

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dengan pendekatan kuantitatif. Menurut Sugiyono (Noerfasya, 2018. hlm.33) metode eksperimen merupakan metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap yang lain dalam kondisi yang terkendali. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas ekstrak tanaman kelor (*Moringa oleifera* Lam.) terhadap pertumbuhan bakteri patogen (*Staphylococcus aureus*).

B. Desain Penelitian

Untuk melakukan penelitian, peneliti diharuskan memiliki rancangan dan perencanaan penelitian agar penelitian yang dilakukan tersusun secara sistematis dan berjalan dengan baik. Pada penelitian ini, peneliti menggunakan desain penelitian eksperimental laboratorium dan dilakukan secara *in vitro* menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan konsentrasi perlakuan yaitu 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% dengan kontrol positif menggunakan tetrasiklin dan kontrol negatif menggunakan ethanol 96%.

Adapun dalam penentuan konsentrasi peneliti mengacu padahasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Rahmiati *dkk* (2017) yaitu Daya Hambat Ekstrak Etanol Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*L) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis* secara *In Vitro*, dari hasil penelitian tersebut diketahui bahwa ekstrak buah belimbing dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 30%. Sedangkan untuk pengulangan pada setiap perlakuan dilakukan perhitungan dengan menggunakan rumus replikasi sebagai berikut:

$$(r - 1) (t - 1) \geq 15$$

Keterangan:

r = Jumlah pengulangan

t = Jumlah treatment/perlakuan

15 = Derajat kebebasan umum

Perhitungan Pengulangan Uji Ekstrak Daun Kelor

$$(r - 1)(t - 1) \geq 15$$

$$(r - 1)(10 - 1) \geq 15$$

$$(r - 1)9 \geq 15$$

$$9r - 9 \geq 15$$

$$9r \geq 24$$

$$r \geq 2,66 \text{ (dibulatkan menjadi 3)}$$

Tabel 3.1 Desain penelitian dan penomoran percobaan ekstrak tanaman kelor terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*

A1	D1	H1	E1	G1	F1	C1	B1	KP1	KN1
B2	F2	D2	A2	KP2	E2	C2	H2	KN2	G2
D3	E3	H2	C3	A3	F3	B3	G3	KN3	KP3

Keterangan:

KP1 = Kontrol Positif Pengulangan 1

KP2 = Kontrol Positif Pengulangan 2

KP3 = Kontrol Positif Pengulangan 3

KN1 = Kontrol Negatif Pengulangan 1

KN2 = Kontrol Negatif Pengulangan 2

KN3 = Kontrol Negatif Pengulangan 3

A1 = Konsentrasi 10% Pengulangan 1

A2 = Konsentrasi 10% Pengulangan 2

A3 = Konsentrasi 10% Pengulangan 3

B1 = Konsentrasi 20% Pengulangan 1

B2 = Konsentrasi 20% Pengulangan 2

B3 = Konsentrasi 20% Pengulangan 3

- C1 = Konsentrasi 30% Pengulangan 1
- C2 =Konsentrasi 30% Pengulangan 2
- C3 =Konsentrasi 30% Pengulangan 3
- D1 = Konsentrasi 40% Pengulangan 1
- D2 = Konsentrasi 40% Pengulangan 2
- D3 = Konsentrasi 40% Pengulangan 3
- E1 = Konsentrasi 50% Pengulangan 1
- E2 =Konsentrasi 50% Pengulangan 2
- E3 =Konsentrasi 50% Pengulangan 3
- F1 = Konsentrasi 60% Pengulangan 1
- F2 =Konsentrasi 60% Pengulangan 2
- F3 =Konsentrasi 60% Pengulangan 3
- G1 = Konsentrasi 70% Pengulangan 1
- G2 =Konsentrasi 70% Pengulangan 2
- G3 =Konsentrasi 70% Pengulangan 3
- H1 = Konsentrasi 80% Pengulangan 1
- H2 =Konsentrasi 80% Pengulangan 2
- H3 =Konsentrasi 80% Pengulangan 3

C. Waktu dan Tempat Penelitian

Dibawah ini peneliti akan menuliskan rincian waktu dan tempat dilaksanakannya penelitian sebagai berikut:

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan kurun waktu kurang lebih tiga minggu dari tanggal 4 Agustus hingga 23 Agustus 2019. Pada penelitian ini peneliti menggunakan uji *in vitro* yang dilakukan kurang lebih selama satu hari (1 x 24 jam).Pembuatan kurva tumbuh bakteri dan kurva baku kurang lebih selama dua hari dan uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* selama dua hari.

2. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Lingkungan dan Bioteknologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia Bandung yang berada di Jl. Dr. Setiabudi No. 229, Bandung, Jawa Barat 40154.

D. Subjek & Objek Penelitian

Dalam penelitian ini terdapat subjek dan objek yang diteliti, diantaranya sebagai berikut:

1. Subjek dan Objek

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman kelor, sedangkan objek yang digunakan adalah bakteri *Staphylococcus aureus*.

2. Populasi dan Sampel Penelitian

Pada penelitian ini populasi yang digunakan adalah tanaman kelor yang tumbuh di daerah Kecamatan Bojongsoang, Kabupaten Bandung. Sedangkan untuk sampel yang akan digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak daun kelor yang memiliki konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, dan 80%.

E. Teknik Pengumpulan Data dan Instrumen Penelitian

Adapun teknik dan alat yang digunakan dalam proses pengumpulan data adalah sebagai berikut:

1. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data pada uji *in vitro* menggunakan teknik observasi, dimana objek diamati dan diteliti secara langsung. Waktu yang diperlukan pada uji daya hambat ini adalah satu hari, dengan parameter yang diukur yaitu diameter zona bening bakteri dan menggunakan satuan centimeter (cm).

Kemudian data yang diperoleh pada setiap perlakuan dicatat, seperti data penimbangan, diameter zona hambat bakteri, dan lain sebagainya. Semua kegiatan yang dilakukan oleh peneliti dari awal pengamatan hingga akhir akan dilakukan pengambilan foto untuk dokumentasi.

Peneliti juga melakukan studi pustaka dengan membaca jurnal, artikel, proposal, skripsi peneliti terdahulu, dan lain sebagainya. Lalu mencatat hal-hal yang

dianggap penting dan dapat membantu peneliti untuk melakukan penelitian dan menyusun skripsi.

2. Instrumen Penelitian

Instrumen yang dimaksud dalam penelitian ini adalah alat bantu yang digunakan oleh peneliti untuk pengambilan data. Instrumen yang digunakan pada penelitian ini adalah jangka sorong untuk mengukur diameter zona hambat.

Tabel 3.2 Hasil pengamatan uji antibakteri ekstrak tanaman kelor

PERLAKUAN	PENGULANGAN			RATA-RATA
	1	2	3	
Kontrol +				
Kontrol -				
10%				
20%				
30%				
40%				
50%				
60%				
70%				
80%				

F. Teknik Analisis Data

Data dilihat dari pengaruh ekstrak tanaman kelor apakah berpengaruh terhadap pengendalian bakteri *Staphylococcus aureus* atau tidak dan pada perlakuan konsentrasi manakah yang efektif untuk mengendalikan bakteri *Staphylococcus aureus*. Hasil dari pengamatan yang diukur adalah waktu pertumbuhan dan diameter zona hambat bakteri yang kemudian data dianalisis secara statistik menggunakan ANOVA *One Way* dan uji Duncan untuk mengetahui nilai rata-rata yang berbeda. Analisis data statistik ini dilakukan menggunakan aplikasi *Statistical and Product Service Solution (SPSS)* versi 20.

G. Prosedur Penelitian

Dalam penelitian ini langkah-langkah penelitian dibagi menjadi beberapa tahap, yaitu:

1. Tahap Persiapan

Tahap perencanaan merupakan tahap awal dalam penelitian. Hal-hal yang dilakukan oleh peneliti di tahap perencanaan adalah sebagai berikut:

- a. Menyusun proposal penelitian
- b. Melakukan seminar proposal
- c. Menyusun surat perizinan

Surat perizinan dibuat untuk melakukan penelitian di Laboratorium Lingkungan dan Bioteknologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia.

- d. Melakukan studi lapangan

Mencari bahan-bahan yang akan digunakan pada saat penelitian, salah satunya adalah mencari tanaman kelor (*Moringa oleifera* Lam.) yang berada disekitar Kabupaten Bandung, lalu bagian yang diambil adalah bagian daunnya. Dan bakteri *Staphylococcus aureus* yang digunakan adalah bakteri yang telah dibiakan dalam biakan NB (*Nutrient Broth*) yang diperoleh dari Laboratorium Lingkungan dan Bioteknologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia.

