

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **1.1 Rancangan Penelitian**

Metode penelitian yang digunakan adalah metode penelitian yang bersifat deskriptif yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol bawang hitam (*Allium Sativum* L.) terhadap kadar hambat minimum bakteri *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi 100% dan kontrol media menggunakan metode difusi cakram.

Penelitian ini meliputi tiga tahap kerja. Tahap pertama, persiapan meliputi pembuatan ekstrak bawang hitam dengan cara maserasi, sterilisasi semua alat yang akan digunakan, persiapan media *Nutrien Agar* (NA), media selektif *Manitol Salt Agar* (MSA) dan persiapan biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus*. Tahap kedua, pelaksanaan yaitu pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol bawang hitam terhadap *Staphylococcus aureus*. Tahap ketiga, terakhir yaitu melakukan pengamatan visual terhadap hasil pengujian, menganalisis data dan membuat kesimpulan.

#### **1.2 Populasi dan Sampel Penelitian**

##### **1.2.1 Populasi Penelitian**

Populasi dalam penelitian ini adalah bawang putih yang diolah dari daerah Malang, dan dipanaskan menjadi bawang hitam.

##### **1.2.2 Sampel Penelitian**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak bawang hitam dengan konsentrasi 100%.

### 1.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian aktivitas antibakteri ekstrak etanol bawang hitam terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* akan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang. Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret sampai Juni 2019.

### 1.4 Definisi Operasional Variabel

Variabel bebas (Independen) adalah variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab perubahan timbulnya variabel terikat. Variabel terikat (Dependen) adalah variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat adanya variabel bebas.

**Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel**

No.	Variabel	Sub Variabel	Defenisi Operasional	Alat Ukur	Skala Ukur
1.	Variabel bebas: Konsentrasi ekstrak bawang hitam 100% dan kontrol media	Variasi konsentrasi	Ekstrak yang diperoleh dari hasil ekstraksi bawang hitam yang telah dipanaskan selama 21 hari dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan konsentrasi 100% dan kontrol media	Mikropipet	Nominal
2.	Variabel terikat: Kadar Hambat Minimum (KHM) bakteri <i>S. aureus</i>	Kadar Hambat Minimum (KHM)	Daerah tidak ditemukannya pertumbuhan bakteri <i>S. aureus</i> pada sekeliling kertas cakram	Jangka sorong	Nominal

## 1.5 Alat dan Bahan/Instrumen Penelitian

### 1.5.1 Alat

Autoklaf, blender, inkubator, batang pengaduk, pinset, beker glass, jangka sorong, blue tip, bunsen, kertas saring, gelas ukur, kertas cakram, cawan petri, jarum ose, tabung reaksi, aluminium foil, corong gelas, oven, pipet volum, kapas, *laminar air flow*.

### 1.5.2 Bahan

Ekstrak bawang hitam, bakteri *Staphylococcus aureus*, *Nutrient Agar* (NA), *Manitol Salt Agar* (MSA), aquades, etanol 96%, larutan NaCl 0,9%, alkohol 96%, NaOH, serbuk Mg, HCl pekat, Asam klorida.

## 1.6 Prosedur Kerja/Pengumpulan Data

Pengumpulan data dalam penelitian ini dilakukan melalui prosedur kerja sebagai berikut :

### 1.6.1 Tahap Persiapan

#### 1.6.1.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat yang akan digunakan sebelum semua peralatan digunakan. Cara sterilisasi ini adalah dengan membungkus alat-alat yang berskala menggunakan *aluminium foil* agar pembungkus tidak basah karena sterilisasi pada autoklaf yang merupakan sterilisasi panas basah. Sedangkan untuk oven panas kering digunakan kertas coklat. Sterilisasi oven digunakan untuk alat-alat tanpa skala. Alat-alat yang berskala tidak disterilisasi di oven karena panas oven yang cukup tinggi khawatir akan mengubah volume yang ditetapkan.

Alat dan bahan penelitian disterilisasi, kecuali ekstrak bawang hitam dan suspensi bakteri, agar terhindar dari senyawa atau mikroorganisme lain yang mungkin dapat mempengaruhi hasil penelitian, dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15-20 menit. Alat-alat yang digunakan ditunggu sehingga mencapai suhu ruangan dan kering.

#### 1.6.1.2 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman bawang putih (*Allium Sativum* L.) dilakukan di UPT Materia Medika Batu Jawa Timur.

