

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian bersifat eksperimental murni dengan rancangan acak pola searah. Eksperimental adalah penelitian dengan adanya perlakuan beberapa konsentrasi. Eksperimental dibedakan menjadi 2 yaitu Murni dan Kuasia. Eksperimental Murni yaitu bisa dengan penuh memperlakukan atau mengendalikan. Eksperimental Kuasia yaitu tidak bisa mengendalikan total karena adanya pengaruh lain.

Waktu Penelitian initelah dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Sahid Surakarta. Pengujian penelitian dilakukan pada bulan September 2020 sampai November 2020.

#### **3.2 Populasi dan Sampel**

##### **3.2.1 Populasi**

Populasi adalah keseluruhan subyek penelitian (Arikunto, 2010). Populasi adalah wilayah generalisasi yang terdiri atas obyek atau subyek yang mempunyai kualitas dan karakteristik tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya (Sugiyono, 2010). Dalam penelitian ini populasi adalah koloni *Pseudomonas aeruginosa* pada media nutrient agar.

### 3.2.2 Sampel

Sampel adalah penarikan atau pembuatan sampel dari populasi untuk mewakili populasi disebabkan untuk mengangkat kesimpulan penelitian sebagai suatu yang berlaku bagi populasi. Sampel adalah sebagian atau wakil populasi yang diteliti (Arikunto, 2010). Dalam penelitian ini sampel adalah isolat *Pseudomonas aeruginosa* yang diisolasi dari Laboratorium Bakteriologi Universitas Setia Budi Surakarta.

## 3.3 Alat dan Bahan

### 3.2.1 Alat

Alat yang akan digunakan untuk penelitian uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun adas adalah seperangkat alat gelas (*pyrex*), timbangan analitik (*ACIS*), seperangkat alat maserasi, oven (*Memmert*), kain *flannel*, *vacuum rotary evaporator* (*biobase*), *incubator* (*WINA*), autoclave (*pressure steamsterilizer*), Laminar Air Flow (*LAF*):(*WINA*), sudip, blender (*cosmos*), batang pengaduk, cawan, water bath, cawan petri (*nourmax*), jarum ose, *Eppendorf*.

### 3.2.2 Bahan

Simplisia daun adas (*Foeniculum vulgare* Mill), etanol 96% (*Rahmasari*), disk gentamicine 1% (*Oxoid*), *Dimethyl sulfoxide* (*DMSO*1%):(*EMSURE*), kertas saring (*whatman no.42*), *aquadestilata* (*water pro injection*), bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (*USB*), dan media agar Nutrien Agar(*NA*):(*Merck*).

### 3.4 Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini didapat dari Laboratorium Bakteriologi Universitas Setia Budi Surakarta, yang sudah diinokulasi pada media padat. *Pseudomonas aeruginosa* bergerak dan berbentuk batang, berukuran 0,6 x 2µm. Bakteri terlihat sebagai bakteri tunggal, berpasangan, dan kadang-kadang membentuk rantai yang pendek. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri gram negatif yang tersebar luas di alam dan biasanya terdapat di lingkungan yang lembab di rumah sakit. Tumbuh baik pada suhu 37°C – 42°C. Pertumbuhan pada suhu 42°C membedakan spesies ini dari jenis bakteri lain. Bakteri ini bersifat aerobobligat yang tumbuh dengan mudah pada banyak jenis pembenihanbiakan, kadang menghasilkan bau yang manis menyerupai anggur membentuk koloni halus bulat dengan warna berfluorosensi kehijauan. Semua spesies *Pseudomonas* dapat tumbuh baik dalam sampel nutrisi agar dan dalam kebanyakan media selektif seperti *Eosin Methylin Blue* (EMB) dan *Mac Conkey Agar* (Khunaifi, 2010).

### 3.5 Variabel Penelitian

#### 3.5.1 Variabel Bebas

Variabel yang mempengaruhi atau menjadikan sebab dari perubahan atau timbulnya variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun adas.

### 3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat, adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah sifat fisika dan kimia ekstrak etanol daun adas dan aktivitas antibakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

### 3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel lain yang ikut berpengaruh yang dibuat sama pada setiap media percobaan dan terkendali. Adapun penelitian ini yang termasuk dalam variabel terkendali adalah

a) Asal Tanaman Adas (*Foeniculum vulgare* Mill) :

Daun tanaman adas yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari daerah Cepogo, Boyolali, Jawa Tengah.

b) Metode Ekstraksi Daun Adas (*Foeniculum vulgare* Mill)

Metode ekstraksi daun adas (*Foeniculum vulgare* Mill) dilakukan dengan cara maserasi.

c) Media Uji Bakteri

Media uji bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah media Nutrien Agar (NA);(*Merck*).

d) Preparasi sampel dalam media agar meliputi :

Ukuran dan diameter cawan petri sama, ketebalan media agar sama, diameter dan kedalaman sumuran sama, volume sampel ekstrak etanol daun adas yang ditambahkan sama.

