

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini sudah dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Katolik Widya Mandira Kupang selama 1 bulan yaitu bulan Agustus s/d September 2018.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- 1) Labu Erlenmeyer untuk menyimpan media dan menampung hasil saringan maserasi
- 2) Rak tabung dan tabung reaksi tempat untuk menyimpan tabung reaksi dan sebagai wadah saat pengenceran bakteri.
- 3) Gelas kimia sebagai wadah maserasi kunyit.
- 4) Vortex untuk mengaduk larutan dalam tabungan reaksi sehingga homogen.
- 5) *Autoclave* untuk mensterilisasi alat dan bahan yang sudah digubakan agar tidak terkontaminasi dengan bakteri lain.
- 6) Lampu spiritus untuk mensterilkan kawat ose agar tetap steril saat diinokulasi.
- 7) Pipet tetes untuk membatu memindahkan media dari wadah yang satu ke wadah yang lain dalam jumlah kecil yaitu tetes demi tetes.
- 8) Neraca analitik untuk menimbang kunyit dan serbuk media.

- 9) Corong untuk menyaring filtrat hasil maserasi.
- 10) Inkubator untuk mengikubasi tabung reaksi saat peremajaan bakteri dan mengikubasi cawan petri.
- 11) Kawat ose untuk mengambil biakan *S. Aureus* dengan cara menggoreskan sedikit pada saat peremajaan.
- 12) Cawan petri sebagai wadah untuk pembiakan bakteri.
- 13) Mikro pipet untuk memindahkan media yang bervolume kecil.
- 14) Sarung tangan dan masker melindungi terjadinya penularan bakteri.
- 15) Kapas dan Aluminium foil untuk menutup erlenmeyer dan tabung reaksi.
- 16) Kertas label untuk memberikan keterangan pada tabung reaksi dan cawan petri.
- 17) Camera untuk mendokumentasi setiap perlakuan yang dilakukan selama penelitian.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- 1) Rimpang kunyit (*Curcuma domestica* Val.)
- 2) Biakan bakteri *Staphylococcus aureus*
- 3) Aquades
- 4) Media NA (*Natrium Agar*)
- 5) Media NB (*Nutrient Broth*)
- 6) Alkohol 95%

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini seluruh kunyit yang diambil dari Desa Pili yang terletak di So'e Kabupaten Timor Tengah Selatan.

3.3.2 Sampel

Sampel penelitian ini adalah *staphylococcus aureus* yang diberi perlakuan dengan berbagai konsentrasi ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica* Val).

