

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **1.1 Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### **1.1.1 Lokasi**

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Universitas Katolik Widya Mandira Kupang

##### **1.1.2 Waktu**

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Agustus – September 2018

#### **1.2 Alat dan Bahan penelitian**

##### **1.2.1 Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah

1. Erlenmeyer (*Approx*)
2. gelas ukur (*Pyrex*)
3. gelas kimia (*Approx*)
4. tabung reaksi
5. rak tabung reaksi
6. pipet tetes
7. penangas air
8. blender
9. kaca arloji
10. timbangan analitik (*Kern*)
11. labu ekstraksi

12. batang pengaduk
13. *stirrer*
14. cawan petri (*Normax*)
15. *rotary evaporator*
16. jarum ose
17. pinset
18. inkubator
19. *laminair air flow (Bioteck)*
20. termometer
21. pencadang
22. autoklaf
23. mikropipet (*Ecopipette*)
24. mistar berskala
25. Lampuspriritus

### **1.2.2 Baham**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah

1. Daun maja
2. Etanol 95%
3. Biakan Bakteri *S.aureus*
4. Aquades steril
5. Media MHA ( *Mueller Hinton Agar* )
6. Media NA ( *Nutrient Agar* )
7. NaCl

### **1.3 Populasi dan Sampel**

#### **1.3.1 Populasi**

Populasi pada penelitian ini adalah daun Maja yang diambil dari Kecamatan Alak Kelurahan Nunbaun Delha Kota Kupang.

#### **1.3.2 Sampel**

Sampel penelitian ini adalah ekstrak daun Maja.

### **1.4 Variabel Penelitian**

#### **1.4.1 Variabel Bebas**

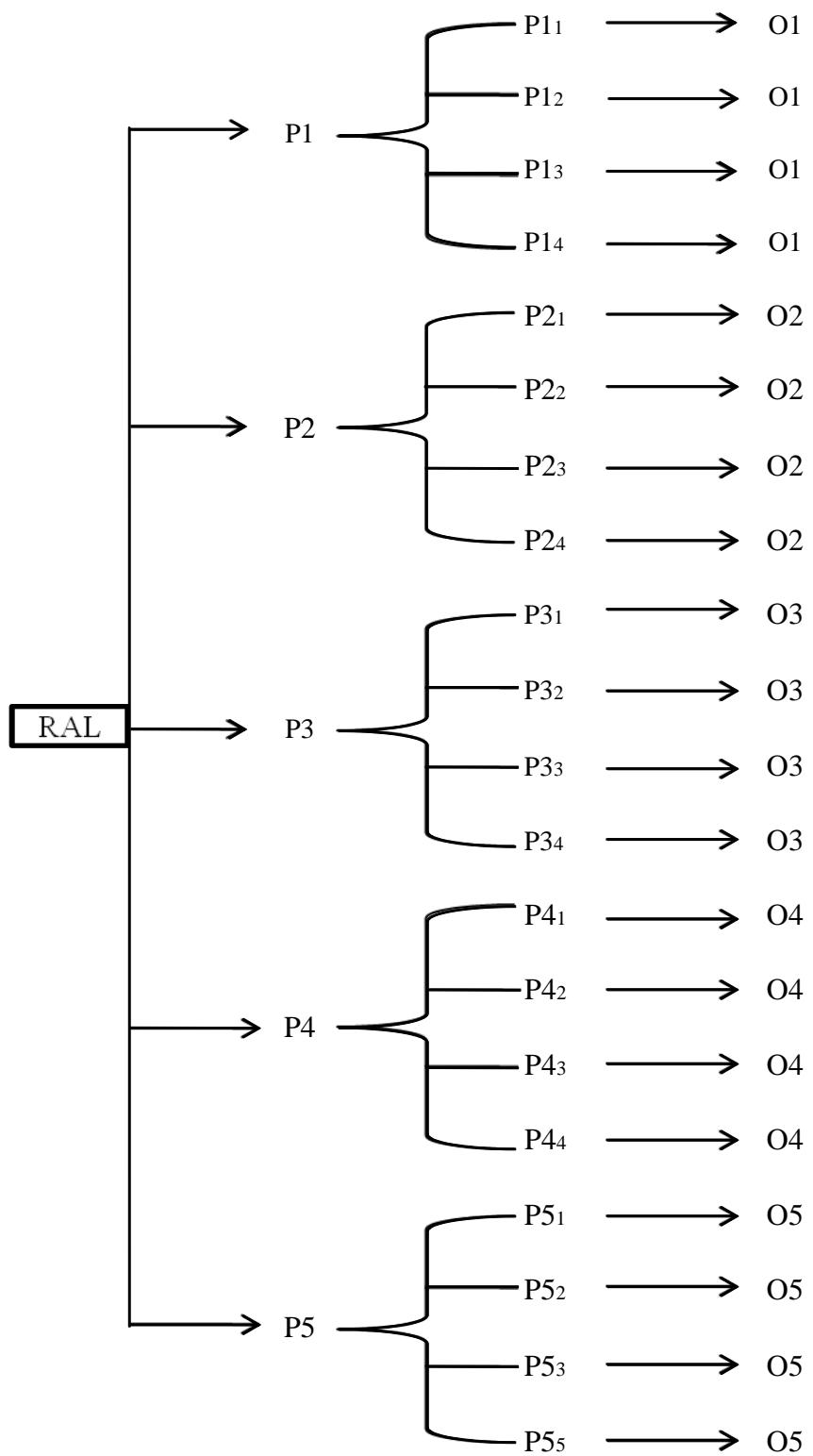
Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun Maja dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.

