

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental di laboratorium untuk mengetahui potensi daun sirih cina sebagai penghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhosa*.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

a. Waktu penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada tanggal 04 Juli 2023

b. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium MIPA Fakultas Ilmu Tarbiyah dan Keguruan IAIN Ambon

C. Alat dan Bahan Penelitian

Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2 berikut:

Tabel 1. Alat yang digunakan dalam penelitian

No	Alat	Fungsi
1	Timbangan analitik	Untuk menimbang bahan
2	Hot plate	Untuk pembuatan media <i>NB</i> dan <i>SSA</i>
3	Gelas ukur	Untuk mengukur volume larutan
4	Pengaduk	Untuk mengaduk media pada saat pembuatan media
5	Pipet tetes	Untuk meneteskan atau mengambil larutan dengan jumlah kecil
6	<i>Paper disk blank/sterile disk</i> (kertas cakram)	Untuk uji daya hambat

7	Tabung reaksi	Untuk membuat media miring
8	Rak tabung reaksi	Untuk melakukan percobaan yang membutuhkan banyak
9	Labu elemeyer	Untuk menampung larutan
10	Pipet ukur	Untuk mengambil sampel dengan takaran tertentu
11	Lumpang dan alu	Untuk menghaluskan tumbuhan daun sirih cina
12	Pinset	Untuk mengambil <i>paper disk</i> yang sudah direndam ekstrak
13	Bunsen	Untuk menghasilkan api gas
14	Cawan petri	Untuk tempat penyelidikan bakteri
15	Autoklaf	Untuk mensterilisasi bahan
16	Inkubator	Untuk menginkubasi bakteri
17	Oven	Untuk mensterilisasi alat
18	Kertas label	Untuk menandai sampel
19	Jarum ose	Untuk inokulasi bakteri
20	Masker	Untuk membantu melindungi dari bakteri
21	Sarung tangan	Untuk melindungi tangan dari bakteri
22	Batang penyebar	Untuk meratakan bakteri
23	Laminar flow	Untuk mengalihkan udara bersih secara terus menerus
24	Aluminium foil	Untuk menutup bagian mulut alat-alat
25	Mistar	Untuk mengukur suatu benda kerja
26	Mikro pipet	Untuk mengambil bakteri

Tabel 2. bahan yang digunakan dalam penelitian

No	Bahan	Fungsi
1	Tumbuhan daun sirih cina (<i>piperumia pellucida</i>)	Untuk pembuatan ekstrak
2	<i>Bakteri Salmonella typhosa</i>	Bakteri coba
3	<i>Media SSA</i>	untuk meremajakan isolate bakteri <i>Salmonella</i>
4	<i>Media NB</i>	Untuk kultur cair bakteri
5	<i>Aquades Steril</i>	Sebagai bahan pengenceran
6	Pelarut etanol 96%	Untuk perendaman ekstrak

D. Objek Penelitian

Adapun objek dalam penelitian ini yaitu, tumbuhan daun sirih cina (*Piperumia pellucida*) dan bakteri *Salmonella typhosa*.

E. Rancangan percobaan

Untuk menentukan diameter zona hambat, pengujian ini adalah Rancangan acak lengkap (RAL) dengan faktorial dari dua faktor dan 3 ulangan dengan 3 konsentrasi ekstrak yaitu 25%,50%, dan 75%. sebagai kontrol positif menggunakan tetraksilin dan kontrol negatif menggunakan *aquades steril*.

Tabel 3. Perlakuan konsentrasi

Perlakuan	Pengulangan		
	1	2	3
P1(25%)	P1a	P1b	P1c
P2(50%)	P2a	P2b	P2c
P3(75%)	P3a	P3b	P3c
K+	K+a	K+b	K+c
K-	K-a	K-b	K-c

Pembuatan ekstrak dengan konsentrasi 25% yaitu 2,5 g sampel ditambahkan 7,5 ml *aquades steril*, 50% yaitu 5 g sampel ditambahkan 5 ml *aquades steril*, 75% yaitu 7,5 g sampel ditambahkan 2,5 ml *aquades steril*.

F. Prosedur Penelitian

Adapun prosedur yang dapat dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Tahap Persiapan

Pada tahap persiapan, yang dilakukan adalah mengumpulkan semua alat dan bahan yang dibutuhkan.

2. Tahap Pengambilan Sampel

- a. sampel yang diambil secara acak dari sekitaran air besar (arbes) kota Ambon sebanyak 4 kilogram, dan ambil bagian tumbuhan (daun dan batang).
- b. Kemudian sampel dijemur dalam kondisi suhu ruang (tidak boleh terpapar sinar matahari langsung) hingga kandungan air berkurang sebanyak 10% (2 hari).

3. Pembuatan ekstrak daun sirih cina (*Piperumia pellucida*)

Teknik ekstraksi meserasi yaitu bagian tumbuhan daun sirih cina yang sudah dikeringkan dan dihaluskan kemudian dimasukkan ke dalam toples lalu di rendam dengan pelarut etanol 96%. Setelah itu, larutan diaduk selama 30 menit kemudian toples ditutup dengan aluminium foil dan didiamkan selama sehari. Setelah itu hasil ekstrak disaring untuk memperoleh ekstrak cair daun sirih cina kemudian dievaporasi menggunakan vacuum rotary evaporator, sehingga diperoleh ekstrak murni ¹.

4. Sterilisasi alat

Alat di sterilisasi dengan metode panas kering menggunakan oven sedangkan sterilisasi media dilakukan dengan panas lembab yaitu menggunakan autoklaf.