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel bebas

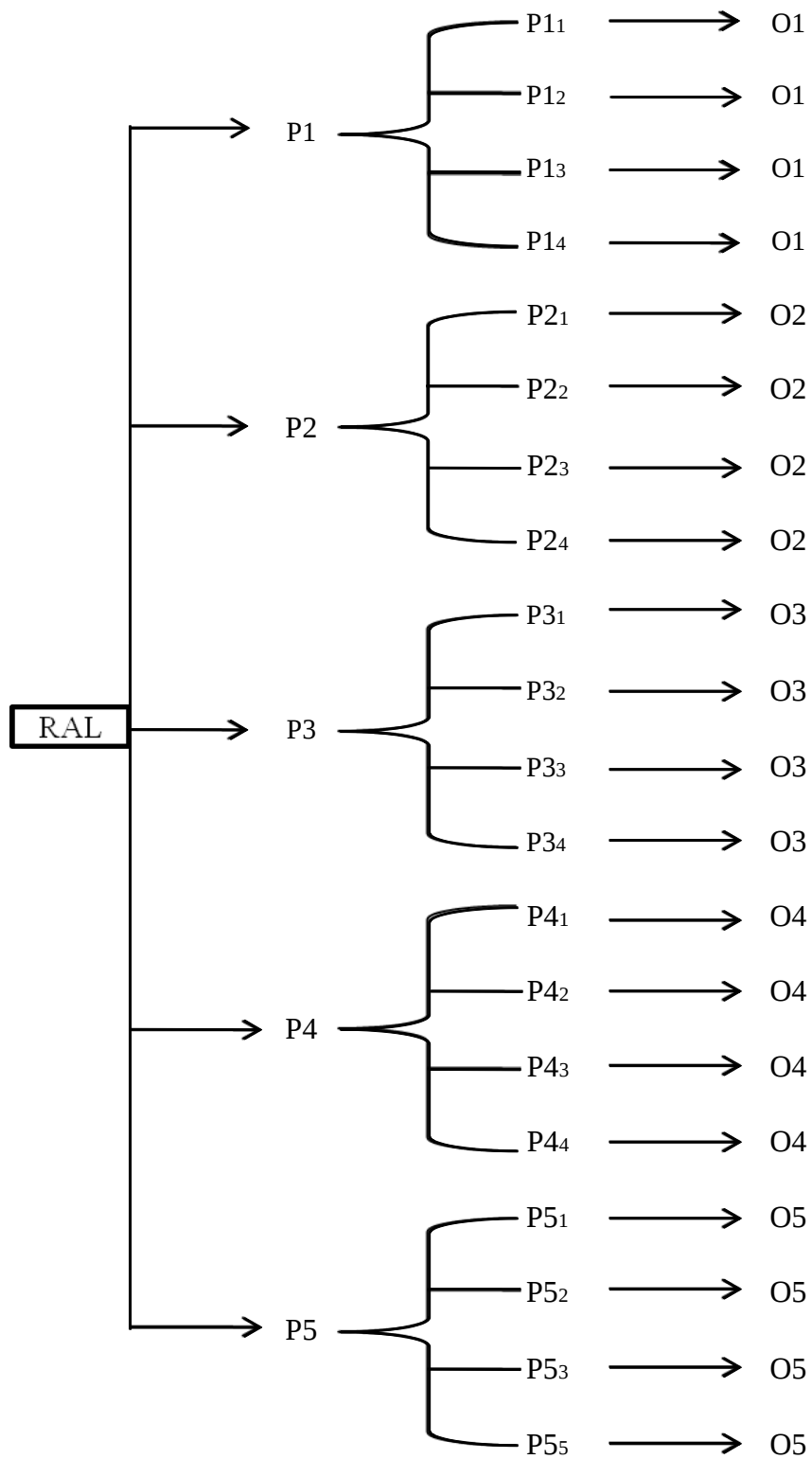
Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica* Val) dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.

3.4.2 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri (*Staphylococcus aureus*)

3.5 Rancangan Penelitian

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



Gambar 6. Bagan desain penelitian

Tabel 5. Denah rancangan acak lengkap (RAL)

P _{1.1}	P _{3.1}	P _{0.1}	P _{1.2}
P _{2.1}	P _{0.2}	P _{2.2}	P _{0.3}
P _{1.3}	P _{1.4}	P _{2.3}	P _{3.2}
P _{0.4}	P _{3.3}	P _{2.4}	P _{3.4}

Keterangan:

RAL : Rancangan acak lengkap

P1-P6 : Perlakuan dengan ekstrak rimpang kunyit

O1-O5 : pengukuran Zona hambat ekstrak kunyit

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Tahap Persiapan

3.6.1.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat-alat yang dipergunakan dengan cara dicuci bersih dan dikeringkan setelah itu alat-alat tersebut dibungkus menggunakan aluminium foil dan dimasukkan dalam *autoclave* pada suhu 121⁰C selama 15 menit, setelah selesai disterilisasi alat-alat tersebut dikeluarkan dari *autoclave*. Sedangkan Kawat ose disterilkan dengan cara dipanaskan diatas api bunsen.