#### **1.4.2 Variabel Terikat**

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *staphylococcus aureus*

### **1.5 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan acak lengkap (RAL) dengan menggunakan *The Postest Only Control Group Design*, dengan 5 perlakuan yaitu P1=20%, P2=40%, P3=60%, P4=80%, P5=100% yang akan diulang sebanyak 4 kali (Muhammad Zainudin, 2002). Kontrol 0% (sebagai kontrol negatif) menggunakan 1 ml aquades.



Gambar 3.1 Bagan desain penelitian

Tabel 3.1 Denah penempatan tabung

P <sub>1.1</sub>	P <sub>3.1</sub>	P <sub>0.1</sub>	P <sub>1.2</sub>
P <sub>2.1</sub>	P <sub>0.2</sub>	P <sub>2.2</sub>	P <sub>0.3</sub>
P <sub>1.3</sub>	P <sub>1.4</sub>	P <sub>2.3</sub>	P <sub>3.2</sub>
P <sub>0.4</sub>	P <sub>3.3</sub>	P <sub>2.4</sub>	P <sub>3.4</sub>

Keterangan

P1-P5 : Perlakuan dengan ekstrak daun maja

O1-O5 : Pengamatan ekstrak daun maja

## 1.6 Prosedur Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan dengan tahapan sebagai berikut :

### 1.6.1 Tahap Persiapan

#### 1.6.1.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian aktivitas antibakteri ini disterilkan terlebih dahulu. Alat-alat gelas dan media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15-20 menit sedangkan untuk jarum ose dan pinset disterilisasikan dengan cara dibakar diatas api langsung menggunakan lampuspritus (Lay dan Hastowo, 1992).

#### 1.6.1.2 Pembuatan Media

##### 1. Media MHA (*Mueller Hinton Agar*)

Ditimbang 3,8 gram serbuk media *Mueller Hinton Agar* dimasukan dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan 100 ml aquades steril, dikocok hingga homogen dan disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15

menit. Setelah itu dituangkan kedalam cawan petri dengan ketebalan 2 mm, didiamkan hingga agar dingin dan membeku

### **1.6.2 Menyiapkan Bahan Uji**

#### **1.6.2.1 Persiapan Ekstrak**

Sampel berupa daun Maja dikumpulkan kemudian dibersihkan dari sisa kotoran, selanjutnya dicuci dibawah air mengalir sampai bersih. Setelah bersih dari kotoran, daun maja ditiriskan, lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah itu, Sampel yang telah kering dihaluskan dengan blender sampai menjadi serbuk. Serbuk yang dihasilkan diayak dengan ayakan mesh 60, hingga diperoleh serbuk yang halus dan homogen. Hasilnya dimasukkan kedalam wadah gelas tertutup.

