**BAB III**

**METODE PENELITIAN**

**3.1 Jenis dan Desain Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental dengan design Post test Control Group Design. Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui pengaruh dari variable bebas dan variable terikat., dimana variabel bebas adalah konsentrasi 30%, 40%, 50% dan variabel terikat adalah daya hambat bakteri. (Notoatmodjo, 2017).

**3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fitokimia dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Farmasi Poltekkes Kemenkes Medan Jalan Airlangga No.20 Medan

**3.3 Pengambilan Sampel**

Teknik pengambilan sampel dalam penelitian ini adalah secara purposive sampling yaitu pengambilan sampel tanpa mempertimbangkan tempat dan letak geografisnya.Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah daun beluntas yang masih segar di daerah Kuala Tanjung.

**3.4 Sampel Siap Uji**

 Ekstrak daun beluntas 30%, Ekstrak daun beluntas 40%, Ekstrak daun beluntas 50%, Etanol 70%, Kloramfenikol.

* 1. **Cara Pengumpulan Data**

Data diambil dari hasil pengukuran diameter daya hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* yang diukur menggunakan jangka sorong.

**3.6 Alat dan Bahan**

**3.6.1 Alat**

 Autoklaf, Batang Pengaduk, Beaker glass, Cawan petri, Cawan penguap, Deck glass, Erlenmeyer, Gelas ukur, Hole puncher, Incubator, Jangka sorong, Kapas, Kawat ose, Paper disk, Kain Flannel, Lampu Bunsen, Mikroskop, Objek glass, Oven, Hot plate, Pipet tetes, Pipet volume, Rak tabung reaksi, Rotary evaporator, Tabung reaksi, Timbangan analitik.

**3.6.2 Bahan**

 Bakteri *Escherichia coli,* Etanol 70%, Kloramfenikol, Larutan Fuchsin,Larutan Lugol, Larutan Kristal, Larutan NaCL 0,9%, Media Eosine Methylene Blue Agar (EMBA), Mueller Hilton Agar(MHA), Nutrient Agar(NA), Suspensi Mc.Farland.

**3.7 Sterilisasi Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan uji ekstrak etanol ini, disterilkan terlebih dahulu sebelum dipakai. Alat-alat gelas disterilkan didalam oven suhu 170$°$C selama 1 jam. Media disterilkan di autoklaf pada suhu 121$°$C selama 15 menit, dan kawat ose disterilkan pada lampu Bunsen (Farmakope Indonesia Edisi III).

**3.8. Prosedur Kerja** .

Daun beluntas yang telah dihaluskan, ditimbang 200 gram (10 bagian) dalam keadaan kering lalu dilarutkan dalam penyari etanol 70%. Menurut Farmakope Indonesia Edisi V, BJ alkohol = 0,884 g/ml.

Volume etanol 70% yang dibutuhkan dalam 2000 gram :

V=$\frac{B}{BJ}$ =$\frac{2000 g}{0,884}$= 2.262 ml

Volume etanol 75% bagian etanol 70% yang digunakan :

$\frac{75}{100}×2.262 ml=$1.696,5 ml =1.697 ml

Volume etanol 25 bagian etanol 70% yang digunakan :

$\frac{25}{100}× $2.262 ml = 5665,5 ml = 565 ml

**3.8.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Beluntas (EEDB)**

Ekstrak kering daun beluntas dalam penelitian ini dibuat secara maserasi. Daun segar sebanyak 2000 gram dikeringkan. Daun kering diperoleh 200 gram. Serbuk daun beluntas ditimbang 200 gram (10 bagian ) lalu dimasukkan kedalam beaker glass dan tambahkan 75 bagian etanol 70% sebanyak 1697 ml. Kemudian diaduk-aduk lalu tutup beaker glass dan biarkan 5 hari terlindung dari cahaya matahari sambil setiap hari diaduk-aduk minimal tiga kali sehari. Setelah 5 hari campuran diserkai, diperas lalu diambil ampasnya dengan etanol 70% hingga diperoleh 100 bagian yaitu 2.262 ml. Lalu maserat dipindahkan ke dalam beaker glass dan biarkan ditempat sejuk terliundung dari cahaya matahari lalu maserat dienap tuangkan selama 2 hari.

Maserat yang diperoleh diuapkan dengan alat penguap waterbath pada suhu tidak boleh lebih dari 50$°$C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh di timbang lalu dibuat konsentrasi 30%, 40%, 50%.

