

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Januari 2011 hingga bulan Juni 2011 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Unila.

B. Alat dan Bahan

1. Alat yang digunakan

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi peralatan gelas yang umum digunakan di Laboratorium dan peralatan mikrobiologis diantaranya: Alat pengguncang (*Environ shaker*), lemari *Laminar Air Flow* (LAF) (Cruma 9005-FL), inkubator (*Hotcold M P-Selecta*), autoklaf (Tomy Seiko Co., Ltd, Tokyo, Japan, S-90N), cawan petri, pembakar bunsen, jarum *ose*, mikropipet 100 μL -1000 μL dan mikropipet 20 μL -200 μL , alat pelubang, dan jangka sorong.

2. Bahan yang digunakan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah produk komersial yaitu madu hutan dan ekstrak propolis, antibiotik ampisilin (Meiji Seika Kaisha, Ltd, Tokyo, Japan), akuades, *nutrient agar* (NA) (E.Merck), *nutrient broth* (NB) (E.Merck), *luria agar* (LA) (E.Merck), *luria broth* (LB) (E.Merck), kultur mikroba *E. coli* dan *S. aureus* yang diperoleh dari Laboratorim Mikrobiologi, Jurusan Biologi FMIPA Unila.

C. Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dalam dua tahapan. Tahap pertama yaitu menentukan aktivitas antibakteri madu dan propolis menggunakan metode difusi sumur pada tingkat konsentrasi senyawa uji 20%, 30%, 40%,50%. Tahap kedua menggunakan metode difusi kertas pada konsentrasi daya hambat terbesar.

D. Cara Kerja

1. Pembuatan media

1.a. *Nutrient agar* (NA)

Media NA dibuat dengan cara melarutkan 5,6 gram bubuk NA dalam akuades, sampai volume 200 mL pada labu Erlenmeyer. Larutan

dipanaskan sampai bubuk media NA benar-benar larut, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada tekanan 1 atm dan suhu 121°C. Selanjutnya media ini disimpan untuk digunakan pada uji aktivitas antibakteri.

1.b. *Luria agar (LA)*

Media LA dibuat dengan cara melarutkan 1 gram NaCl, 1 gram ekstrak ragi, 1,5 gram pepton, 5 gram ekstrak agar dalam 200 mL akuades pada labu Erlenmeyer. Larutan dipanaskan sampai bubuk LA benar-benar larut, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada tekanan 1 atm dan suhu 121°C. Selanjutnya disimpan untuk digunakan pada uji aktivitas antibakteri.

1.c. *Nutrien broth (NB)*

Media NB dibuat dengan cara melarutkan 1,3 gram bubuk NB dalam akuades, sampai volume 100 mL pada labu Erlenmeyer. Larutan dipanaskan sampai bubuk NB benar-benar larut, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada tekanan 1 atm dan suhu 121°C. Selanjutnya larutan ini disimpan untuk digunakan sebagai media pada pembuatan kultur bakteri *S. aureus*.

1.d. *Luria broth (LB)*

Media LB dibuat dengan cara melarutkan 1 gram NaCl, 1 gram ekstrak ragi, 1,5 gram pepton dalam 200 mL akuades pada labu Erlenmeyer. Larutan dipanaskan sampai bubuk LB benar-benar larut, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada

tekanan 1 atm dan suhu 121°C. Selanjutnya disimpan untuk digunakan sebagai media pada pembuatan kultur bakteri *E. coli*.

2. Penyiapan inokulum bakteri

2. a. Penyiapan inokulum bakteri *E. coli*

Satu ose biakan murni bakteri *E. coli* digores pada NA miring dan ditumbuhkan dalam labu Erlenmeyer berisi 10 mL media LB steril, kultur bakteri ini selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar sambil diguncang dengan kecepatan putaran 150 rpm selama 18-24 jam. Kultur bakteri tersebut siap digunakan untuk bakteri uji.

2.b. Penyiapan inokulum bakteri *S. aureus*

Satu ose biakan murni bakteri *S.aureus* digores pada NA miring dan ditumbuhkan dalam labu Erlenmeyer berisi 10 mL media NB steril, kultur bakteri ini selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar sambil diguncang dengan kecepatan putaran 150 rpm selama 18-24 jam. Kultur bakteri tersebut siap digunakan untuk bakteri uji.

3. Uji antibakteri difusi sumur (Garriga *et al.*, 1993)

Media NA (1.a) dan LA (1.b) yang sudah steril dipanaskan sampai mencair, didiamkan pada kisaran suhu 45-50°C. Kemudian secara aseptis kultur bakteri uji (2.a dan 2.b) dicampur dengan perbandingan 1 mL bakteri : 10 mL media dalam cawan pertri berdiameter 9 cm, lalu digoyang

geser pada permukaan datar menyerupai angka delapan supaya bakteri dan agar tercampur secara homogen kemudian didiamkan agar memadat.

Kemudian media ini dibuat sumuran berdiameter 10 mm. Dalam setiap cawan dibuat 3 sumur yang sudah ditandai sebelumnya. Sumuran tersebut diperkirakan dapat menampung sekitar 100 μ L sampel uji. Sebanyak 100 μ L larutan uji (madu, propolis, dan ampisilin) masing-masing berkonsentrasi 50% diinjeksikan ke dalam sumuran pada cawan petri tersebut.

Selanjutnya prosedur yang sama dilakukan terhadap larutan uji yang konsentrasinya 40%, 30%, dan 20%. Masing-masing diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator. Campuran ini dilihat aktivitasnya terhadap bakteri uji, dengan mengamati dan mengukur diameter hambat yang terbentuk (skala mm).

4. Uji antibakteri difusi kertas (Jawelz, 2005)

Sepuluh mililiter media NA (1.a) dan LA (1.b) yang sudah steril dipanaskan sampai mencair dan didiamkan pada kisaran suhu 45-50°C. Kemudian secara aseptis media ini dituang ke cawan petri steril lalu digoyang geser pada permukaan datar menyerupai angka delapan supaya media agar merata dan didiamkan sampai agar memadat.

Media agar ini diberi bakteri uji (2.a dan 2.b) pada permukaannya, lalu dibiarkan selama 10 menit. Selanjutnya cakram kertas berdiameter 10 mm

diletakkan pada posisi tertentu pada permukaan agar dan sejumlah sampel uji dan kontrol ampisilin diinjeksikan pada cakram kertas.

Masing-masing sampel uji diinjeksikan sebanyak 50 μ L pada cakram kertas dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator, kemudian diamati aktivitasnya terhadap bakteri uji, dengan mengamati dan mengukur diameter hambat yang terbentuk. Konsentrasi sampel uji yang digunakan adalah 50%.