

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorium mengenai efek antibakteri daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap bakteri penyebab diare yaitu *Shigella dysenteriae*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2017 sampai dengan Juli 2017.

C. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian Uji Aktivitas Antibakteri

a. Variabel Bebas

Konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.).

b. Variabel Tergantung

Kadar Bunuh Minimum (KBM) dan Kadar Hambat Minimum (KBM) terhadap *Shigella dysenteriae* dari ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.).

c. Variabel Terkendali

Media pertumbuhan bakteri, bakteri *Shigella dysenteriae*, lama inkubasi, suhu inkubasi.

2. Definisi Operasional

a. Daya Antibakteri

Daya antibakteri merupakan kemampuan suatu antibakteri untuk membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri. Daya antibakteri ini dapat dilihat pada pertumbuhan bakteri *Shigella dysentriae* pada media agar. Semakin sedikit pertumbuhan bakteri maka menandakan adanya hambatan pada Kadar Hambat Minimum (KHM) dan tidak adanya pertumbuhan bakteri menunjukkan Kadar Bunuh Minimum (KBM) suatu antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri.

b. Kadar Hambat Minimum (KHM)

Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi minimal masing-masing ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysentriae* setelah diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C berdasarkan konsentrasi terendah dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif ditandai dengan berkurangnya pertumbuhan bakteri pada media agar.

c. Kadar Bunuh Minimum (KBM)

Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi minimal masing-masing ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang diperlukan untuk membunuh pertumbuhan bakteri *Shigella dysentriae* setelah diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C berdasarkan konsentrasi terendah dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif ditandai dengan adanya tidak adanya pertumbuhan bakteri pada media agar.

d. Faktor Retardasi (Rf)

Rf merupakan perbandingan jarak yang ditempuh sampel dengan jarak yang ditempuh fase gerak. Nilai Rf ini kemudian dibandingkan dengan nilai Rf senyawa standar.

D. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

Pisau (HB Stainless®); Blender (Philips®); *Rotary Evaporator* (Heidolph®); Penangas air (Akenonno®); Oven (Shimadzu®); Inkubator (Mettler®); Autoklaf (All American®); Propipet (Glasfirn®); Mikropipet (Gilson®); Timbangan Analitik (Casbee®); Alat-alat Gelas (Pyrex®); Kertas Label (Brand®); Kain Hitam; Laminar Air Flow (LAF); Kapas Lidi; Ose Steril; Pinset; Tabung Reaksi.

2. Bahan Penelitian

Bahan utama dalam penelitian ini adalah Daun Sirsak (*Annona muricata L.*). Bahan kimia untuk uji aktifitas antibakteri komponen bioaktif adalah: Etanol 70%, Kontrol positif (Ciprofloksasin), Kontrol negatif (DMSO), larutan NaCl fisiologis, bakteri uji (*Shigella dysenteriae*), medium TSA (*Tryptone Soya Agar*).

E. Cara Kerja

1. Determinasi Tanaman

Determinasi sampel dilakukan di Fakultas Farmasi Unit II bagian Biologi Farmasi, Universitas Gadjah Mada.

2. **Penyiapan Bahan**

Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) yang telah dikumpulkan dibersihkan dari pengotor, selanjutnya dicuci di bawah air mengalir sampai bersih, ditiriskan, lalu dikeringkan dengan dijemur dibawah sinar matahari yang diberi tutup kain hitam selama 3-4 hari pada bagian permukaan hingga menjadi simplisia kering. Simplisia kering yang didapat selanjutnya dihaluskan.

3. **Ekstraksi**

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi. Pertama simplisia kering Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) dihaluskan sehingga menjadi serbuk halus. Serbuk halus yang terbentuk selanjutnya direndam dengan pelarut Etanol 70%. Proses maserasi dilakukan selama 5 hari yang dilanjutkan dengan remaserasi selama 2 hari. Selama maserasi, sesekali serbuk dikocok agar penyarian sempurna. Setelah 5 hari, rendaman serbuk disaring dan dipisah antara filtrat dengan ampas yang terbentuk. Filtrat yang telah dipisah akan diuapkan dengan *rotary evaporator* sampai terbentuk ekstrak kental. Sedangkan ampas yang terbentuk akan diremaserasi selama 2 hari. Proses untuk mendapatkan ekstrak kental dari remaserasi sama dengan pada proses maserasi.

4. **Sterilisasi Alat dan Bahan**

Alat dan bahan untuk pemeriksaan mikrobiologi terlebih dahulu disterilkan sebelum digunakan. Alat-alat gelas yang digunakan disterilkan menggunakan oven pada suhu 170°C selama 1 sampai 2 jam dan jarum ose disterilkan dengan dibakar pada nyala Bunsen. Pengerjaan uji mikrobiologi dilakukan

secara aseptis dari dalam LAF yang sebelumnya telah dibersihkan kemudian disinari dengan lampu UV yang dinyalakan 15 menit sebelum digunakan.

5. Pembuatan Medium TSA (*Trypton Soya Agar*)

Medium yang digunakan untuk pembiakan bakteri uji adalah medium TSA. Sebanyak 125 gram TSA dilarutkan dalam 1 liter aquadest dan dipanaskan hingga semuanya menjadi larut. Disterilkan dalam oven pada suhu 100 °C selama ± 15 menit. Dimasukan dalam lemari es dalam keadaan sudah dingin.