**3.8.2.1 Pembuatan Larutan Uji EEDB**

1. Konsentrasi 30%

30% = $\frac{30}{100}$= 0,30 g/ml

Maka untuk membuat 10 ml :

$\frac{10 ml }{1 ml}×$0,3 = 3 g

Ditimbang sebanyak 3 g sebanyak ekstrak kental daun beluntas, kemudian dicukupkan dengan etanol 70% hingga 10 ml.

2. Konsentrasi 40%

40% = $\frac{40 g}{100 ml}$ = 0,40 g/ml

Maka, untuk membuat 10 ml :

$\frac{10 ml}{1 ml}×$ 0,4 = 4 g

Ditimbpang sebanyak 4 g ekstrak daun beluntas, kemudian dicukupkan dengan etanol 70% hingga 10 ml.

3.Konsentrasi 50%

50% = $\frac{50 g}{100 ml}$= 0,50 g/ml

Maka, untuk membuat 10 ml :

$\frac{10 ml}{1 ml }×$0,5 = 5 g

Ditimbang sebanyak 5 g ekstrak daun beluntas, kemudian dicukupkan dengan etanol 70% hingga 10 ml.

* + 1. **Pembuatan Media Agar untuk Escherichia coli**
			1. **Media Eosine Methylene Blue Agar (EMBA)**

Jumlah media yang harus dilarutkan dalam 1 liter aquadest pada etiket adalah 36g/L, maka banyaknya media EMBA yang diperlukan untuk 50 ml :

Pembuatan :

1. Timbang EMBA sebanyak 1,8 g
2. Masukkan dalam Erlenmeyer, dilarutkan dengan aquadest sampai 50 ml.
3. Panaskan sampai mendidih sambil diaduk-aduk, angkat dan tutup Erlenmeyer dengan kapas dan kertas perkamen kemudia ikat dengan benang.
4. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121$°$ selam 15 menit.
5. Setelah steril, angkat dari autoklaf, dinginkan sebentar, buka kertas perkamen dan kapas, kemudian tuangkan ke cawan petri secara aseptis, biarkan memadat.

 **3.8.3.2Pembuat Media Nutrient Agar (NA)**

Jumlah media yang harus dilarutkan dalam 1 liter aquadest adalah 36g/l. Banyaknya Nutrient Agar yang dibutuhkan untuk 50 ml adalah

 $\frac{50 ml}{1000 ml }×36\frac{g}{L}=1,8 g $

Pembuatan :

1. Timbanglah NA sebanyak 0,4 g
2. Masukkan ke dalam Erlenmeyer, larutkan dengan aquadest sebanyak 20 ml.
3. Panaskan sampai mendidih.
4. Angkat, lalu bagi dalam beberapa tabung (sesuai dengan kebutuhan), tutup dengan kapas, lapisi dengan kertas perkamen kemudian ikat dengan benang.
5. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121$°$C selama 15 menit.
6. Setelah steril, angkat dari autoklaf secara perlahan-lahan dan hati-hati
7. Dinginkan, buka kertas perkamen yang diikat pada tabung reaksi kemudian miringkan tabung yang berisi Nutrient Agar untuk memperoleh agar miring.

**3.8.3.3Media Mueller Hilton Agar (MHA)**

Jumlah MHA yang harus dilarutkan dalam 1 liter aquadest pada etiket adalah 34g/L. Banyaknya MHA yang diperlukan untuk 100 ml:

Volume yang dibutuhkan 100 ml adalah ;

$$\frac{100 ml}{1000 ml}×34\frac{g}{L}=3,4 g$$

Pembuatan :

1. Timbang MHA sebanyak 3,4 g
2. Masukkanlah ke dalam Erlenmeyer, larutkanlah dalam aquadest sebanyak 100 ml.
3. Panaskan sambil diaduk-aduk hingga mendidih.
4. Angkat dan tutup Erlenmeyer dengan kapas, lapisi dengan kertas perkamen kemudian ikat dengan benang.
5. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121$°$ C selam 15 menit.
	* 1. **Suspensi Standar Mc.Farland**
6. Campurkan kedua larutan diatas kedalam tabung reaksi dan dikocok homogen.
7. Apabila kekeruhan suspense bakteri sama dengan kekeruhan suspense bakteri adalah 108 koloni/ml.
	* 1. **Pembuatan larutan NaCl 0,9%**

 Larutan ini digunakan untuk mengencerkan bakteri.

Pembuatan :

NaCl ditimbang sebanyak 0,9 gram, masukkan ke dalam labu takar 100 ml kemudian cukupkan volumenya hingga batas tanda. Kocok hingga homogen, lalu sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121$°$ C selama 15 menit.

