

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan ini bersifat analitik laboratorik dengan menggunakan desain penelitian eksperimen perbandingan satu kelompok statis (*static group comparison*)(Notoadmodjo dalam Agusmansyah, 2017). Pada penelitian ini berusaha meneliti perbandingan antara produk-produk Sari Cuka Apel yang ada di pasaran terhadap diameter zona hambat *Salmonella typhi*. Tahap penelitian ini meliputi pengumpulan produk Cuka Sari Apel. Pemiakan bakteri *Salmonella typhi* dan melakukan uji antibakteri dengan metode difusi sumuran kemudian analisis data.

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi dan sampel pada penelitian ini adalah produk Cuka Sari Apel.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Farmakognosi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang pada bulan Desember 2018 sampai juni 2019.

3.4 Definisi Operasional Variabel

Variabel-variabel yang terdapat pada penelitian ini adalah variabel bebas (variabel yang mempengaruhi) yaitu produk Cuka Sari Apel dan variabel terikat (variabel yang dipengaruhi) yaitu aktivitas antibakteri *Salmonella typhi*.

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Cuka Sari Apel	cairan hasil fermentasi sari buah apel segar yang mula-mula gula diubah menjadi alkohol (etanol), kemudian alkohol ini diubah menjadi asam asetat	Menggunakan persamaan $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$ Keterangan : N_1 = konsentrasi awal V_1 = volume awal N_2 = konsentrasi akhir V_2 = Volume Akhir	Cuka sari apel dengan kadar dan volume akhir yang diinginkan	Nominal
Aktivitas antibakteri <i>Salmonella Typhi</i>	Mekanisme penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri oleh senyawa antibakteri.	Menggunakan Jangka sorong atau penggaris	Zona hambat (mm)	Nominal

3.5 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah rak dan tabung reaksi(Pyrex), ose, beker glass, pipet tetes, kapas alkohol, cawan petri, batang pengaduk, autoclave(Memmert), dan inkubator.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Produk Cuka Sari Apel, Bakteri *Salmonella typhi* yang didapatkan dari laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya Malang, Media SSA (Salmonella-Shigella Agar) (Oxoid), Aquadest steril, NaCl 0,9%.

3.6 Pengumpulan Data

Penelitian yang dilakukan ini bersifat analitik laboratorik. Dalam penelitian ini, Produk Cuka Sari Apel dimasukkan kedalam sumuran yang telah dibuat, kemudian diamati zona hambat dari pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*. Penelitian ini akan dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali.

3.6.1 Sterilisasi Alat

Alat dan bahan penelitian disterilisasi, kecuali Cuka Sari Apel dan suspensi bakteri, agar bebas dari pengaruh mikroorganisme lain yang mungkin mempengaruhi hasil penelitian. Sterilisasi alat dilakukan dengan cara:

1. Alat-alat yang digunakan dimasukkan kedalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15-20 menit.
2. Alat-alat ditunggu sampai mencapai suhu kamar dan kering.

3.6.2 Pembuatan Media

Dilakukan pembuatan media agar SSA dengan cara, sebagai berikut:

1. Timbang 21.298 gram SSA
2. Larutkan SSA dalam 338 ml aquades
3. Panaskan diatas bunsen sampai mendidih.

3.6.3 Peremajaan Bakteri

Dilakukan peremajaan bakteri menggunakan media SSA, dengan cara:

1. Mengambil 1 ose biakan murni bakteri dan goreskan pada media SSA
2. Masukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 48 jam.

3.6.4 Pembuatan Standart Kekeruhan Larutan McFarland

Larutan baku McFarland terdiri atas 2 komponen, yaitu larutan BaCl₂ 1% dan H₂SO₄ 1%. Pembuatan Standart Kekeruhan Larutan McFarland dilakukan dengan cara:

1. Diambil larutan BaCl₂ 1% sebanyak 0,05 ml dengan menggunakan pipet volume lalu masukkan ke dalam labu ukur 10 ml.
2. Masukkan larutan H₂SO₄ 1% ke dalam labu ukur sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen. Nilai absorban larutan baku McFarland 0,5 ekuivalen dengan suspensi sel bakteri konsentrasi $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (Kawengian dkk, 2017).
3. Larutan harus dikocok terlebih dahulu hingga homogen setiap akan digunakan untuk membandingkan suspensi bakteri.

3.6.5 Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara:

1. Bakteri hasil peremajaan dibuat suspensi dengan menambahkan NaCl 0,9% didalam tabung yang berbeda, sampai didapatkan kekeruhan yang disesuaikan dengan standar kekeruhan *McFarland* 0,5 untuk mendapatkan bakteri sebanyak 10^8 CFU/ml.
2. Cara menyesuaikan suspensi bakteri agar sama dengan kekeruhan *McFarland* adalah dengan memegangnya secara berdampingan, satu tabung standar dan satu tabung suspensi bakteri.
3. Kekeruhan dilihat dan dibandingkan secara langsung dengan meletakan tabung reaksi yang berisi suspensi bakteri dan kekeruhan *McFarland* didepan kertas putih yang diberi garis tebal dengan spidol berwarna.
4. Jika kurang keruh, suspensi ditambahkan koloni sedangkan jika lebih keruh ditambahkan NaCl 0,9%.

3.6.6 Uji Aktivitas Antibakteri

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode difusi sumuran, yaitu dengan cara:

1. Mencampurkan 1 ml suspensi bakteri *Salmonella typhi* pada larutan media agar SSA, lalu diaduk dengan cara memutar gelas dan tuangkan kedalam cawan petri secara pour plate.
2. Beri satu lubang pada bagian tengah media SSA yang sudah padat dengan diameter 8 mm. Lubang pada media diberi larutan cuka sari apel sebanyak 200 μ l dengan ketentuan sebagai berikut:

Tabel 3.2 Merek Cuka Sari Apel Pada Cawan Petri

Nomor Cawan	Merek Cuka Sari Apel
Cawan 1 sampai 5	Merek A
Cawan 6 sampai 10	Merek B
Cawan 11 sampai 15	Merek C
Cawan 16 sampai 20	Merek D
Cawan 21 sampai 25	Merek E

3. Media lalu diinkubasi pada suhu kamar 37°C selama 24 sampai 48 jam.
4. Diukur zona hambat yang terbentuk disekitar sumuran dengan menggunakan penggaris atau jangka sorong.

3.7 Analisa Data

Uji statistik yang digunakan adalah uji *One-Way Anova*. Interpretasi uji statistik ini, yaitu;

1. Bila $p < \alpha$ (0,05) maka hasil bermakna/ signifikan, artinya terdapat hubungan bermakna antara variabel independen dan dependen, atau hipotesis penelitian diterima. Kemudian dilanjutkan uji Tukey.

Bila $p > \alpha$ (0,05) maka hal ini berarti dua sampel yang diteliti tidak mendukung adanya perbedaan yang bermakna, atau hipotesis penelitian ditolak. Namun jika data penelitian tidak normal, maka akan dinormalisasiterlebihdahulu, setelah itu bila data masih tidak normal akan digunakan uji alternatif *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Man-Whitney*.