

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimen yaitu metode penelitian untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap perilaku yang timbul sebagai akibat perlakuan (Arikunto, 2010). Peneliti melakukan eksperimen untuk mengetahui pengaruh ekstrak air jahe (*Zingiber officinale*) Terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella sp* secara in vitro menggunakan metode kirby bauer.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada Senin, 12 April 2021 di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang Jl. Besar Ijen No. 77C Malang 65112.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah cawan petri steril, pipet ukur 20 ml steril, bunsen, korek api, ose bulat steril, gelas beaker 500ml, kulkas, inkubator, autoklaf, erlenmeyer 250ml, Laminar Air Flow, oven, batang pengaduk steril, spatula/ sendok steril, mortar dan alu, kaca arloji, kompor / hot plate, pinset steril, penggaris, neraca analitik, tabung reaksi, bola hisap, pisau.

3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah biakan bakteri *Salmonella sp*, media Muller Hinton Agar, media Nutrient Broth, kertas label, aquades, alkohol 70%, kapas, MC Farland 0,5, kertas perkamen / aluminium foil, benang wol, paper disc, kapas, lidi, amoksisilin.

3.4 Sampel

Sampel yang diambil pada penelitian ini adalah bagian rimpang jahe (*Zingiber officinale*.) yang dibuat menjadi ekstrak dengan pelarut air.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas (Independen)

Variabel independen atau variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab perubahan atau timbulnya variabel dependen (terikat) (Sugiyono, 2017). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak air jahe.

3.5.2 Variabel Terikat (Dependen)

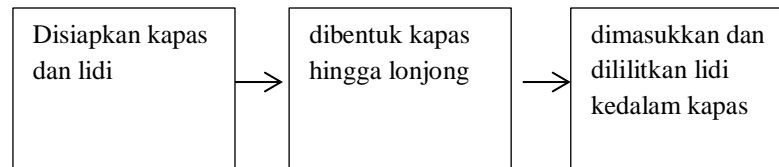
Variabel dependent atau variabel terikat merupakan variabel konsekuen, kriteria, dan output. Variabel dependen juga disebut sebagai variabel terikat. Adanya variabel terikat dapat menjadi akibat dan pengaruh bagi variabel tersebut (Sugiyono, 2013). Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Salmonella sp.* secara in vitro dilihat dari luas Diameter Daerah Hambat (DDH).

3.6 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi operasional variabel	Hasil ukur	Alat ukur	Skala
Konsentrasi ekstrak air jahe	merupakan cairan yang terbuat dari rimpang jahe yang di geprek dan dilarutkan dalam aquades dengan variasi konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100%	-	-	-
Luas DDH atau Diameter Daerah Hambat	luas daerah berwarna bening yang tidak ditumbuhi oleh bakteri <i>Salmonella sp</i>	Besar zona hambat dapat diukur dalam satuan cm.	Penggaris	Interval

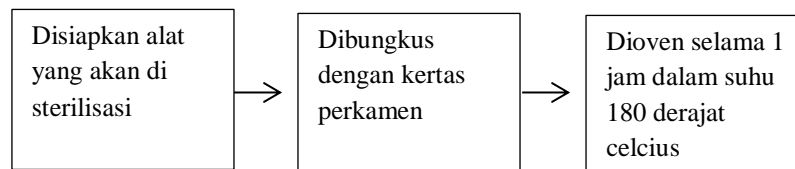
3.7 Metode Penelitian

3.7.1 Pembuatan Cotton Bud



Cotton bud digunakan sebagai alat untuk mengoleskan bakteri secara merata dalam media Muller Hilton Agar. Caranya yaitu kapas dibentuk sedikit lebih lonjong, lalu dimasukkan lidi ke dalamnya. Kemudian dililitkan kapas pada lidi.