* + 1. **Pembiakan Bakteri *Escherichia coli***
1. Ambil satu sengkelit koloni dengan menggunakan kawat ose steril dari suspensi bakteri *Escherichia coli.*
2. Kemudian tanam ke media EMBA dengan cara menggoreskan, lalu tutup media.
3. Inkubasi dalam incubator pada suhu 37$°$C selama 18-24 jam.
4. Amati pertumbuhan koloni spesifik pada media.
5. Hasil yang diperoleh adalah koloni spesifik berwarna hijau dengan kilap logam dan bintik biru kehijauan ditengahnya.
6. Lakukan pengecatan gram.
7. Ambil satu sengkelit koloni spesifik *Escherichia coli*, lalu tanamkan pada media nutrient Agar Miring dengan cara tusukkan pada bagian tegak hingga mendekati dasar tabung dan goreskan zig zag pada bagian miringnya.
8. Inkubasi pada suhu 35-37$°$C selama 18-24 jam.
	* 1. **Pengecatan Gram Bakteri *Escherichia coli***
9. Ambil satu sengkelit koloni spesifik berumur 18-24 jam yang berasal dari media EMBA, letakkan pada objek glass yang telah diberi aquadest terlebih dahulu, sebar ratalan kemudian lakukan fiksasi.
10. Tambahkan Kristal violet, diamkan selama 1-2 menit, kemudian bilas dengan aquadest.
11. Tambahkan larutan lugol, biarkan 2 menit, kemudian bilas dengan alcohol 96%, diamkan selama 15 detik. Lalu bilas dengan aquadest.
12. Tambahkan larutan fuchsin, diamkan selama 30 detik, bilas dengan aquadest lalu keringkan.
13. Amati hasil dibawah mikroskop dengan perbesran 10$×$40 dan 10$×100 $( menggunakan minyak imersi)

 Jika bakteri tersebut *Escherichia coli* maka hasil yang diperoleh adalah bakteri berwarna merah dan berbentuk batang.

* + 1. **Pengenceran Bakteri *Escherichia coli***
1. Ambil satu sengkelit *bakteri Escherichia coli* yang berumur 18-24 jam dari biarkan yang telah tumbuh pada media NA. Suspensikan dalam tabung reaksi yang berisi 1 ml larutan NaCl 0,9%, kemudian tambahkan larutan NaCl 0,9% sedikit demi sedikit sampai diperoleh kekruhan suspensi bakteri sama dengan standart Mc.Farland, maka konsentrasi bakteri adalah 108 koloni/ml.
2. Lakukan pengenceran dengan memipet 0,1 ml biarkan bakteri 108 koloni/ml, masukkan ke dalam tabung reaksi steril dan tambahkan larutan NaCl 0,9% sampai 10 ml, kocok sampai homogen, maka diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi 106 koloni/ml.
	1. **Antibiotik Pembanding Kloramfenikol**

Antibiotik yang digunakan adalah kertas cakram yang mengandung kloramfenikol.

* 1. **Cara Kerja Efek Antibakteri Ekstrak Daun Beluntas (Pluchea Indica L) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli***
1. Sterilkan semua alat dan bahan yang digunakan.
2. Buat persediaan inokulum.
3. Pipet 0,1 ml bakteri dengan konsentrasi 106 koloni/ml, masukkan ke dalam 100 ml MHA dengan suhu 45$°$ - 50$°$ lalu kocok sampai homogen, kemudian tuang sebanyak 15 ml ke dalam masing-masing cawan petri steril lalu ratakan dan biarkan memadat.
4. Buat 6 tanda pada bagian bawah cawan petri, dengan berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun beluntas (30,40%,50%), etanol dan kloramfenikol.
5. Rendam paper disk pada setiap konsentrasi dan etanol.
6. Ambil paper disk yang telah direndam dengan menggunakan pinset lalu keringkan.
7. Letakkan paper disk ke dalam cawan petri secara aseptis sesuai dengan masing-masing tanda kemudian di inkubasi pada incubator dengan suhu 37$°$C selama 18-24 jam.
8. Kemudian baca hasilnya dengan mengukur diameter zona hambatan berupa daerah yang tampak jernih atau daerah yang tidak ditumbuhi bakteri *Escherichia coli*.
9. Catat hasil dalam satuan millimeter
10. Percobaan dilakukan triplo, yaitu tiga kali untuk masing-masing konsentrasi ekstrak daun beluntas, etanol dan kloramfenikol.