- e. Persiapan alat dan bahan

Membuat daftar alat dan bahan yang digunakan pada penelitian. Setelah dibuatkan daftar, alat-alat tersebut disterilkan menggunakan autoclave dengan suhu 121°C selama 15-20 menit. Daftar alat dan bahan yang digunakan dilampirkan.

- f. Pembuatan ekstrak daun kelor

Pembuatan ekstrak daun kelor menggunakan metode maserasi yaitu suatu metode yang membiarkan padatan terendam dalam suatu pelarut. Bagian daun pada tanaman kelor dipisahkan dan dicuci hingga dirasa bersih lalu ditimbang. Setelah itu tanaman kelor yang telah dicuci dikeringkan dibawah sinar matahari. Setelah mengering daun kelor di blender hingga membentuk serbuk halus dan diayak menggunakan saringan mesh 100 agar mendapatkan hasil serbuk yang lebih halus lagi, lalu ditimbang sebanyak 50 g. Selanjutnya lakukan proses ekstraksi menggunakan metode maserasi, masukkan serbuk halus kelor tersebut ke dalam *beaker glass* 600 ml lalu larutkan dengan ethanol 96% sebanyak 500 ml.

Selanjutnya tutup *beaker glass* yang berisi larutan tersebut dengan menggunakan *plastic wrap* agar ethanol tidak menguap, setelah itu simpan diatas alat *shaker* dan diamkan selama 6 - 24 jam dan 110 - 150 RPM.

Selanjutnya dilakukan proses penyaringan sederhana menggunakan corong kaca yang diberi kertas whatman no. 1 dan diletakan pada statif yang dibawahnya diberi penampung filtrat berupa beaker glass 250ml. Saring campuran serbuk kelor dan ethanol yang telah di *shaker* hingga larutan tersebut habis tersaring. Lalu lakukan proses penguapan dengan menggunakan alat *water bath* dengan suhu 70°C atau hingga menjadi pasta, ekstrak yang dihasilkan merupakan ekstrak murni atau ekstrak kasar karena sudah tidak mengandung pelarutnya lagi. Timbang pasta di atas cawan petri, lalu larutkan pasta dengan menggunakan ethanol 96%, volume ethanol dan berat pasta disesuaikan dengan konsentrasi perlakuan. Tutup cawan petri dan beri *plastic wrap* pada sekeliling cawan petri agar ethanol tidak menguap.

g. Pembuatan *Nutrient Agar*

Timbang *Nutrient Agar* (NA) sebanyak 6 gram lalu larutkan dalam 300 ml aquadest menggunakan beaker glass 600 ml. Setelah itu dididihkan dengan menggunakan *magnetic stirrer hotplate* diatas penangas air sampai mendidih. Sebanyak 10 ml dituangkan pada 4 tabung reaksi steril dan ditutup menggunakan kapas yang telah dibungkus kain kassa selanjutnya dibungkus menggunakan plastik anti panas dan diikat oleh karet. Lalu media disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dibiarkan pada suhu ruangan selama ± 30 menit sampai media memadat.

h. Pembuatan *Nutrient Broth*

Timbang *Nutrient Broth* sebanyak 1,2 gr lalu masukkan ke dalam beaker glass 250ml, tambahkan aquadest sampai 150ml. Selanjutnya dididihkan menggunakan *magnetic stirrer hotplate*. Lalu masukkan larutan NB tersebut ke dalam Erlenmeyer 250ml, tutup menggunakan kapas yang telah dibungkus oleh kain kassa dan bungkus juga menggunakan *plastic wrap* agar media NB tidak terkontaminasi oleh udara luar. Sterilkan dalam autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi lalu biakan bakteri pada suspensi tersebut dan simpan pada *laboratory shaker*.

2. Tahap Pelaksanaan

Tahap pelaksanaan ini merupakan tahap inti dari penelitian. Berikut bagian dari tahap pelaksanaan:

a. Uji *In Vitro* Ekstrak Daun Kelor

Panaskan NA yang telah dibuat hingga mencair, lalu dinginkan pada suhu ruangan. Masukkan biakan bakteri yang ada dalam NB sebanyak 1ml menggunakan mikropipet ke dalam cawan petri yang telah steril. Lalu tuangkan NA kedalam cawan petri dengan cepat dan dilakukan diatas spirtus yang menyala agar tetap steril, ratakan NA dan bakteri yang telah dimasukkan ke dalam cawan petri secara perlahan, tunggu NA hingga menjadi agar kembali. Kemudian masukkan kertas cakram yang telah direndam/ ditetesi kontrol positif tetrasiklin, kontrol negatif ethanol 96%, dan ekstrak daun kelor dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%. Setelah itu bungkus cawan petri menggunakan plastik dan ikat dengan karet, inkubasi pada suhu 22-30°C selama 1x24 jam. Parameter yang diamati adalah diameter zona bening.