3.7.2 Sterilisasi Alat



Dalam penelitian ini, seluruh alat disterilisasi terlebih dahulu sebelum digunakan. Sterilisasi dalam mikrobiologi merupakan suatu proses untuk mematikan semua organisme yang terdapat pada atau di dalam suatu benda. Ketika pertama kalinya melakukan pemindahan biakan bakteri secara aseptik, sesungguhnya hal tersebut telah menggunakan salah satu cara sterilisasi, yaitu dengan cara pembakaran (Hadioetomo, 1985). Hal ini dilakukan karena pada bahan maupun peralatan yang digunakan harus bebas dari mikroorganisme yang tidak diinginkan yang dapat merusak media atau koloni suatu mikroorganisme yang ditumbuhkan. Oleh karena itu, bekerja secara aseptik merupakan unsur penting dalam mikrobiologi (Nadira, dkk. 2019).

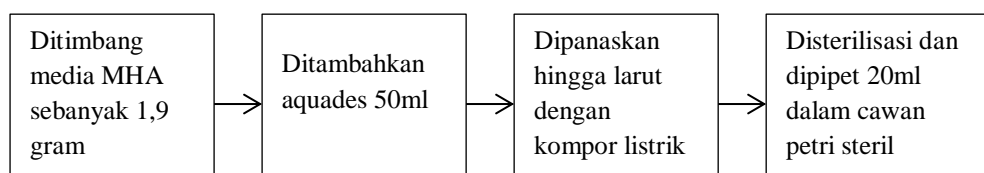
Peralatan gelas yang akan digunakan seperti pipet ukur, erlenmeyer, dan cawan petri dibungkus rapi menggunakan kertas perkamen lalu diikat dengan benang. Setelah terbungkus, dilakukan sterilisasi panas kering dengan menggunakan oven bersuhu 180°C selama 1 jam. Kemudian media yang akan digunakan beserta aquades di sterilisasi dengan autoklaf bersuhu 121°C selama 15 menit dalam tekanan 1,5 atm. Pada penelitian ini dilakukan metode sterilisasi alat

dilakukan dengan sterilisasi panas kering menggunakan oven dan sterilisasi media dengan panas basah menggunakan autoklaf. Sterilisasi ini termasuk dalam metode fisik, karena menggunakan panas lembab dan panas kering. Secara umum, panas merupakan metode sterilisasi yang paling praktis dan efisien. (Nadira, dkk. 2019).

Bahan atau wadah untuk mengemas peralatan pendukung diperlukan untuk menjaga peralatan dari tekanan dan suhu tinggi selama proses sterilisasi pada autoklaf (Istini, 2020) dan untuk menjaga kebersihan alat. Kapas digunakan untuk menutup mulut alat-alat yang berupa kaca seperti tabung reaksi dan erlenmeyer (yang berisi cairan atau media) terlebih dahulu sebelum dilakukan sterilisasi. Aluminium digunakan untuk membungkus alat, sedangkan benang digunakan untuk mengikat alat yang telah terbungkus aluminiumfoil.

Selanjutnya memasukkan semua peralatan yang telah dibungkus ke dalam oven untuk sterilisasi panas kering. Setelah memasukkan alat, lalu menutup oven dan mengatur suhunya sebesar 180°C dalam waktu 1 jam. Keadaan dalam suhu ini dapat mematikan mikroorganisme dan spora (Rafika. 2012). Kemudian menunggu proses sterilisasi hingga selesai sebelum mengeluarkan peralatan dari dalam oven. Peralatan yang telah dikeluarkan dari dalam oven telah steril dan siap untuk digunakan.

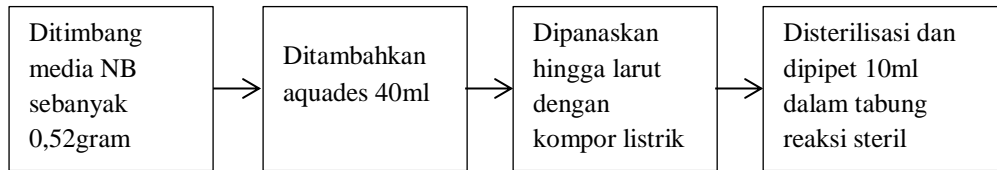
3.7.3 Pembuatan Media MHA



Muller Hinton Agar untuk metode kirby bauer. Dalam Capuucino (2008) metode ini menggunakan paper disc atau cakram yang disterilkan dan menggunakan media Muller Hinton Agar. Langkah-langkah yang dilakukan yaitu, ditimbang kaca arloji dengan neraca triple beam balance kemudian dicatat massanya. Selanjutnya dijumlah massa kaca arloji dengan massa media MHA yang harus ditimbang. Lalu, ditimbang media dan kaca arloji sesuai dengan hasil penjumlahan kaca arloji kosong dengan media yang harus ditimbang. Kemudian dipindahkan media MHA yang telah ditimbang ke dalam erlenmeyer 250ml dan