¹ Karomah, s. (2019). Staphylococcus aureus dan staphylococcus epidermidis skripsi oleh : siti karomah fakultas biologi universitas medan area medan uji ekstrak tumbuhan sirih cina (*peperomia pellucida* 1 .) sebagai antibakteri terhadap bakteri staphylococcus aureus dan staphy.

1. Sterilisasi dengan pemijaran, cara ini dilakukan pada alat-alat tertentu salah satunya adalah kawat ose (jarum ose) caranya adalah dengan membakar ujung kawat pada lampu bunsen menyala.
2. Sterilisasi udara panas (kering) merupakan metode mensterilkan peralatan seperti glass pada suhu 170-180 dalam oven selama 2 jam.
3. Tabung reaksi disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

5. Pembuatan media SSA dan media NB

1. Pembuatan media *Salmonella shigella agar (SSA)*
 - a. Menimbang media *Salmonella shigella agar (SSA)* sebanyak 31,50 gram menggunakan timbangan analitik.
 - b. Masukkan media ke dalam labu Erlenmeyer dan aquadest 500 ml.
 - c. Aduk dan panaskan larutan medium menggunakan alat hot plate dan tunggu hingga larutan mendidih dan pastikan medium larut dengan sempurna atau tidak terjadi penggumpalan.
 - d. Setelah mendidih, tunggu medium turun suhunya (50-60 °C).
 - e. Tuang media steril ke dalam cawan petri dan tunggu hingga media memadat, ini dilakukan didekat api bunsen.
 - f. Medium siap digunakan.
2. Pembuatan media *Nutrient broth (NB)*

Media *Nutrient broth (NB)* sebanyak 1,30 gram dilarutkan ke dalam 100 ml aquades kemudian diaduk dan dipanaskan menggunakan hot plate, setelah media

di masukkan ke dalam labu Erlenmeyer dan tutup menggunakan kapas, setelah itu disterilkan dengan autoklaf dengan suhu 121 °C selama 15 menit.

3. Pembuatan biakan bakteri

Biakan murni bakteri yang telah diperbanyak dalam *media SSA* selama 24 jam pada suhu 25-30°C biakan bakteri diambil 1 ose kemudian di pindahkan ke dalam *medium NB*.

Mc Farland menggunakan larutan BaCl_2 1% dan H_2SO_4 1% sebagai penyetaraan atau pembanding konsentrasi mikroba. Kriteria kekeruhan Mc Farland bertujuan untuk menggantikan jumlah bakteri satu ke satu dengan memperkirakan kepadatan sel yang digunakan dalam prosedur uji antibakteri, keuntungan menggunakan standar Mc Farland adalah tidak memerlukan waktu inkubasi yang lama untuk mencapai kepadatan bakteri yang diinginkan².

Larutan standar 0,5 digunakan sebagai pembanding kekeruhan biakan bakteri dibuat dari BaCl_2 1 % sebanyak 5 ml dicampur dengan asam sulfat 1% sebanyak 99,5 ml . Larutan 0,5 Mc Farland kemudian diuji absorbansi pada spektro 0,08-0,1 pada saat panjang gelombang 625 nm. Kekeruhan larutan standar 0,5 Mc Farland dapat diukur menggunakan turbidimeter dan kekeruhan yang dihasilkan.

4. Media untuk Pengujian anti bakteri

Pengujian yang efektif terhadap antibakteri dilakukan dengan menggunakan beberapa konsentrasi yaitu: 25%,50%, dan 75%. Pengujian ini dilakukan dengan

² Khan, A., Ra hman, M., dan Islam, S. 2007. Antipyretic Activity of Peperomia pellucida Leaves in Rabbit. Turk J Biol. 32(1): 37-4.

metode *disc diffusi* yaitu menggunakan kertas cakram. Kemudian menyiapkan media cair *Nutriunt broth(NB)* yang berisi bakteri uji yang akan digunakan.

Sebanyak 1 ml bakteri kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi medium *Salmonella shigella agar (SSA)* yang sudah memadat, setelah itu diratakan menggunakan batang penyebar secara merata pada permukaan media *Salmonella shigella agar (SSA)*. Kemudian *paper disk* yang telah direndam ekstrak selama 1 jam dengan berbagai konsentrasi dan diletakkan pada media yang berisi olesan bakteri dengan sedikit ditekan agar *Paper disk* menempel pada permukaan media. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24-48 jam. Aktivitas antibakteri dinyatakan positif apabila terbentuk zona hambat berupa zona bening di sekeliling *paper disk*³.

5. Proses pengukuran zona hambat

Pengukuran zona hambat dilakukan 1x24 jam terbentuk dan dapat diukur dalam satuan millimeter (mm) diameter zona hambatnya dengan menggunakan jangka sorong yang menunjukkan adanya hambatan dan adanya kemampuan ekstrak tersebut dalam menghambat pertumbuhan bakteri, jika tidak terjadi hambatan maka terjadi pada media tersebut yaitu tidak ada zona bening pada area *paper disk*.

G. Analisis data

Data yang di peroleh dari penelitian yaitu di analisis secara deskriptif dari hasil pengukuran uji daya hambat berupa data diameter zona hambat.

³ Karomah, S. (2019). Uji Ekstrak Tumbuhan Sirih Cina(*Peperomia pellucida L.*) Sebagai Antibakteri Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*. Universitas Medan Area, Medan.