

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Tahap penelitian ini meliputi determinasi tumbuhan, pembuatan simplisia, pembuatan ekstrak etanol daun cabe jawa, dan pengujian aktivitas antibakteri. Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental dan menggunakan replikasi duplo.

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi dari penelitian ini adalah ekstrak daun cabe jawa. Sampel yang digunakan ekstrak daun cabe jawa dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100% dan bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan Mikrobiologi Akademi Putera Indonesia Malang selama bulan April - Mei 2019.

3.4 Definisi Operasional Variabel

3.4.1 Variabel Bebas

Pada penelitian ini yang ditetapkan variabel bebas adalah variasi konsentrasi ekstrak etanol daun cabe jawa.

3.4.2 Variabel Terikat

3.4.3 Pada penelitian ini yang ditetapkan sebagai variabel adalah

aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* (zona hambat bakteri).

3.4.4 Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

3.1.1 Variabel	3.1.2 Definisi Operasional	3.1.3 Hasil Ukur	3.1.4 Skala Ukur	3.4.5 3.5 Al
3.1.5 Variasi Konsentrasi Ekstrak etanol daun cabe jawa	3.1.6 Sediaan kental yang dibuat dengan menyari simplisia daun cabe jawa dengan cara maserasi dengan etanol 70% dan dibuat pembuatan konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% dengan menggunakan pelarut DMSO.	3.1.7 Ekstrak kental	3.1.8 Pipet ukur	
3.1.9 Aktivitas antibakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	3.1.10 Kemampuan ekstrak daun cabe jawa dalam menghambat pertumbuhan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dengan metode difusi cakram	3.1.11 Zona bening yang terdapat di sekitar kertas cakram	3.1.12 Jangka sorong	

alat dan Bahan

3.5.1 Alat

3.5.2 Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : oven (Memmet

UN 55), *blender*, botol coklat, *waterbath*, *rotary evaporator*, cawan penguap,

cawan petri, batang pengaduk, Erlenmeyer 250ml , beaker glass 100ml, gelas ukur

10ml, gelas ukur 100ml, tabung reaksi, bunsen, kaki tiga, mikro pipet, *disposable*

blue tip, *disposable white tip*, jarum ose, pinset, pipet tetes, autoklaf, inkubator

(*Cork borer*), *Laminar Air Flow (LAF)*, *Spektrofotometri UV-Vis_(Thermo*

Scientific).

3.5.3 Bahan

3.5.4 Bahan yang digunakan yaitu daun cabe jawa yang diambil dari Desa Wirotaman, Kecamatan Ampelgading, Kabupaten Malang. Bahan kimia yang digunakan yaitu pelarut organik etanol 70% (Brataco Chemika), akuades, *dimetil sulfoksida* (DMSO), *Manitol Salt Agar* (MSA) dan NaCl 0,9%. Bakteri uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* (Kode 469744) yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang.

3.5.5

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pembuatan serbuk simplisia (Modifikasi Sari dan Nugraheni, 2013)

1. Daun cabe jawa segar yang sudah diambil selanjutnya dicuci bersih dengan air mengalir, tiriskan.
2. Daun tersebut kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50° selama $\pm 2 \times 24$ jam.
3. Daun yang sudah kering dihaluskan dengan menggunakan *blender* hingga diperoleh serbuk.

3.6.2 Ekstraksi maserasi serbuk simplisia dengan pelarut etanol (Modifikasi Sari dan Nugraheni, 2013)

1. Ditimbang simplisia daun cabe jawa sebanyak 650 gram.
2. Dimasukkan ke dalam botol maserasi coklat tertutup dan direndam dengan etanol 70%.
3. Didiamkan selama 4 x 24 jam dengan dilakukan pengadukan beberapa kali.
4. Disaring dengan menggunakan kertas saring
5. Ekstrak yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 78°C sampai berbentuk ekstrak kental.
6. Apabila masih terdapat sisa pelarut maka pelarut diuapkan sampai diperoleh bobot tetap.

3.6.3 Pembuatan Seri Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Cabe Jawa (Modifikasi Sari dan Nugraheni, 2013)

1. Ekstrak kental daun cabe jawa dibuat 4 seri konsentrasi yaitu 25%, 50%, 75%, dan 100% (b/v) dengan menggunakan pelarut *dimetil sulfoksida* (DMSO). Perhitungan pembuatan seri konsentrasi dapat dilihat pada lampiran 4.

2. Untuk larutan uji 25% (b/v) diambil 0,5 gram ekstrak etanol daun cabe jawa kemudian ditambahkan pelarut DMSO sampai volumenya 2 ml.
3. Untuk larutan 50% (b/v) diambil 1 gram ekstrak etanol daun cabe jawa kemudian ditambahkan pelarut DMSO sampai volumenya 2ml.
4. Untuk larutan 75% (b/v) diambil 1,5 gram ekstrak etanol daun cabe jawa kemudian ditambahkan pelarut DMSO sampai volumenya 2ml.
5. Untuk larutan 100% (b/v) diambil 2 gram ekstrak etanol daun cabe jawa kemudian ditambahkan pelarut DMSO sampai volumenya 2ml.

