

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Untuk mengetahui ada tidaknya aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun lili paris (*C. comosum*) terhadap bakteri *S. epidermidis* maka dilakukan penelitian dengan metode deskriptif untuk menggambarkan ada atau tidaknya aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun lili paris terhadap pertumbuhan *S. epidermidis*. Dimana nanti hasil penelitian yang didapatkan berupa data kuantitatif yang menunjukkan hasil zona hambat yang terbentuk dari ekstrak etanol daun lili paris yang memiliki aktivitas antibakteri.

Adapun tahap penelitian meliputi pengumpulan daun lili paris, pembuatan simplisia daun lili paris, pembuatan ekstrak etanol daun lili paris dengan metode remaserasi, dan pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun lili paris hasil remaserasi terhadap bakteri *S. epidermidis*.

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah daun lili paris yang didapatkan dari Kelurahan Purwosari, Kecamatan Purwosari, Pasuruan, Jawa Timur. Sampel dalam penelitian ini adalah sebagian ekstrak etanol daun lili paris.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pengambilan bahan baku berada di Kelurahan Purwosari, Kecamatan Purwosari, Pasuruan, Jawa Timur. Sedangkan, untuk pelaksanaan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Farmakognosi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang. Waktu penelitian akan dilaksanakan mulai tahap penyusunan proposal hingga tahap analisa data yaitu pada bulan November 2021 sampai dengan bulan Mei 2022.

3.4 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3.1 Tabel Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Ekstrak etanol daun lili paris	Hasil ekstraksi daun lili paris menggunakan metode remaserasi dengan pelarut etanol 96%	Neraca analitik	Bobot (g)	Rasio
Aktivitas antibakteri	Kemampuan ekstrak daun lili paris untuk menghambat atau membunuh bakteri <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	Jangka sorong	Diameter zona hambat (mm) Kategori diameter zona hambat : Lemah : < 5 mm Sedang : 5-10 mm	Rasio

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
			Kuat : > 10-20 mm	
			Sangat kuat : > 20-30 mm	

3.5 Alat dan Bahan

Pada tahap ini, peneliti melakukan persiapan alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian. Bahan-bahan yang digunakan antara lain daun lili paris (*C. comosum*) yang diperoleh dari Purwosari, Pasuruan, bakteri *S. epidermidis*, media MSA, larutan NaCl 0,9%, aquadest steril, clindamycin salep, aquadest, DMSO dan etanol 96%.

Sedangkan untuk alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain bejana maserasi, corong pisah, kertas saring, *rotary evaporator*, autoklav, oven, inkubator, bunsen, jarum ose, cawan petri, mikropipet, blue tip, tabung reaksi, gelas ukur, timbangan analitik, erlenmeyer, kertas label, kapas, kulkas, jangka sorong, batang pengaduk, cawan porselin, dan LAF.

3.6 Prosedur Penelitian

Adapun beberapa tahapan dan prosedur yang dilakukan dalam melaksanakan penelitian ini antara lain :

3.6.1 Pembuatan Simplisia Daun Lili Paris (*C. comosum*)

Adapun rangkaian prosedur yang dilakukan untuk membuat simplisia daun lili paris adalah sebagai berikut :

1. Dilakukan pengumpulan daun lili paris sebanyak 500 g
2. Dilakukan sortasi basah untuk memisahkan kotoran atau bahan asing yang terdapat pada daun
3. Dicuci dengan air mengalir, ditiriskan, ditimbang sebagai berat basah
4. Dikeringkan daun lili paris dengan cara diangin-anginkan di udara yang terlindung dari sinar matahari langsung.
5. Dilakukan sortasi kering, ditimbang sebagai berat kering
6. Dihaluskan simplisia daun lili paris
7. Diayak menggunakan pengayak mesh 60 (Antari et al., 2015).

(Syamsul et al., 2020)

3.6.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Lili Paris (*C. comosum*)

Adapun rangkaian prosedur yang dilakukan untuk membuat ekstrak etanol daun lili paris (*C. comosum*) adalah sebagai berikut :

1. Ditimbang 41 gram serbuk simplisia daun lili paris dimasukkan ke dalam bejana maserasi.
2. Diukur pelarut etanol 96% sebanyak 410 mL menggunakan gelas ukur. Dimasukkan ke bejana maserasi hingga simplisia terendam sempurna
3. Dilakukan maserasi selama 3x24 jam, sambil sesekali diaduk (Rasydy et al., 2019)
4. Dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring hingga diperoleh filtrat.

