

III. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian adalah eksperimen laboratorik dengan metode difusi (sumuran). Perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak enam kali sehingga digunakan 12 unit percobaan.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung pada bulan November 2014–Desember 2014. Ekstraksi dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

3.3 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah daun kemuning yang diambil dari lapangan di daerah sekitar Kemiling. Daun kemuning dipilih yang muda, segar, berwarna hijau, dan merupakan pucuk dengan 4 daun pertama. Dan

isolat bakteri *E. coli* dan *S. aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Kesehatan Daerah Bandar Lampung.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian terdiri dari dua jenis, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak daun kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack) dengan 4 tingkat konsentrasi, yaitu konsentrasi 20%, 30%, 40% dan 50%. Semua perlakuan diulang sebanyak 6 kali. Variabel terikat pada penelitian ini adalah diameter zona hambat.

Pengulangan dilakukan sebanyak 6 kali, dari hasil perhitungan yang diperoleh dengan menggunakan rumus *Federer* (Setiawan R., 2010) yaitu:

$$(n - 1) (t - 1) \geq 15$$

$$(n - 1) (4 - 1) \geq 15$$

$$(n - 1) (3) \geq 15$$

$$n - 1 \geq 5$$

$$n \geq 6$$

Keterangan:

n = jumlah pengulangan

t = jumlah perlakuan

3.5 Alat, Bahan dan Media

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

- a) Cawan petri
- b) Mikropipet

- c) Tabung reaksi dan rak tabung
- d) Lubang difusi cakram
- e) Ose bulat
- f) Lampu spirtus
- g) Blender
- h) Lidi kapas steril
- i) Corong
- j) Pembolong (*punch hole*)

Bahan uji yang digunakan yaitu daun kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack.). Bahan lain yang diperlukan adalah media *Muller Hinton Agar* (MHA) aquades, isolat bakteri *E. coli* dan *S. aureus* yang didapat dari Laboratorium Kesehatan Daerah Bandar Lampung.

3.6 Definisi Operasional

Untuk membatasi ruang lingkup atau pengertian variabel-variabel diamati/diteliti, variabel-variabel tersebut perlu diberi batasan atau definisi operasional (Notoatmodjo & Soekidjo, 2012). Definisi operasional dari masing-masing variabel yang akan diteliti adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Skala
Konsentrasi ekstrak daun kemuning	Pemberian ekstrak daun kemuning dengan konsentrasi 20%, 30%, 40%, 50%. Kontrol negatif Aquades			Ordinal
Zona hambatan.	Diameter zona bening yang muncul di sekitar lubang yang berisi larutan uji pada media agar.	Diukur dalam milimeter untuk mengetahui daya antibakteri ekstrak uji.	Penggaris atau jangka sorong.	Numerik

3.7 Prosedur Penelitian

1. Sterilisasi

Semua alat yang akan digunakan dalam penelitian ini sebelumnya disterilkan dalam *autoclave* menggunakan suhu 121°C selama 15 menit.

2. Pembuatan suspensi bakteri

Kultur bakteri uji yang akan digunakan disiapkan dengan cara mengambil satu ose bakteri dari agar miring kemudian diinokulasikan ke dalam media *Nutrient Broth* (NB) steril. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam didapatkan inokulum yang langsung dapat digunakan untuk pengujian aktivitas antimikroba