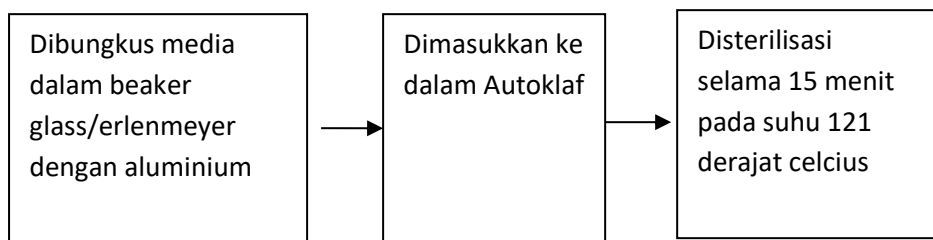
ditambah aquades sebanyak 50ml. Lalu, dipanaskan media diatas kompor listrik sambil diaduk hingga homogen.

3.7.4 Pembuatan Media NB



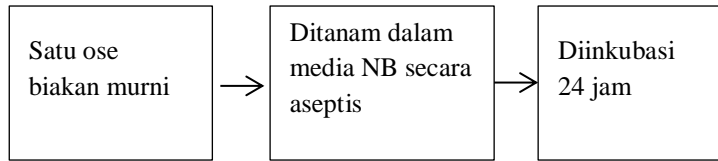
Penelitian ini menggunakan media Nutrient Broth untuk meremajakan biakan bakteri *Salmonella* sp. Ditimbang kaca arloji dengan neraca triple beam balance kemudian dicatat massanya. Selanjutnya dijumlah massa kaca arloji dengan massa media NB yang harus ditimbang. Lalu, ditimbang media dan kaca arloji sesuai dengan hasil penjumlahan kaca arloji kosong dengan media yang harus ditimbang. Kemudian dipindahkan media NB yang telah ditimbang ke dalam erlenmeyer 250ml dan ditambah aquades sebanyak 40ml. Lalu, dipanaskan media diatas kompor listrik sambil diaduk hingga homogen.

3.7.5 Sterilisasi Media



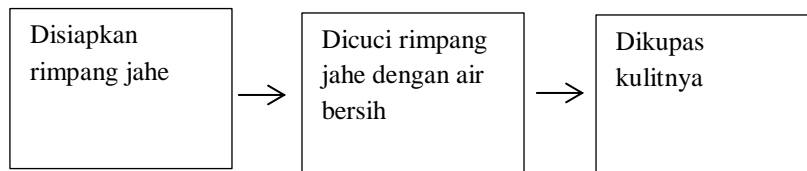
Selanjutnya dilakukan pembungkusan media sebelum sterilisasi dengan metode sterilisasi basah. Sterilisasi basah biasanya dilakukan dengan alat autoklaf dengan menggunakan uap air jenuh pada suhu 121 °C selama 15 menit. Penggunaan suhu 121 °C itu disebabkan oleh tekanan 1 atm pada ketinggian permukaan laut (Istini. 2020). Tekanan yang digunakan pada umumnya 15 Psi atau sekitar 1 atm. Dalam Rafika tahun 2012, Semua bentuk kehidupan akan mati jika dididihkan pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 15 menit. Setelah media steril, dilakukan pemipetan media sebanyak 10ml untuk media NB dalam tiap tabung reaksi steril dan 20ml untuk media MHA dalam tiap cawan petri steril.

3.7.6 Peremajaan Bakteri dalam Media NB



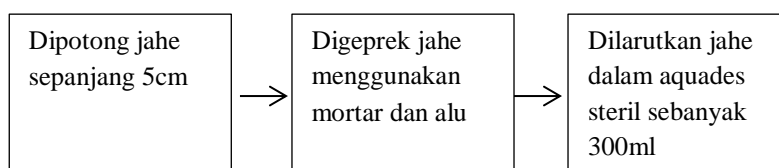
Prosedur ini dilakukan secara aseptis di dalam Laminar Air Flow, pertama diambil koloni bakteri dalam biakan murni *Salmonella sp* sebanyak 1 ose secara aseptis, lalu ditanamkan ke dalam media NB dalam tabung reaksi. Kemudian dimasukkan kedalam inkubator untuk di inkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu amati kekeruhan yang terjadi pada media. Peremajaan bakteri bertujuan agar bakteri memulai metabolisme kembali setelah penyiapan (Nanik, 2014).