#### 1.6.1.3 Pembuatan Bawang Hitam

Pembuatan bawang hitam melalui tahap-tahap berikut ini:

1. Disiapkan bawang putih yang telah diperoleh
2. Ditimbang bawang putih sebanyak 1 kg
3. Dimasukan kedalam pemasak nasi
4. Dipanaskan pada suhu 70<sup>0</sup>C dalam *mode keep warm* sampai 21 hari, lalu
5. Dilihat hasil bawang hitam (Aini dan Shovitri, 2018).

#### 1.6.1.4 Pembuatan Ekstrak Bawang Hitam

Pembuatan ekstrak bawang hitam melalui tahap-tahap berikut ini:

1. Diambil bawang hitam
2. Dihaluskan dengan mesin *blender* dan keringkan dalam suhu ruang
3. Ditimbang serbuk bawang hitam seberat 50 g, rendam dalam pelarut etanol 96% sebanyak 500 mL
4. Didiamkan selama 5 hari sambil sesekali diaduk
5. Disaring dengan menggunakan corong *buchener* yang dialasi dengan kertas saring *Whatman* no. 42

6. Diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator*, kemudian
7. Dipekatkan menggunakan penangas air hingga diperoleh ekstrak kental (Aini dan Shovitri, 2018).

#### 1.6.1.5 Identikasi Senyawa Bawang Hitam

##### 1. Uji Flavonoid

Sebanyak 5 mL ekstrak bawang hitam (*Allium Sativum* L.) dimasukkan kedalam 2 tabung reaksi, tabung 1 ditambahkan 3 tetes larutan NaOH

- 1) Terbentuk warna kuning intens yang menjadi tidak berwarna dengan penambahan asam encer menunjukkan adanya flavonoid, (Rahmadani, 2015)
- 2) Tabung ke 2 ditambahkan 0,1 g serbuk Mg dan 5 tetes HCl pekat, terbentuk warna jingga menunjukkan adanya flavonoid (Setyowaty dkk, 2014)

##### 2. Uji Saponin

Sebanyak 5 mL ekstrak bawang hitam (*Allium Sativum* L.) dimasukkan kedalam tabung reaksi

- 1) Tambahkan 10 mL aquadest kedalam tabung reaksi berisi ekstrak dan lakukan pengocokan kuat selama 30 detik kemudian amati perubahan yang terjadi
- 2) Jika terbentuk busa mantap setinggi 1-10 cm dan tidak hilang selama 30 detik, maka identifikasi menunjukkan adanya senyawa saponin.

- 3) Uji penegasan dilakukan dengan menambahkan 1 tetes asam klorida 2N, jika buih tidak hilang maka identifikasi menandakan adanya senyawa saponin.

#### 1.6.1.6 Pembuatan Media *Nutrien Agar* (NA)

Pembuatan media *Nutrien Agar* melalui tahap-tahap berikut ini:

1. Ditimbang *Nutrien Agar* seberat 2,5 g
2. Dimasukkan kedalam erlenmeyer, larutkan dengan aquadest sebanyak 100 mL
3. Dipanaskan sampai mendidih sambil sesekali diaduk
4. Ditutup erlenmeyer dengan kapas dan dibungkus dengan kertas coklat lalu diikat
5. Disterilkan dalam autoclaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit
6. Dikeluarkan erlenmeyer berisi larutan NA dari dalam autoklaf dengan perlahan-lahan (Dewangga, 2013)

#### 1.6.1.7 Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri melalui tahap-tahap berikut ini:

1. Dimasukkan media NA yang telah dilarutkan dengan aquades dalam 8 tabung reaksi masing-masing sebanyak 7 mL
2. Disterilkan tabung reaksi dalam autoclaf pada suhu 121°C selama 15 menit, setelah steril tabung dimiringkan dan didiamkan hingga memadat
3. Diambil sejumlah 1 jarum ose stok bakteri *Staphylococcus aureus* diinokulasi kedalam media agar miring kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Nurchayani, 2011).

### 1.6.1.8 Pembuatan Media *Manitol Salt Agar* (MSA)

Pembuatan media *Manitol Salt Agar* melalui tahap-tahap berikut ini:

1. Ditimbang media *Manitol Salt Agar* seberat 5,55 g
2. Dimasukkan kedalam erlenmeyer larutkan dengan aquadest sebanyak 50 mL
3. Dipanaskan sampai mendidih sambil sesekali diaduk, kemudian
4. Ditutup erlenmeyer dengan kapas dan dibungkus dengan kertas coklat lalu diikat
5. Disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit
6. Dikeluarkan erlenmeyer berisi larutan MSA dari autoklaf dengan perlahan-lahan (Misna, 2016).