#### **1.6.2.2 Ekstrasi Daun Maja**

Ekstrak daun maja diperoleh dengan cara maserasi. Sebanyak 100 gram serbuk simplisia daun maja dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian direndam dengan larutan etanol 96% sebanyak 1000 ml, ditutup dengan *aluminium foil* dan dibiarkan selama 1 hari sambil sesekali diaduk. Setelah 1 hari, sampel yang direndam tersebut disaring menggunakan kertas saring menghasilkan filtrat 1 dan residu 1. Residu yang ada kemudian ditambah dengan larutan etanol 96% sebanyak 5 ml, ditutup dengan *aluminiumfoil* dan dibiarkan selama 1 hari sambil sesekali diaduk. Setelah 1 hari, sampel tersebut disaring menggunakan kertas saring menghasilkan filtrat 2 dan residu 2. Filtrat 1 dan 2 dicampur menjadi satu, lalu dievaporasi menggunakan *rotary evaporator*, sehingga diperoleh ekstrak

kental daun maja . ekstrak kental yang dihasilkan dimasukkan kedalam water bath diuapkan hingga seluruh pelarut etanol menguap. ekstrak ditimbang dan disimpan dalam wadah gelas tertutup sebelum digunakan untuk pengujian (Anonim, 1986).

### **1.6.2.3 Pembuatan Konsentrasi**

Menurut ( Polmer, 2011 ) pembuatan konsentrasi menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Konsentrasi} = \frac{m}{V} \times 100 \%$$

Keterangan :

% Konsentrasi : Konsentrasi ekstrak

m : Massa / berat ekstrak ( gram )

v : Volume pelarut (ml)

$$1. \quad \text{Konsentrasi } 20\% = \frac{m}{10 \text{ ml}} \times 100\%$$

$$20 \% = \frac{100 \text{ ml}}{10 \text{ ml}}$$

$$100 \% \text{ m} = 20 \% \times 10$$

$$100 \text{ m} = 200$$

$$m = \frac{200}{100} = 2 \text{ gram ekstrak}$$

Konsentrasi 20 % menggunakan 2 gram ekstrak dilarutkan dengan aquades steril hingga mencapai volume pada labu ukur 10 ml.

2. Konsentrasi 40 % =  $\frac{m}{10 \text{ ml}} \times 100\%$

$$40 \% = \frac{100 \text{ ml}}{10 \text{ ml}}$$

$$100 \% = 40 \times 10$$

$$100 \text{ ml} = 400$$

$$m = \frac{400}{100} = 4 \text{ gram}$$

Konsentrasi 40 % menggunakan 4 gram ekstrak dilarutkan dengan aquades steril hingga mencapai volume pada labu ukur 10 ml.

3. Konsentrasi 60 % =  $\frac{m}{10 \text{ ml}} \times 100\%$

$$60 \% = \frac{100 \text{ ml}}{10 \text{ ml}}$$

$$100 \% = 60 \times 10$$

$$100 \text{ ml} = 600$$

$$m = \frac{600}{100} = 6 \text{ gram}$$

konsentrasi 60 % menggunakan 6 gram ekstrak dilarutkan dengan aquades steril hingga mencapai volume pada labu ukur 10 ml.

4. Konsentrasi 80 % =  $\frac{m}{10 \text{ ml}} \times 100\%$

$$80 \% = \frac{100 \text{ ml}}{10 \text{ ml}}$$

$$100 \% = 80 \times 10$$

$$100 \text{ ml} = 800$$

$$m = \frac{800}{100} = 8 \text{ gram}$$

konsentrasi 80 % menggunakan 8 gram ekstrak dilarutkan dengan aquades steril hingga mencapai volume pada labu ukur 10 ml.

$$5. \text{ Konsentrasi } 100 \% = \frac{m}{10 \text{ ml}} \times 100\%$$

$$100 \% = \frac{100 \text{ ml}}{10 \text{ ml}}$$

$$100 \% = 100 \times 10$$

$$100 \text{ m} = 1.000$$

$$m = \frac{1000}{100} = 10 \text{ gram}$$

konsentrasi 100 % menggunakan 10 gram ekstrak dilarutkan dengan aquades steril hingga mencapai volume pada labu ukur 10 ml.