3.7.7 Pengolahan Sampel



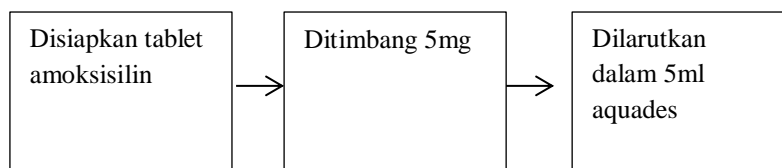
Dalam pembuatan ekstrak air jahe, langkah awal yang dilakukan yaitu disiapkan jahe segar untuk dicuci bersih dengan air mengalir, lalu dikupas dan dipotong menggunakan pisau steril dengan ukuran 5 cm. Selanjutnya, digeprek jahe dengan menggunakan mortar alu steril. Kemudian dilarutkan jahe yang sudah di geprek dengan aquades steril sebanyak 300 ml. Kemudian diaduk hingga warna menjadi keruh. Penggunaan aquades steril ini dilakukan karena dalam mikrobiologi, alat dan bahan yang akan digunakan harus dalam keadaan steril agar tidak tercemar oleh mikroorganisme yang tidak diinginkan (Nadira, dkk. 2019).

3.7.8 Pembuatan Ekstrak Air Jahe



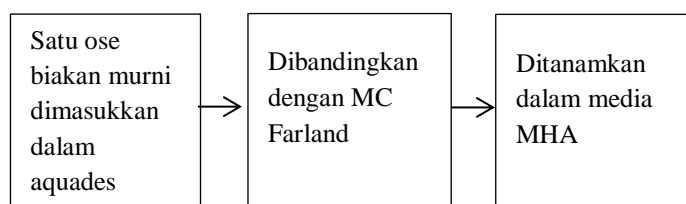
Prosedur pembuatan ekstrak ini dilakukan secara aseptis. Langkah pertama yang dilakukan yaitu jahe yang telah dicuci bersih, digeprek dan dilarutkan dalam aquades steril. Ekstrak air jahe ini dibuat dengan 5 variasi konsentrasi yaitu, 0% (kontrol negatif), 25%, 50%, 75% dan 100%. Pembuatan Variasi konsentrasi dibuat dengan metode pengenceran dari ekstrak air jahe konsentrasi 100% menggunakan pipet ukur steril. Untuk konsentrasi 25% dipipet ekstrak 100% sebanyak 10ml, untuk konsentrasi 50% dipipet sebanyak 20ml, dan konsentrasi 75% dipipet sebanyak 30ml. Setelah itu, ditambahkan aquades steril hingga memiliki volume sebanyak 40ml. Untuk konsentrasi 0% yang digunakan sebagai kontrol negatif adalah aquades steril.

3.7.9 Kontrol positif dengan Amoksisilin



Pembuatan kontrol positif dilakukan secara aseptis dengan kaca arloji steril. Langkah pertama yaitu disiapkan tablet amoksisilin kemudian ditimbang sebanyak 5mg dengan neraca analitik. Kemudian dilarutkan dengan 5ml aquades dalam beaker glass. Lalu diaduk hingga larut dan diletakkan paper disc dalam larutan untuk direndam. Alasan penggunaan amoxicillin sebagai kontrol positif ini adalah karena merupakan antibiotik. Antibiotik merupakan bahan yang dikeluarkan oleh mikroorganisme dan bersifat antagonik terhadap pertumbuhan dan hidup mikroorganisme lain (Rifka. 2014).