**Tabel 3. 2 Komposisi *Manitol Salt Agar***

Bahan	Jumlah
Digesti pankreatik kasein P	5,0 g
Digesti peptic jaringan	5,0 g
Hewan P Ekstrak daging	1,0 g
D-manitol P	10,0 g
Natrium Klorida P	75,0 g
Agar P	15,0 g
Merah Fenol P	0,25 g
Air 1	1000 mL

Sumber : (Farmakope Indonesia edisi IV : 849)

### 3.6.2 Tahap Pelaksanaan

#### 3.6.2.1 Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri melalui tahap-tahap berikut ini:

1. Disiapkan erlenmeyer dan dimasukkan 25 mL larutan NaCl 0,9% untuk mensuspensikan bakteri

2. Diambil biakan bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan jarum ose steril sebanyak 1-2 ose secara aseptis
3. Dimasukkan biakan tersebut kedalam erlenmeyer yang sudah berisi larutan NaCl 0,9%, kemudian
4. Diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer sinar tampak pada panjang gelombang 580 nm sedemikian rupa sehingga pengenceran tertentu diperoleh % transmitter 25 (Kumala dan Indriana, 2008).

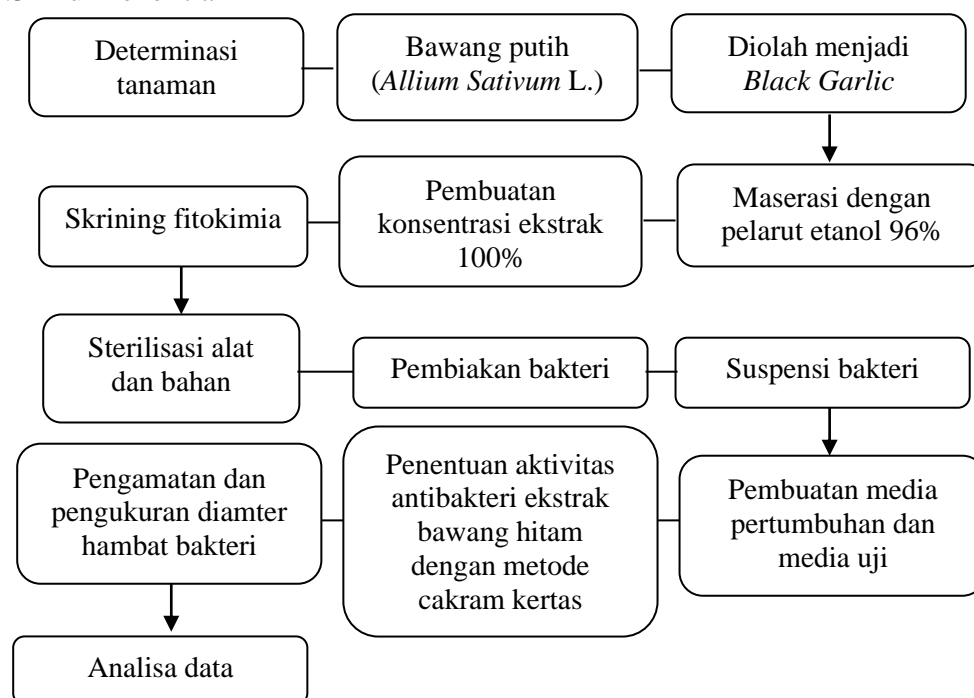
#### 3.6.2.2 Uji Antibakteri dengan Metode Difusi Cakram

Uji antibakteri melalui tahap-tahap berikut ini:

1. Disiapkan cawan petri yang berisi media MSA yang sudah padat dan seterusnya sampai tiga kali replikasi serta kontrol media
2. Diinokulasi biakan murni *Staphylococcus aureus* secara aseptis kedalam cawan petri yang berisi media MSA dengan jarum ose secara zig-zag
3. Direndam kertas cakram kedalam sampel ekstrak etanol bawang hitam selama 5 menit
4. Diletakan kertas cakram pada permukaan media MSA, kemudian
5. Diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 1 x 24 jam
6. Diukur luas zona hambat yang terbentuk dengan menggunakan jangka sorong.



## 3.6.2.3 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian

## 3.7 Analisa Data

Dalam penelitian ini analisis data diambil dari hasil pengukuran zona bening yang terjadi pada daerah sekitar kertas cakram menggunakan janga sorong. Kemudian data yang diperoleh dianalisis, dan dimasukkan dalam kategori lemah, sedang, kuat, sangat kuat atau tidak ada daya hambat dengan membandingkan literatur yang ada.

