

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang bersifat deskriptif dengan tujuan mengetahui aktivitas antibakteri dari rebusan dan seduhan daun mindi kecil (*Melia azedarach* L) terhadap *Escherichia coli*. Adapun variabel yang diamati adalah daya hambat rebusan dan seduhan daun mindi kecil terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Tahap-tahap pada penelitian ini meliputi pengambilan daun mindi kecil, pembuatan rebusan dan seduhan, sterilisasi alat dan bahan, peremajaan isolat bakteri *Escherichia coli*. Pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi sumuran, dan dianalisis data. Aktivitas antibakterinya dapat ditentukan dengan cara melihat zona bening di sekitar area lubang yang sudah diberikan rebusan dan seduhan daun mindi kecil yang sudah ditanam media EMB Agar.

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah rebusan dan seduhan daun mindi kecil (*Melia azedarach* L) yang diperoleh dari Jalan Pemuda Sumpono RT3/2 Ngegong, kelurahan Gedog, Sananwetan kota Blitar.

3.2.2 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah sebagian rebusan dan seduhan daun mindi kecil (*Melia azedarach* L) yang diperoleh dari Jalan Pemuda Sumpono RT3/2 Ngegong, kelurahan Gedog, Sananwetan kota Blitar.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang pada bulan Mei-Juni 2019.

3.4 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3.1 Tabel Definisi Operasional Tabel

| Variabel | Definisi Variabel | Alat ukur | Hasil Ukur | Skala Ukur |
|--|--|---------------|------------|------------|
| Rebusan daun mindi kecil (<i>Melia azedarach</i> L) | Sediaan cair yang diperoleh dengan cara merebus daun mindi kecil (<i>Melia azedarach</i> L) dengan suhu 90 ⁰ C selama 15 menit | Gelas ukur | mL | Nominal |
| Seduhan daun mindi kecil (<i>Melia azedarach</i> L) | Sediaan cair yang diperoleh dengan cara menyiram atau mencampur daun mindi kecil (<i>Melia azedarach</i> L) dengan air panas suhu 90 ⁰ C selama 15 menit | Gelas ukur | mL | Nominal |
| Aktivitas antibakteri rebusan dan seduhan daun mindi kecil (<i>Melia azedarach</i> L) | Luas zona bening disekitar lubang sumuran pada perlakuan rebusan dan seduhan daun mindi kecil (<i>Melia azedarach</i> L) | Jangka sorong | mm | Nominal |

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan untuk pembuatan rebusan dan seduhan yaitu penangas air, panci, alat yang digunakan untuk uji mikrobiologi yaitu rak tabung, tabung reaksi, cawan petri, mikropipet, ose, blue tip, oven, spektrofotometri, inkubator dan bunsen.

3.5.2 Bahan

Daun mindi kecil (*Melia azedarach* L) diambil dari Jalan Pemuda Sumpono RT3/2 Ngegong, kelurahan Gedog, Sananwetan kota Blitar, FeCl₃ 1%, HCl 1%, aquades, bakteri uji *E. coli* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FK Brawijaya, bahan uji mikrobiologi EMB Agar sebagai media identifikasi bakteri sedangkan pembiakan bakteri juga menggunakan media EMB Agar.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Purwodadi

3.6.2 Pembuatan Rebusan

1. Ditimbang sebanyak 100 gr daun mindi kecil segar yang sudah dibersihkan
2. Masukkan aquadest sebanyak 100 ml ke dalam panci

3. Masukkan daun mindi kecil ke dalam panci, panaskan selama 15 menit dengan suhu 90°C sambil sesekali diaduk. Setelah 15 menit, air rebusan yang sudah dingin disaring dengan menggunakan kain flanel steril ke dalam elemeyer steril (Syamsuni HA, 2006).

3.6.3 Pembuatan Seduhan

1. Ditimbang sebanyak 100 gr daun mindi kecil segar yang sudah dibersihkan
2. Masukkan aquadest sebanyak 600 ml dalam panci, panaskan diatas api sampai suhu 90°C
3. Diambil 200 ml air yang telah dipanaskan. Masukkan daun mindi kecil ke dalam aquadest, diamkan 15 menit sambil sesekali diaduk

3.6.4 Identifikasi Senyawa Golongan

1. Senyawa Golongan Flavonoid

- a. Sebanyak 5 ml rebusan daun mindi kecil dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 3 tetes larutan NaOH
- b. Terbentuknya warna kuning intens yang menjadi tidak berwarna dengan penambahan HCl 1% menunjukkan adanya flavonoid, (Rahmadani, 2015).