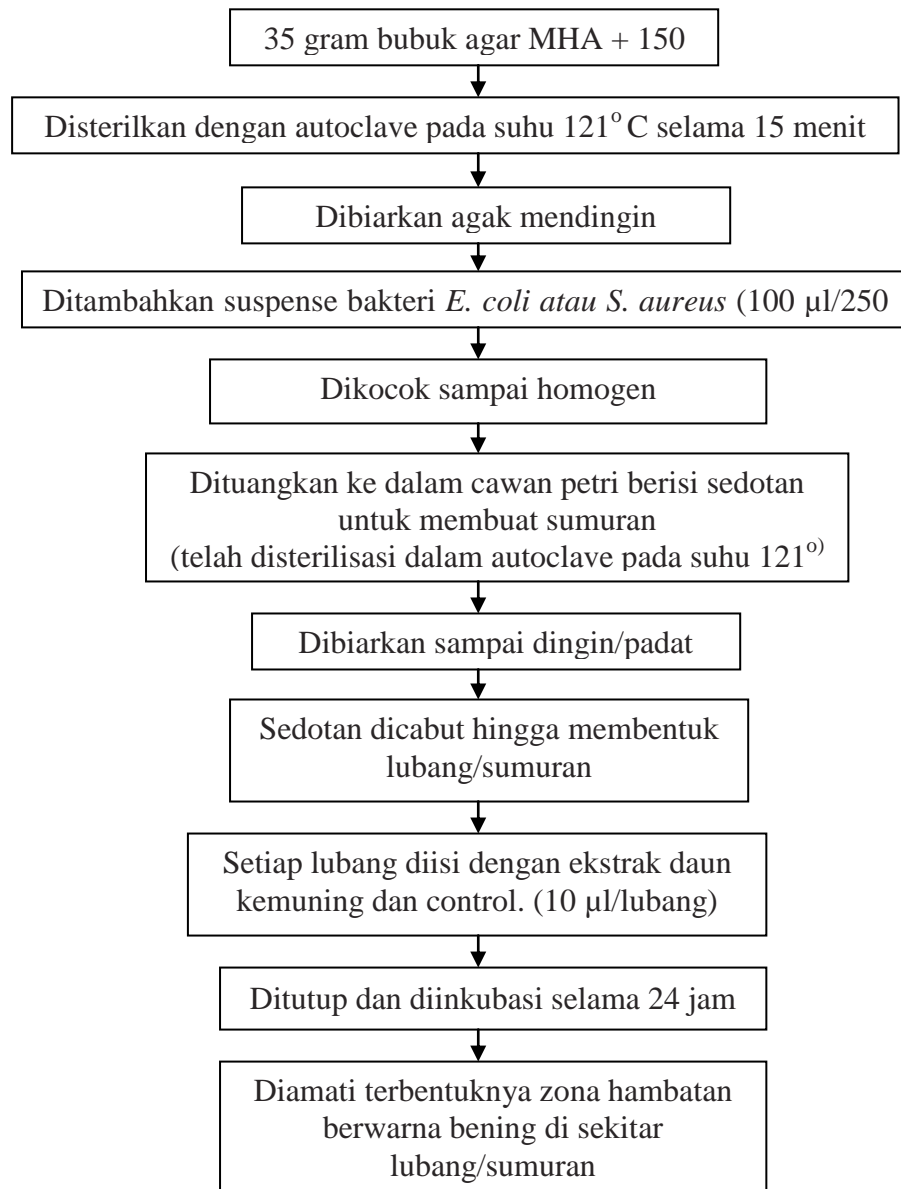
3. Prosedur Pembuatan *Muller Hinton Agar* (MHA)

Sebanyak 3 gram MHA dilarutkan dalam 150 ml aquades, kemudian dipanaskan dan diaduk sampai larut pada erlenmeyer. Media disterilkan dengan autoklaf selama 10 menit dengan suhu 121° C.

4. Pembuatan Lubang Sumur

- Siapkan cawan petri dan cetakan sumur dengan diameter \pm 6mm dengan tinggi 1 cm, yang sebelumnya telah disterilkan, dan diletakkan enam buah pada tiap-tiap cawan petri.
- Dituangkan 100 μ l suspensi masing-masing *E. Coli* dan *S. aureus* dalam NB yang telah dibuat sebelumnya kedalam media MHA, kemudian digoyangkan supaya homogen. Kemudian tuang MHA tersebut sebanyak 10 ml ke masing-masing cawan petri yang sudah diletakkan sedotan sebelumnya dan dibiarkan hingga agar MHA mengeras.
- Tuangkan sampel (ekstrak daun kemuning) sebanyak 50 μ l dalam masing-masing sumur dan inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37° C. Tiap cawan petri berisi empat jenis konsentrasi dan kontrol negatif.
- Kemudian sediaan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- Keesokan harinya dilakukan pengukuran diameter zona hambat menggunakan jangka sorong.

3.8 Alur Penelitian



3.9 Analisis data

Data yang diperoleh adalah data primer, yang didapatkan dari hasil pengamatan dan pengukuran diameter zona bening di sekitar kertas cakram. Data dianalisis dan diuraikan secara deskriptif.