6. Pembuatan Suspensi Bakteri

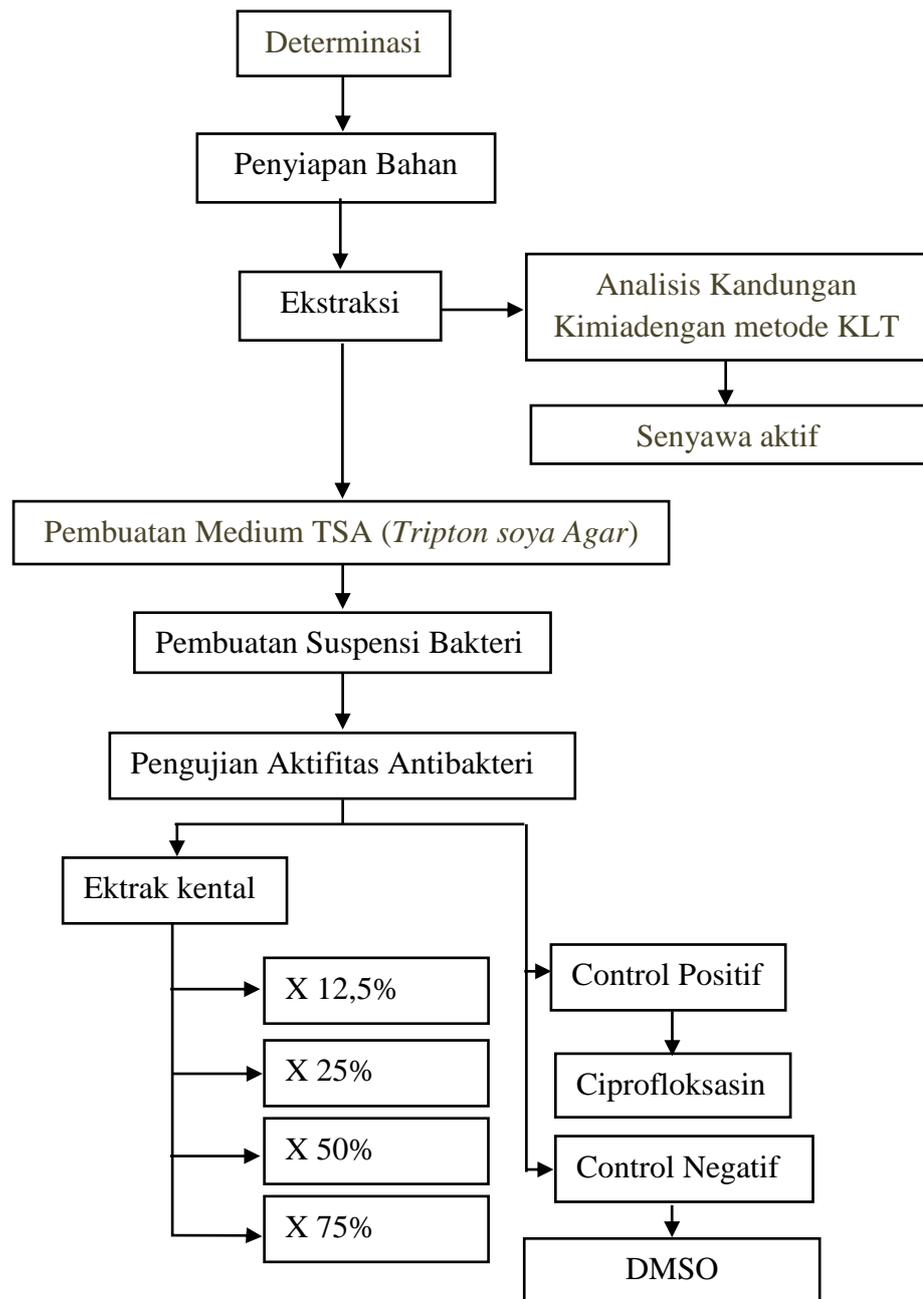
Bakteri dari kultur kerja dibuat suspensi bakteri dengan menggunakan larutan NaCl fisiologi. Dengan cara koloni bakteri diambil dari kultur kerja dengan menggunakan jarum ose kemudian dimasukan NaCl fisiologi lalu dikocok dengan menggunakan vortex sampai kelihatan tercampur rata.

7. Pengujian Aktifitas Antibakteri

Suspensi bakteri dibuat dengan mengambil 0.5 ml BHI dan ditambahkan NaCl secukupnya sampai kejernihan larutan menyerupai standart Mc Farland. Kemudian diinkubasi selama 4 jam. Untuk pembuatan konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.). Ditimbang sebanyak 1g larutkan dengan 1 ml DMSO (Kadar 100%) dan juga 750 mg dalam 1 ml DMSO (Kadar 75%). Kemudian dari larutan 1g/ml dibuat pengenceran 500 mg/ml, 250 mg/ml, 125 mg/ml. Masing-masing tabung yang telah diencerkan serta control diberi 1 ml suspensi bakteri *Shigella dysenteriae*. Inkubasi dilanjutkan selama 18-24 jam. Setelah itu masing-masing seri dan kontrol di oleskan pada media agar TSA. Inkubasi kembali dilakukan selama 18-24 jam. Kontrol

positif digunakan adalah Ciprofloxacin dan Kontrol Negatif digunakan DMSO.

F. Skema Langkah Kerja



Gambar 3.1 Skema Langkah Kerja