### 1.6.3 Pembuatan Larutan Standar Mc Farland

Pembuatan larutan Mc farland yang disiapkan yaitu 0,5 ml dengan prosedur sebagai berikut:

1. Masukan Barium klorida ( $\text{BaCl}_2$  1.175%) 1 gram dan sebanyak 100 ml aquades.
2. Masukan 1% larutan asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 1,1 ml dan 50 ml aquades.
3. Campurkan kedua larutan yang telah dibuat dengan perbandingan 0,05ml  $\text{BaCl}_2$  dan 9,95 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1% secara lengkap tercamtum pada tabel berikut

Tabel 3.2 perbandingan 0,05ml  $\text{BaCl}_2$  dan 9,95 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1%

No. Tabung	$\text{BaCl}_2$ 1,175% (ml)	$\text{H}_2\text{SO}_4$ 1% (ml)	Jumlah Bakteri $10^8/\text{ml}$
1.	0,005	9,95	1,5
2.	0,1	9,9	3
3.	0,2	9,8	6
4.	0,3	9,7	9
5.	0,4	9,6	12
6.	0,5	9,5	15
7.	0,6	9,4	18
8.	0,7	9,3	21
9.	0,8	9,2	24
10.	0,9	9,1	27
11.	1,0	9,0	30

4. Simpan pada suhu kamar di tempat gelap dan tidak terkena sinar matahari
5. Penyimpanan pada suhu kamar dapat digunakan untuk 1 tahun.

## **1.7 Tahap Pelaksanaan**

### **1.7.1 Persiapan Bakteri Uji**

### **1.7.2 Peremajaan bakteri *S. Aureus***

Diambil 1 ose kultur bakteri *S. Aureus* kemudian digoreskan pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*) miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam

### **1.7.3 Pembuatan inokulum *S. Aureus***

Biakan Murni *S. Aureus* yang telah diremajakan, diambil 1 ose lalu disuspensikan dalam 10 ml NaCl kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam

### **3.7.4 Pengenceran *S. Aureus***

Diambil 1 inokulum bakteri *S. Aureus* dimasukan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 ml media sebagai pengenceran  $10^{-1}$ , diambil 1 ml dimasukan kedalam tabung reaksi kedua yang berisi 9 ml NaCl sebagai pengenceran  $10^{-2}$ , dst. Setelah itu dipindahkan kedalam cawan petri, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

## **1.8 Tahap Perlakuan**

### **1.8.1 Uji Aktivitas Antibakteri**

#### **1.8.1.1 Uji Awal**

Pengenceran bakteri yang digunakan adalah pengenceran yang jumlah koloni  $10^{-5}$  dibuat sebanyak 5 tabung, masing-masing tabung ditambah dengan ekstrak daun

maja dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%. Lalu masing-masing tabung di pipet 0,1 ml dipindahkan ke cawan petri, kemudian ditambahkan media MA, lalu di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi koloni yang tumbuh dihitung lalu dikonversi menggunakan rumus SPC.

#### **1.8.1.2 Uji Sesungguhnya**

Berdasarkan hasil uji pendahuluan, maka dilakukan uji sesungguhnya untuk memperoleh nilai daya hambat minimum.

#### **1.8.2 Pengumpulan data**

Adapun jenis data yang dikumpulkan adalah jumlah koloni yang tumbuh pada setiap perlakuan dan pengulangan

#### **1.8.3 Analisis data**

Analisis data yang digunakan untuk mengetahui uji aktivitas antibakteri ekstrak daun Maja (*Aegle marmelos*(L.)Correa) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan mengkoversi data sesuai *Total Plate Count* (TPC). *Total Plate Count* digunakan untuk mendapatkan jumlah koloni yang sesungguhnya dengan rumus.

Rumus : Standar Plate Count SPC ( Fardiaz, 1992 )

$$SPC = \text{Jumlah koloni tiap plate} \times \frac{\text{suspensibakteri}}{\text{faktorpengencer}}$$