

BAB III METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif laboratorium dengan metode difusi *Kirby bauer*. Penelitian di lakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Oktober-November 2014 bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Ekstraksi bahan dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Universitas Lampung.

C. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan Uji

Bahan penelitian ialah ekstrak *ethanol* 70% daun sirih merah (*Piper crocatum*) dengan konsentrasi 100%, 75%, 50%, 25%, 12,5% dan 3,125%. Diekstrak di Laboratorium Kimia Organik Universitas Lampung.

2. Bakteri Uji

Bakteri uji yang digunakan adalah bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* dan bakteri gram negatif *Salmonella typhi* yang berasal dari Balai Laboratorium Klinik Bandar Lampung.

3. Media Kultur

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Muller Hinton* Agar bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* dan bakteri gram negatif *Salmonella typhi* akan tumbuh pada media tersebut. *Mannitol Salt* Agar digunakan sebagai media selektif dan diferensial untuk bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella Shigella* Agar digunakan sebagai media selektif dan diferensial untuk bakteri *Salmonella typhi*.

4. Alat-alat yang Digunakan

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah pipet hisap, rak, pipet ukur, lampu, mikropipet, ose, tabung reaksi, neraca penimbang dengan merek ohaus, *beaker glass*, *stir plate*, cawan patri, tabung erlenmeyer, inkubator dengan suhu 37°C dan autoklaf.

D. Prosedur Penelitian

1. Ekstraksi Daun Sirih Merah

Daun sirih merah potong-potong dengan gunting sehingga menjadi potongan kecil dan di keringkan, selanjutnya dilakukan teknik maserasi

(direndam) dengan *ethanol* 70% selama 3x24 jam dan disaring dengan kertas saring. Larutan hasil penyaringan selanjutnya dievaporasi dengan *rotary evaporator* sehingga menghasilkan ekstrak daun sirih pekat. Ekstrak daun sirih pekat selanjutnya di cairkan menggunakan aquadest sehingga menghasilkan konsentrasi yang di inginkan. Proses ini di lakukan di Laboratorium Kimia Organik Universitas Lampung.

2. Sterilisasi Alat

Alat yang digunakan pada penelitian dibersihkan terlebih dahulu kemudian dibungkus dengan kertas, selanjutnya dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah itu dimasukkan oven suhu 100°C selama 1 jam untuk mengeringkan alat (Dewi, 2010).

3. Pembuatan *Muller Hinton Agar* (MHA)

Timbang 3,8 gram *Muller Hinton Agar* (38 gr/L) dengan komposisi medium (*Beef Infusion* 300 gr, *Casamino acid* 17,5 gr, Agar 17 gr) kemudian dilarutkan dalam 100 ml aquades. Panaskan hingga mendidih, sterilkan selama 15 menit di autoklaf dengan tekanan udara 1 atm dan suhu 121°C (Dewi, 2010).

4. Pembuatan *Mannitol Salt Agar* (MSA)

Sebanyak 11,1 gram *Mannitol Salt Agar* dilarutkan dalam 100 ml aquades, kemudian diaduk sampai larut dan dipanaskan hingga mendidih, dan

disterilkan selama 15 menit di autoklaf dengan tekanan udara 1 atm dan suhu 121°C.

5. Pembuatan Salmonella Shigella Agar (SSA)

Sebanyak 6 gram Salmonella Shigella Agar (SSA) dilarutkan dalam 100 ml aquades, kemudian diaduk sampai larut dan dipanaskan hingga mendidih, dan disterilkan selama 15 menit di autoklaf dengan tekanan udara 1 atm dan suhu 121°C.

6. Identifikasi Bakteri

Bakteri yang di dapatkan dari Balai Laboratorium Klinik Bandar Lampung diinokulasi dengan teknik goresan pada media selektif dan diferensial masing-masing. *Mannitol Salt Agar* untuk bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella Shigella Agar* untuk bakteri *Salmonella typhi*. Setelah itu, media yang sudah diinokulasi bakteri dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C dan diamati setelah 24 jam. Koloni yang terpisah pada media diamati morfologinya (bentuk, diameter, elevasi, tepian, warna, dan konsistensi) dan dilanjutkan dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram dilakukan dengan membuat sediaan pada *object glass* kemudian diwarnai dengan *crystal violet* selama 20 detik, *iodine* selama 1 menit, alkohol 96% selama 10-20 detik, dan safranin selama 20 detik. Sesudah dilakukan pewarnaan Gram selanjutnya diamati secara mikroskopis sesuai morfologi bakteri.