2. Senyawa Golongan Tanin

- a. Sebanyak 5 mL sampel rebusan daun mindi kecil dimasukkan ke dalam tabung reaksi

- b. Ditambahkan 3 tetes larutan FeCl_3 ke dalam tabung reaksi, terbentuk warna hijau kecoklatan menunjukkan adanya tanin katekol dan biru kehitaman menunjukkan adanya tanin galat (Rahmadani, 2015).

3. Senyawa Golongan Saponin

- a. Sebanyak 5 ml rebusan daun mindi kecil dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dipanaskan dengan air di atas penangas air, disaring, dan dinginkan. Kemudian dikocok kuat-kuat selama 30 detik.
- b. Terbentuknya buih yang mantap selama tidak kurang 10 detik setinggi 1 cm sampai 10 cm menunjukkan adanya saponin dan pada penambahan 1 tetes asam klorida 2 N buih tidak hilang (Kristanti, 2008).

3.6.5 Pembuatan Media EMB Agar

1. Ditimbang 4,7 gram media EMB Agar
2. Dimasukkan ke erlenmeyer, lalu ditambahkan aquadest 125 mL
3. Dihomogenkan larutan dengan pengadukan dan bantuan pemanasan di atas Bunsen
4. Ditutup dengan kapas dan kertas coklat
5. Disterilkan dengan autoklaf 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit (Putra, 2015)

3.6.6 Peremajaan Bakteri

1. Dilarutkan medium EMB Agar dengan aquades 100 ml melalui pemanasan di atas bunsen
2. Dimasukkan EMB Agar cair ke dalam 2 cawan petri steril masing-masing sebanyak 15 mL secara aseptis.
3. Diambil satu ose dari suspensi bakteri *Escherichia coli*
4. Ditanam ke media EMB Agar dengan cara digores menggunakan metode quadrant strake
5. Diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
6. Diambil satu ose lalu ditanamkan pada EMB Agar miring sebanyak 5 tabung.
7. Diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18 - 24 jam (Rezi, dkk. 2014).

3.6.7 Pembuatan Larutan NaCl 0,9%

1. Timbang NaCl sebanyak 0,9 g
2. Dilarutkan dengan aquadest hingga 100 ml dalam labu ukur, kemudian disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit (Putra, 2015)

3.6.8 Pembuatan Suspensi Bakteri *E. Coli*

1. Biakan bakteri yang telah diremajakan, disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,9 % steril sebanyak 20 mL kemudian difortex

2. Kekeruhan bakteri dari suspensi diukur dengan spektrofotometer berdasarkan nilai transmittan pada panjang gelombang 580 nm, sebagai blanko digunakan larutan NaCl 0,9 % steril
3. Transmittan suspensi diatur sedemikian sehingga didapatkan nilai 25 % T
4. Setelah transmittan setara dengan 25% T, gunakan suspensi sebagai uji antibakteri (Fadhilah, 2012)

3.6.9 Pembuatan Kontrol Media

1. Disiapkan kontrol media.
2. Dimasukan suspensi bakteri sebanyak 1 mL dengan menggunakan mikropipet ke dalam cawan petri.
3. Dimasukan 15 mL medium EMB Agar ke dalam cawan petri yang berisi bakteri uji kemudian ditunggu hingga memadat. Diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37 C (Hidana, dkk 2014)

3.6.10 Uji Antibakteri

1. Dimasukkan 1 mL suspensi bakteri uji ke dalam cawan petri, kemudian ditambah media EMB Agar, tunggu sampai memadat.
2. Setelah memadat dibuat diameter sumuran menggunakan alat pelubang.
3. Cawan petri yang telah dibuat diameter sumuran dimasukkan rebusan daun mindi kecil sebanyak 2-3 tetes dilakukan di dalam LAF (Laminar Air Flow).
4. Kemudian diinkubasi pada suhu 37 C selama 24 jam.

5. Setelah diinkubasi, pertumbuhan diamati dan diukur diameter zona bening di sekeliling sumuran (J.R. Andries, 2014)

3.7 Analisis Data

Dalam penelitian ini analisis data diambil dari hasil pengukuran zona bening yang terjadi pada daerah sekitar area lubang sumuran menggunakan jangka sorong. Kemudian data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan dimasukkan dalam kategori, lemah, sedang, kuat atau tidak daya hambat berdasarkan frekuensi diameter zona terang.