b. Pembuatan Kurva Tumbuh Bakteri *Staphylococcus aureus*

Pada pembuatan kurva tumbuh ini peneliti tidak membuat kultur inokulum, melainkan menggunakan bakteri pada media agar miring yang dilarutkan kedalam NaCl 0,85%. Lalu bandingkan kekeruhan larutan NaCl yang mengandung bakteri tersebut dengan larutan Mc Farland 0,5, kekeruhan harus sama dengan larutan Mc Farland. Setelah itu masukkan larutan NaCl yang telah mengandung bakteri tersebut kedalam larutan *Nutrient Broth*. Cari nilai absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer, hasil dari pengukuran nilai absorbansi tersebut dinyatakan sebagai nilai absorbansi pada jam ke-0. Selanjutnya inkubasi larutan tersebut dengan menggunakan *waterbath shaker* pada suhu 37°C dengan kecepatan 110 rpm selama 24 jam. Kemudian hitung nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer setiap 2 jam sekali selama 24 jam. Catat setiap hasil yang didapat, dan lihat pada jam ke berapa bakteri mencapai fase log.

c. Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

Pengujian MIC yang dilakukan mengacu pada penelitian Munfaati (Zen dkk, 2015. Hlm.36). Encerkan ekstrak *Moringa oleifera* L dengan menggunakan

pelarut DMSO 1% terlebih dahulu. Lalu siapkan 5 tabung reaksi yang telah diisi dengan *Nutrient Broth* (NB) steril.

Selanjutnya 3 tabung reaksi berisi NB ditambahkan 1 ml ekstrak *Moringa oleifera* L dan 200 μ L kultur bakteri, lalu 1 tabung reaksi berisi NB ditambahkan 1 ml antibiotik tetrasiklin dan 200 μ L kultur bakteri (kontrol positif), dan 1 tabung reaksi berisi NB ditambahkan 1ml DMSO 1% dan 200 μ L kultur bakteri (kontrol negatif).

Lalu vortex kelima tabung reaksi berisi larutan tersebut agar homogen. Ambil 2 ml dari setiap tabung reaksi untuk diukur nilai OD (*Optical Density*) bakteri dengan menggunakan alat spektrofotometer (data awal). Inkubasi kelima tabung tersebut selama 24 jam dan pada suhu 37°C, lalu ambil kembali dari setiap tabung reaksi tersebut sebanyak 2 ml untuk diukur nilai OD-nya lagi. MIC dapat dilihat dengan menghitung selisih nilai OD dengan konsentrasi terendah yang bernilai negatif.

d. Uji *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC)

Pengujian MBC mengacu pada penelitian Munfaati (Queljoe *dkk*, 2015. hlm.36). Uji MBC yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan kontrol negatif DMSO 1%, kontrol positif tetrasiklin dan konsentrasi 10%, 40% dan 70% dengan metode *pour plate* yaitu dengan cara mencairkan media NA terlebih dahulu dan siapkan 5 cawan petri dalam keadaan steril.

Selanjutnya masukan ekstrak dengan varian konsentrasi yang telah diencerkan dengan larutan DMSO 1% ke dalam masing-masing cawan petri sebanyak 1ml, lalu tambahkan larutan NA dan homogenkan. Setelah agar memadat, bungkus menggunakan plastik anti panas dan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil dapat ditentukan dengan melihat ada atau tidaknya pertumbuhan koloni pada media NA menggunakan *colony counter*.

3. Tahap Akhir

Tahap ini merupakan tahapan akhir dari penelitian. Berikut bagian-bagian dari tahap pasca-penelitian:

a. Mengolah data hasil penelitian

Setelah percobaan ekstrak daun kelor selesai dilakukan, peneliti mendapatkan hasil berupa diameter daya hambat ekstrak daun kelor terhadap pertumbuhan bakteri. Data tersebut kemudian diolah menggunakan teknik analisis data yang sudah ditentukan sebelumnya.

b. Melakukan pembahasan dan kesimpulan hasil penelitian

Setelah data dari hasil penelitian selesai diolah, selanjutnya dibuatkan pembahasan dan kesimpulan dari semua kegiatan penelitian yang telah dilakukan.

c. Menyusun penulisan skripsi