7. Aktivitas Mikroba

Urutan proses pengujian mikroba ialah sebagai berikut:

a. Persiapan sumuran

Pembuatan sumuran dilakukan dengan meletakkan pipet steril pada cawan petri streril dengan menggunakan pinset sebelum agar dan bakteri dimasukkan. Setelah agar dan bakteri dimasukkan, ditunggu sampai memadat. Ketika agar sudah memadat dan pipet yang telah kita taruh pada cawan kita angkat menggunakan pinset steril sehingga membentuk suatu sumuran dan diberikan label (Dewi, 2010).

b. Persiapan suspensi bakteri

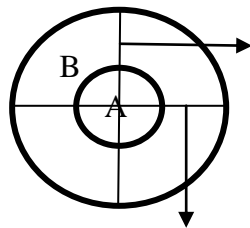
Biakan bakteri diambil sebanyak 1-2 ose dan disuspensikan kedalam larutan NaCL 0,9% sampai diperoleh kekeruhan yang sesuai dengan standar 0,5% *Mac Farland* atau sebanding dengan jumlah bakteri 10^8 (CFU)/mL. 100 μ l bakteri di ambil dan tuangkan kedalam 150 ml *Muller Hinton* Agar dan goyangkan sampai homogen (Dewi, 2010).

c. Pengisian sumuran dengan ekstrak daun sirih merah

Sumuran yang telah dibuat diisi dengan ekstrak daun sirih merah dengan konsentrasi yang telah ditentukan dengan menggunakan *micro pipet* sebanyak 50 μ l pada setiap sumur. Setelah itu, media dimasukkan kedalam inkubator pada suhu 37°C dan diamati setelah 24 jam kemudian diukur zona hambat dengan jangka sorong (Dewi, 2011).

d. Pengukuran zona hambat

Zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong dalam mm dengan cara mengukur zona hambat vertikal dan zona hambat horizontal yang ditambahkan dan dibagi 2. Perhitungan menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,05 cm.



Ket = A = lubang sumuran
 B = zona hambat
 a = D.vertikal
 b = D.horizontal
 perhitungan = $a+b:2$

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Ekstrak daun sirih merah dengan konsentrasi 100%, 75%, 50%, 25%, 12,5% dan 3,125%.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat untuk penelitian ini adalah diameter zona hambat ekstrak daun sirih merah terhadap pertumbuhan bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* dan bakteri gram negatif *Salmonella typhi*.

F. Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi Oprasional

Variabel	Definisi	Cara dan Alat Ukur	Hasil	Skala
Ekstrak daun sirih merah (<i>Piper crocatum</i>)	Ekstrak daun sirih merah didapatkan dengan proses maserasi dan menggunakan etanol 70% Konsentrasi dibuat dengan cara pengenceran menggunakan aquadest	Menimbang ekstrak dan menghitung menggunakan rumus $M_1V_1=M_2V_2$ Alat ukur dengan <i>analytical balanced</i> , gelas ukur, dan pipet tetes	Didapatkan konsentrasi ekstrak daun sirih merah 100%, 75%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%	Rasio (Numerik)
Terbentuknya zona hambat pada pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Salmonella typhi</i>	Tebentuknya zona bening di sekitar sumuran	Diameter zona hambat menggunakan jangka sorong	-	Numerik

G. Analisis Data

Analisis data yang digunakan pada penelitian ini dilakukan secara deskriptif laboratorik. Deskriptif yang dimaksud adalah dengan menerangkan dan memaparkan hasil dari penelitian yang didapat.

H. Etika Penelitian

Penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor surat 2208/UN26/8/DT/2014.