahan aquadest) dan diletakkan pada erlenmeyer.

- h. Pembuatan Antibiotik *Chloramphenicol* (Kontrol Positif)

Chloramphenicol 250 mg dibuat konsentrasi 5% dengan menimbang 0,5 gram *chloramphenicol* kemudian dilarutkan dengan aquadest steril sebanyak 5 mL sehingga diperoleh konsentrasi 5%.

- i. Pembuatan Larutan Standar Mc Farland

Pembuatan larutan standar Mc Farland dengan cara di campurkannya 9,5 ml larutan H₂SO₄ 1% dengan 0,5 ml larutan BaCl₂ 1% sehingga volume menjadi 10 ml, lalu dikocok sampai homogen, untuk membandingkan suspensi bakteri (Sutton, 2011).

2. Analitik :

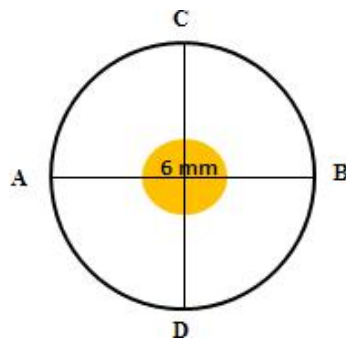
- a. Siapkan biakan bakteri *Salmonella typhi*.

- b. Buat suspensi bakteri dengan cara inokulasi biakan pada NaCl 0,9% pada tabung reaksi sebanyak 10 ml.
- c. Bagi daerah cawan petri menjadi 2 bagian, beri label masing-masing bagian cawan.
- d. Tambahkan 0,1 mL suspensi bakteri pada media *Nutrien agar* (NA) dan di ratakan menggunakan drigalsky.
- e. Biarkan 5-10 menit agar biakan terdifusi kedalam media.
- f. Celupkan masing-masing paper disk pada sari bawang dayak pada masing-masing konsentrasi 40%, 60%, 80% dan 100%.
- g. Letakkan kertas *paper disk* dengan pinset steril, atur jarak antara masing-masing *paper disk*.
- h. Lakukan kontrol positif, yaitu media *Nutrient Agar*(NA) ditambahkan dengan *paper disk* yang mengandung larutan Chloramphenicol 5%.
- i. Lakukan kontrol positif, yaitu media *Nutrient Agar* (NA) ditambahkan dengan *paper disk* yang mengandung aquadest.
- j. Bungkus cawan petri dengan menggunakan kertas, lakukan inkubasi pada incubator dengan suhu 37°C selama 1x24 jam.
- k. Amati ada tidaknya zona bening pada daerah sekitar *paper disk*.

3. Pasca Analitik :

a. Pencatatan Hasil Penelitian

Pencatatan hasil penelitian merupakan hasil penelitian yang dilakukan dengan pencatatan suatu aktifitas dalam bentuk tulisan baik diketik maupun di tulis tangan atau dalam bentuk grafik atau gambar dari hasil pengukuran atau pengamatan yang telah dilakukan. Pencatatan hasil penelitian ditentukan dengan rumus :



Gambar 4.1 Zona Hambat

Cara hitung diameter rata-rata zona hambat :

$$\frac{(CD - a) + (AB - a)}{2}$$

Keterangan :

AB = Diameter Horizontal (mm)

CD = Diameter Vertikal (mm)

a = Diameter *Paper disc* (mm)

b. Dokumentasi dan Hasil Penelitian

Kegiatan pengambilan hasil dalam bentuk foto atau gambar dan hasil pengukuran, pengamatan, pengambilan sampel dan lain lain yang berhubungan dengan hasil penelitian mulai dari pra analitik, analitik sampai pasca analitik.

c. Pelaporan Hasil Penelitian

Pelaporan hasil penelitian adalah kegiatan melaporkan hasil penelitian setelah dilakukan pengukuran dan pengamatan, hasil penelitian itu dilaporkan berdasarkan hasil pengukuran yang dijadikan sebagai hasil penelitian. Adapun pelaporan tersebut sebagai berikut:

Positif : Terjadi zona hambatan (wilayah jernih) di sekitar kertas cakram.

Nilai diameter zona hambatan dianalisa secara deskriptif berdasarkan kategori respon hambat:

1. Resisten <12 mm.
2. Intermediet 13-17 mm.
3. Sensitif >18 mm (CLSI, 2014).

Negatif : Tidak terjadi zona hambatan (wilayah jernih) di sekitar kertas cakram.

H. Jenis Data

a. Data primer

Data primer pada penelitian ini adalah data yang diambil dari hasil pengujian terhadap daya hambat sari bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) terhadap perumbuhan bakteri *Salmonella typhi*.

b. Data Sekunder

Data sekunder pada penelitian ini adalah data yang yang diperoleh dari buku dan jurnal penelitian-penelitian sebelumnya yang kemudian dijadikan sebagai teori pada penelitian ini.

I. Pengolahan Data

Pengolahan data yang telah diperoleh dari hasil penelitian dikerjakan melalui beberapa proses dengan tahapan sebagai berikut :

1. Pemeriksaan data (*editing*) bertujuan untuk meneliti data yang telah diperoleh dari pengukuran dengan cara memeriksa kelengkapan dan konsistensi data yang ada.
2. Pengkodean data (*coding*) bertujuan untuk memudahkan dalam menganalisis data dengan cara memberikan kode atau atribut pada data.
3. Memasukkan data (*entry*) yang telah diperoleh untuk diolah menggunakan komputerisasi.
4. Tabulasi (*tabulating*) merupakan lanjutan langkah koding untuk mengelompokkan data ke dalam suatu data tertentu menurut sifat – sifat yang dimiliki sesuai dengan tujuan penelitian.

J. Analisis Data

Pada penelitian ini, analisis data yang digunakan yaitu analisis data metode deskriptif berdasarkan kategori adanya zona hambat (positif) dan tidak adanya zona hambat (negatif) sari bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) terhadap bakteri *Salmonella typhi*. Selanjutnya, dilakukan analisis data untuk menentukan hasil penelitian zona hambat dengan menggunakan rumus zona hambat, yaitu :

Rumus :

$$\frac{(CD - a) + (AB - a)}{2}$$

Keterangan :

AB = Diameter Horizontal (mm)

CD = Diameter Vertikal (mm)

a = Diameter *Paper disc* (mm)

K. Penyajian Data

Data yang telah dianalisis kemudian disajikan dalam bentuk tabel lalu dijelaskan dalam bentuk narasi.