3.6.4 Proses Pengujian Antibakteri Daun Cabe Jawa Pada *Staphylococcus aureus*

3.6.4.1 Sterilisasi Alat (Modifikasi Astuti, 2016)

1. Disiapkan semua alat yang akan digunakan.
2. Dibungkus alat yang berskala dengan menggunakan alumunium foil dan disterilkan menggunakan autoclaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
3. Dibungkus alat yang tidak berskala dengan menggunakan kertas coklat dan disterilkan menggunakan oven.

3.6.4.2 Pembuatan Media Manitol Salt Agar (Modifikasi Astuti, 2016)

1. Diambil media MSA sebanyak $\pm 18,87$ gram, masukkan ke dalam Erlenmeyer.
2. Dilarutkan dengan 170 ml akuades, aduk dengan batang pengaduk hingga homogen.
3. Media yang telah homogen didinginkan dan ditutup bagian mulut erlenmeyer dengan kapas dan bungkus dengan kertas coklat.
4. Disterilisasikan dengan menggunakan autoclaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.6.4.3 Pembuatan Kertas Cakram (Modifikasi Mulangsri, 2018)

3.6.5 Kertas cakram dibuat dengan menggunakan kertas saring. Ketas saring dibuat dengan menggunting bulat kertas berdiameter ± 6 mm. Kemudian kertas cakram ditetesi 10 μ l larutan uji dan didiamkan selama ± 15 menit.

3.6.5.1 Peremajaan Bakteri *Staphylococcus aureus* (Modifikasi Astuti, 2016)

1. Dicairkan media MSA steril melalui pemanasan Bunsen.
2. Disiapkan tabung reksi steril dan kawat ose.
3. Dituang media MSA masing-masing sebanyak 5 ml ke dalam 10 tabung reaksi secara aseptis.
4. Didiamkan hingga memadat pada posisi miring.

5. Diinokulasi *Staphylococcus aureus* dari biakan murni secara aseptis ke dalam media MSA yang sudah padat dengan jarum ose secara zig-zag.
6. Diinkubasikan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.6.5.2 Pembuatan suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus* (Modifikasi Astuti, 2016)

1. Diambil dan timbang 0,9 gram NaCl, larutkan ke dalam 100 ml akuades dan aduk hingga homogen.
2. Diambil biakan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan kawat ose steril secara aseptis.
3. Disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi NaCl 0,9% steril.
4. Diukur tingkat kekeruhan suspensi bakteri dengan menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 580 nm hingga diperoleh nilai transmittan 25% atau setara dengan jumlah bakteri yang terkandung dalam suspensi sebesar $1,5 \times 10^8$ cfu/mL.

3.6.5.3 Uji Aktivitas Antibakteri (Modifikasi Fahmi, 2011; Sutrisno, 2014)

1. Diambil 1 ml suspensi bakteri dengan menggunakan pipet ukur dimasukkan ke dalam cawan petri
2. Dimasukkan 15 ml media MSA ke dalam cawan petri secara aseptis
3. Digoyang cawan petri membentuk angka 8 agar media dan suspensi bakteri tercampur.
4. Diambil kertas cakram yang telah ditetesi larutan uji dan letakkan kertas cakram dengan menggunakan pinset steril di atas permukaan media MSA yang sudah padat secara aseptis dan ditekan sedikit agar melekat.
5. Dilakukan perlakuan ini sebanyak 2 kali pengulangan.
6. Setelah keseluruhan proses selesai, cawan-cawan petri tersebut dimasukkan inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.
7. Diukur diameter zona hambat atau zona bening yang terbentuk di sekitar cakram dengan menggunakan jangka sorong.

3.6.6

3.7 Analisis Data

- 3.7.1 Pada penelitian ini analisa yang digunakan adalah dengan mengukur zona bening yang terdapat pada sekitar kertas cakram. Kertas cakram yang telah direndam dengan ekstrak kental daun cabe jawa (*Piper retrofractum*)

dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% diletakkan di atas media MSA yang telah diberi kertas cakram. Perlakuan pada uji aktivitas bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan sebanyak dua kali pengulangan.

3.7.2 Daya hambat bunuh bakteri oleh ekstrak kental daun cabe jawa dilihat dari zona bening yang dihasilkan. Diameter zona bening merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap ekstrak daun cabe jawa. Data hasil pengamatan dianalisa dengan menggunakan uji *One Way Anova* dengan SPSS 10.0 untuk mengetahui beda nyata antar perlakuan dengan selang kepercayaan 95%.

3.7.3

3.7.4

3.7.5

3.7.6

3.7.7

3.7.8

3.7.9