3.6.1.2 Pembuatan Media

1) Media NA (*Natrium Agar*)

Media NA (*Natrium Agar*) ditimbang sebanyak 1 gram dan dilarutkan ke dalam 250 ml akuades, kemudian dipanaskan di atas *hot plate*. Pengadukkan dilakukan dengan memasukkan *magnetic stirrer* ke dalam larutan hingga homogen. Larutan dipanaskan hingga berwarna kuning jernih kemudian

dituangkan kedalam erlenmeyer yang telah disterilkan. Selanjutnya, media tersebut disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Media yang telah steril dipipet sebanyak 10 ml dan masukkan kedalam tabung reaksi.

7) Media NB (*Nutrient Broth*)

Ditimbang seksama media NB (*Nutrient Broth*) sebanyak 0,5 gr dan dimasukkan kedalam beker gelas dan dilarutkan dalam 250 ml aquadest. Kemudian dipanaskan dipanaskan diatas *hot plate* pada suhu 121°C selama 15 menit sampai larut dan homogen. Setelah itu dituangkan kedalam cawan petri dengan ketebalan 1 mm lalu didiamkan hingga dingin dan membeku.

3.6.2 Menyiapkan Bahan Uji

3.6.2.1 Persiapan larutan uji ekstrak rimpang kunyit

Penelitian ini diawali dengan pembuatan ekstrak rimpang kunyit. Rimpang kunyit dibersihkan terlebih dahulu kemudian dikupas lalu diparut.

3.6.2.2 Ekstraksi rimpang kunyit

Kunyit yang sudah diparut, kemudian diperas untuk menghasilkan ekstraksinya setelah itu di saring sebanyak 50 ml kemudian kunyit tersebut diencerkan dengan aquades steril dibuat seri konsentrasi.

3.6.2.3 Pembuatan konsentrasi ekstrak kunyit 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.

Menurut Kusuma, (2012) 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)

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

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

$$100 m \% = 20\% \times 10$$

$$100 m = 200$$

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

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

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

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

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

$$100 m = 400$$

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

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

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

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

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

$$100 m = 600$$

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

Konsentrasi 60% menggunakan 6 gram ekstrak diencerkan dengan akuades steril hingga mencapai volume pada labu ukur 10 ml.

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

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

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

$$100 m = 800$$

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

Konsentrasi 80% menggunakan 8 gram ekstrak diencerkan dengan akuades steril hingga mencapai volume pada labu ukur 10 ml.

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

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

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

$$100 m = 1000$$

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

Konsentrasi 100% menggunakan 10 gram ekstrak diencerkan dengan akuades steril hingga mencapai volume pada labu ukur 10 ml.

3.7 Tahap Pelaksanaan

3.7.1 Penyiapan Bakteri *Staphylococcus aureus*

Kultur murni *staphylococcus aureus* terlebih dahulu dikultur ulang untuk memperbanyak populasi tersebut. Selanjutnya, media NA (*Natrium Agar*) miring disiapkan dalam cawan petri. Kemudian, bakteri uji diambil 1 ose lalu digoreskan

secara zig-zag pada media NA (*Natrium Agar*) miring. Hasil perbanyakkan kultur bakteri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C.

3.7.2 Pembuatan inokulum bakteri *Staphylococcus aureus*

Biakkan bakteri *Staphylococcus aureus* yang telah dikultur murni diambil sebanyak 1 ose, kemudian diinokulasi atau disuspensikan dalam 10 ml *Mulleller Hinton Agar* kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C. Setelah 24 jam, koloni bakteri diamati menggunakan *colony counter*.

3.8 Tahap Perlakuan

3.8.1 Uji Sensitivitas Bakteri

Tahap pertama yang dilakukan dalam uji sensitivitas bakteri ini adalah pengenceran bertingkat 10⁻⁵ untuk mengendalikan populasi bakteri. 1 ose biakkan murni dimasukkan ke dalam 10 ml *Nutrient Broth* pada tabung reaksi. Tabung kedua berisi 10 ml *Nutrient Broth* dan 1 ml suspensi yang diambil dari tabung pertama. Begitu seterusnya hingga pengenceran 10⁻⁵ dengan populasi bakteri diinokulasikan dalam media *Nutrient Broth*.