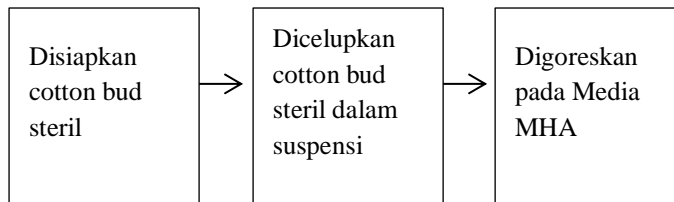
3.7.10 Pembuatan Suspensi dengan Perbandingan Kekeruhan MC Farland 0,5



Pembuatan suspensi bakteri dilakukan secara aseptis di dalam Laminar Air Flow. Langkah pertama, koloni bakteri diambil dengan menggunakan ose

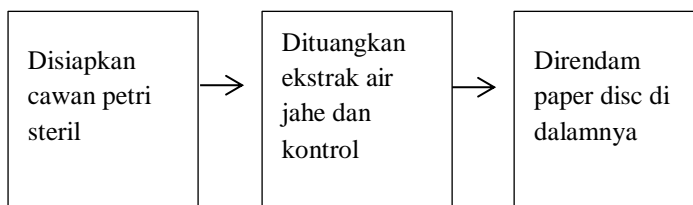
bulat steril, dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi aquades steril kemudian dihomogenkan. Kekeruhan dibandingkan dengan standar kekeruhan Mc Farland, kemudian suspensi bakteri tersebut diambil menggunakan cotton bud steril dan digoreskan pada media MHA (Farid,dkk 2019).

3.7.11 Inokulasi Bakteri Pada Media MHA



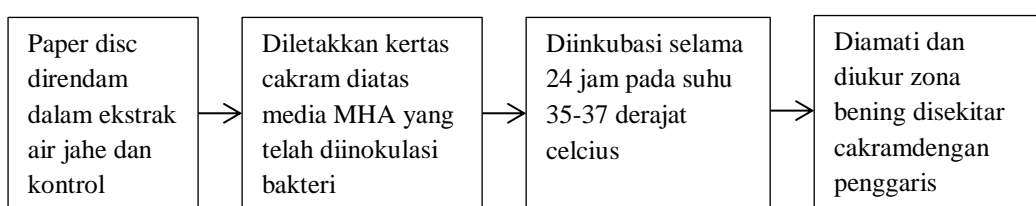
Dalam menanamkan bakteri pada media NB dilakukan secara aseptis dalam laminar air flow dengan menggunakan cotton bud steril, yang kemudian dicelupkan dalam suspensi yang telah dibandingkan kekeruhannya dengan MC Farland 0,5. Setelah itu menggoreskan cooton bud pada media MHA secara merata.

3.7.12 Perendaman Paper Disc



Prosedur ini dilakukan secara aseptis dalam laminar air flow. Langkah yang dilakukan yaitu disiapkan cawan petri steril, lalu dituangkan setiap variasi ekstrak air jahe beserta kontrol ke dalam masing-masing cawan petri steril. Kemudian dimasukkan paper disc ke dalam masing-masing cawan petri berisi ekstrak dan kontrol.

3.7.13 Uji Daya Hambat Ekstrak Air Jahe Terhadap Bakteri



Metode pengujian ini menggunakan metode Kirby-Bauer yang dilakukan di dalam Laminar Air Flow, beberapa paper disc direndam dalam kontrol negatif dan beberapa paper disc yang lain direndam dalam masing masing variasi konsentrasi ekstrak air jahe dengan variasi konsentrasinya adalah 0% (kontrol negatif), 25%, 50 %, 75%, 100%, dan kontrol positif amoksisilin dengan dua kali ulangan. Paper disc yang sudah direndam tersebut diletakkan di atas permukaan media MHA yang telah diinokulasi bakteri *Salmonella* dengan pinset steril. Kemudian diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 24 jam. Diameter hambatan diukur dengan penggaris (Elza. 2018).

3.8 Pengolahan, Penyajian dan Analisis Data

Hasil uji berupa luas daerah bening yang tidak ditumbuhi koloni disekitar paper disc yang di diukur dengan menggunakan penggaris lalu dibandingkan dengan tabel kategori diameter zona hambat untuk mengetahui kekuatan hambatnya. Data diameter zona bening yang dihasilkan pada penelitian dianalisis statistik menggunakan analisis data ANOVA yaitu One Way Anovw secara manual menggunakan Ms. Excel untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang signifikan.