5. Dimasukkan residu ke bejana maserasi, ditambahkan etanol 96% sebanyak 410 mL, dilakukan remaserasi selama 3x24 jam
6. Dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring hingga diperoleh filtrat.
7. Semua maserat dievaporasi pada suhu 40-50°C selama 3 jam menggunakan *rotary evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak kental

(Majidah et al., 2014)

3.6.3 Pembuatan Media MSA (Manitol Salt Agar)

Adapun rangkaian prosedur yang dilakukan untuk membuat media MSA adalah sebagai berikut :

1. Dihitung kebutuhan MSA dan aquadest yang dibutuhkan. Perhitungan media MSA yang digunakan dapat dilihat pada **Lampiran 3**.
2. Ditimbang MSA sebanyak 27 gram, dimasukkan ke erlenmeyer
3. Diukur aquadest sebanyak 250 mL, dimasukkan ke erlenmeyer berisi MSA
4. Dipanaskan campuran MSA dengan aquadest di atas api bunsen hingga mendidih, sambil diaduk
5. Media yang sudah mendidih dimasukkan ke 12 tabung reaksi masing-masing 5 mL media, kemudian ditutup menggunakan kapas
6. Ditutup erlenmeyer berisi sisa media menggunakan kapas
7. Dilakukan sterilisasi pada media menggunakan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit
8. Media yang berada di tabung reaksi ditunggu hingga memadat sambil dimiringkan.

(Novitasari et al., 2019)

3.6.4 Sterilisasi Alat dan Bahan

Adapun rangkaian prosedur yang dilakukan untuk melakukan sterilisasi alat dan bahan adalah sebagai berikut :

1. Dibungkus cawan petri menggunakan kertas coklat
2. Dibungkus tabung reaksi dan erlenmeyer yang berisi media bagian mulutnya ditutup dengan kapas, kemudian dibungkus menggunakan kertas coklat
3. Tabung reaksi berisi media dan blue tip dimasukkan ke beaker glass berbeda lalu dibungkus dengan kertas coklat. Dipastikan tabung reaksi berisi media berdiri dengan tegak agar media tidak tumpah.
4. Cawan petri disterilkan di oven dengan suhu 105°C selama 30-60 menit
5. Tabung reaksi berisi media, erlenmeyer berisi media, dan blue tip disterilkan di autoklaf dengan suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit

(Fitriyanti et al., 2019)

3.6.5 Peremajaan Bakteri *S. epidermidis*

Adapun rangkaian prosedur yang dilakukan untuk meremajakan bakteri adalah sebagai berikut :

1. Disiapkan bakteri *S. epidermidis* yang akan diremajakan, kemudian disiapkan media miring sebanyak 12 tabung.
2. Dilakukan peremajaan menggunakan jarum ose dengan disentuhkan ujung jarum ose pada inokulum bakteri dan diremajakan menggunakan teknik streak pada media miring
3. Diinkubasi bakteri dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24-48 jam

(Retnaningsih et al., 2019)

3.6.6 Pembuatan Suspensi Bakteri *S. epidermidis*

Adapun rangkaian prosedur yang dilakukan untuk membuat suspensi bakteri adalah sebagai berikut :

1. Diambil biakan bakteri menggunakan jarum ose dan dilarutkan dalam 25 mL larutan NaCl 0,9%
2. Disetarakan kekeruhan suspensi bakteri dengan larutan standar NaCl 0,9% hingga diperoleh %T = 25 (Yulistyani et al., 2021)

(Retnaningsih et al., 2019)

3.6.7 Inokulasi Bakteri *S. epidermidis*

Adapun rangkaian prosedur yang dilakukan untuk menginokulasikan bakteri adalah sebagai berikut :

1. Suspensi bakteri diinokulasikan sebanyak 1 mL menggunakan mikropipet ke dalam cawan petri
2. Dimasukkan media MSA ke dalam cawan petri menggunakan metode pour plate sebanyak kurang lebih 15 mL. Digoyangkan membentuk angka delapan, ditunggu hingga media memadat

(Nugrahani et al., 2020)

3.6.9 Pengujian Aktivitas Antibakteri

Adapun rangkaian prosedur yang dilakukan untuk menguji aktivitas antibakteri adalah sebagai berikut :

1. Setelah memadat, dibuat lubang sumuran pada media menggunakan bor sumuran dengan diameter kurang lebih 1 cm pada bagian tengah cawan.

2. Dilakukan uji aktivitas antibakteri dengan cara dimasukkan ekstrak etanol daun lili paris kurang lebih sebanyak 0,1253 g dalam lubang sumuran dan direplikasi sebanyak 3 kali.
3. Diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24-48 jam.
4. Kemudian diamati dan diukur diameter dari lubang sumuran dan zona hambat yang terbentuk pada masing-masing cawan petri dengan menggunakan jangka sorong. Diukur diameter lubang sumuran dan zona hambat minimal 3 diameter dari yang terpendek hingga terpanjang.

(Fitriyanti et al., 2019)

3.7 Analisis Data

Dalam penelitian ini, metode analisis data yang akan digunakan dalam penarikan kesimpulan atau pembuat keputusan yaitu metode deskriptif dengan data berupa kuantitatif. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun lili paris terhadap *S. epidermidis* dianalisis setelah proses inkubasi berdasarkan lebarnya diameter zona hambat yang terbentuk, dengan kriteria sebagai berikut :

Zona Hambat	Kategori
< 5 mm	Lemah
5-10 mm	Sedang
10-20 mm	Kuat
> 20-30 mm	Sangat Kuat