Media *Nutrient Broth* yang sudah dipadatkan kedalam cawan petri kemudian dimasukkan 100 ml suspensi bakteri yang sudah disamakan dengan standar NA 10⁻⁵ dan diratakan *spreader glass* diamkan selama 5-10 menit agar suspensi bakteri dapat meresap. Setelah suspensi kering media diletakkan *disk* yang berisi masing-masing konsentrasi ekstrak kunyit yaitu 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% dibuat pengulangan selama 4 kali serta aquades steril sebagai kontrol negatif. Setelah itu media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C tanpa dipadatkan.

Efektivitas ekstrak kunyit dilihat dari zona hambat yang didapatkan. Zona hambat terlihat lebih bening dari pada daerah sekitarnya dan tidak ditumbuhi bakteri. Zona hambat diukur menggunakan mistar pada pada batas luar cawan petri sampai dengan batas terpanjang dan batas terpendek daerah hambat yang terbentuk sehingga diperoleh jari-jari zona hambat terpanjang dan jari-jari zona hambat terpendek.

3.8.2 Pembuatan Larutan Standar Mc Farland

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

1. Masukkan Barium klorida (BaCl_2 1.175%) 1 gram dan sebanyak 100 ml aquades.
2. Masukkan 1% larutan asam sulfat (H_2SO_4) 1,1 ml dan 50 ml aquades.
3. Campurkan kedua larutan yang telah dibuat dengan perbandingan 0,05ml BaCl_2 dan 9,95 ml H_2SO_4 1% secara lengkap tercampur pada tabel berikut:

No. Tabung	BaCl_2 1,175% (ml)	H_2SO_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.

3.8.4 Uji Daya Hambat Minimal (KHM)

Konsentrasi minimal yang menghambat uji sensitivitas bakteri *Saphylococcus aureus* terhadap ekstrak rimpang kunyit digunakan untuk menentukan kadar hambat minimal (KHM). Metode yang digunakan untuk menentukan KHM dilusi padat. Langkah kerjanya yaitu media NA dengan suhu 37⁰C dituangkan kedalam cawan petri yang sudah berisi bakteri uji dan sampel ekstrak rimpang kunyit. Jumlah media kultur yang digunakan sebanyak 10 ml. Bakteri uji pada pengenceran 10⁻⁵ digunakan sebanyak 0,1 ml. Sampel ekstrak rimpang kunyit sebanyak 0,1 ml. Hasil *pour plate* diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C. Media yang terlihat jernih atau tidak ditumbuhi bakteri ditetapkan sebagai KHM.

3.8.5 Uji Kadar Minimal (KBM)

Hasil yang ditetapkan sebagai KHM selanjutnya dikultur ulang dengan cara menggoreskan hasil KHM pada media MHA tanpa penambahan bakteri uji maupun ekstrak menggunakan *cotton bud* steril. Kemudian, media kultur diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C. Media kultur MHA yang tetap terlihat jernih setelah diinkubasi ditetapkan sebagai kadar bunuh minimal.

3.8.6 Teknik Pengambilan Data

Teknik pengambilan data untuk menilai besarnya zona hambat ekstrak rimpang kunyit dalam menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dengan cara mengukur zona hambat dimana terjadinya penghambat pertumbuhan bakteri yang

terbentuk pada medium yang telah diinkubasi selama 24 jam dengan menggunakan jangka sorong.

3.8.8 Analisi Data

Teknik analisis data yang digunakan adalah data yang diperoleh dari hasil penelitian diolah menggunakan Sidik Ragam atau Analisis Varians (ANAVA) satu arah untuk mengetahui efektivitas ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica* Val.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, dan apabila terdapat perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan tingkat signifikan 1% (0,01).