### 3.6 Definisi Operasional

Definisi operasional yang membatasi ruang lingkup atau variabel-variabel penelitian ini adalah :

- a. Ekstrak etanol daun adas (*Foeniculum vulgare* Mill) adalah ekstrak yang didapat dari hasil maserasi daun adas (*Foeniculum vulgare* Mill) dengan menggunakan pelarut etanol 96% pada suhu kamar selama 3×24 jam, dengan perbandingan 1:10 (serbuk simplisia daun adas : etanol 96%).
- b. Konsentrasi ekstrak etanol daun adas adalah pembuatan tujuh seri konsentrasi (5%, 10%, 15%, 25%, 50%, 75% dan 100%) yang diujikan terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.
- c. Aktivitas antibakteri *Pseudomonas aeruginosa* yaitu terbentuknya zona bening di sekitar kertas cakram yang telah berisi konsentrasi ekstrak etanol daun adas.
- d. Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah disk gentamicine 1%.
- e. Kontrol negatif yang digunakan sebagai pelarut adalah larutan DMSO 1%.

### 3.7 Jalannya Penelitian

#### 3.7.1 Pengambilan Sampel Daun Adas

Daun tanaman adas yang digunakan dalam penelitian ini didapat dari daerah Cepogo, Boyolali, Jawa Tengah. Daunnya

dipilih secara acak dengan memilih daun pada saat proses fotosintesis berlangsung maksimal, berwarna hijau, tidak terlalu tua dan juga tidak terlalu muda.

### **3.7.2 Determinasi Sampel**

Determinasi tanaman bertujuan untuk mendapatkan ciri-ciri morfologi pada tanaman secara makroskopis dengan mengacu pada buku yang dibuktikan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) di Tawangmangu.

### **3.7.3 Pembuatan ekstrak etanol daun adas (*Foeniculum vulgare* Mill)**

#### **a. Sortasi Ekstrak**

Daun adas (*Foeniculum vulgare* Mill) sebanyak 1000 gram kemudian disortasi kering (telah dibersihkan dari kotoran) dan disortasi basah (dicuci dengan air mengalir), kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40 °C sampai kering. Sampel yang telah dikeringkan lalu diblender kemudian diayak dengan nomor 40 *mesh*, disimpan dalam toples dan sampel siap diekstraksi.

#### **b. Ekstraksi Sempel**

Serbuk daun adas kering yang sudah disortasi direndam dengan etanol 96% sebanyak 1:10 dalam maserator sambil diaduk tiap 1 jam, lalu didiamkan selama 3 hari dalam keadaan tertutup dan gelap kemudian disaring.

Maserat yang diperoleh diuapkan dengan *rotary evaporator* sampai didapat ekstrak kental, kemudian dihitung hasil rendemennya dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{—————}}{\text{—————}} \times 100\%$$

### 3.7.4 Uji Aktivitas Antibakteri

#### a. Penyiapan sampel

Persiapan sampel dimulai dengan menyiapkan tujuh seri konsentrasi ekstrak etanol daun adas (*Foeniculum vulgare* Mill). Seri konsentrasi yang dibuat yaitu, 5%, 10% dan 15%, 25%, 50%, 75%, dan 100%, masing-masing konsentrasi dibuat sebanyak 1 ml pada *Eppendorf* dan dilakukan replikasi sebanyak tiga kali. Metode yang digunakan yaitu *disk diffusion* (metode kertas cakram). Sebagai kontrol positif menggunakan antibiotik gentamicine 1% dan sebagai kontrol negatif menggunakan larutan DMSO 1%.

#### b. Sterilisasi alat dan media

Sterilisasi alat dan media *Nutrient Agar* (NA) dengan menggunakan *autoclav* pada suhu 121°C dalam waktu 30 menit. Peralatan gelas yang digunakan untuk penelitian disterilisasi menggunakan oven pada suhu 180°C selama 2 jam.

c. Preparasi sampel dalam media agar Nutrient Agar

Prosedur kerja uji diameter zona hambat yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar kertas cakram yang telah berisi konsentrasi masing-masing ekstrak etanol daun adas (*Foeniculum vulgare* Mill). Dilanjutkan dengan uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM). Proses ini digunakan untuk menentukan konsentrasi yang masih efektif untuk mencegah pertumbuhan patogen dan mengindikasikan dosis antibiotik yang efektif dalam mengontrol infeksi pada pasien. KHM dapat ditentukan dengan prosedur tabung dilusi.

d. Preparasi sampel dalam media agar dilusi

Prosedur kerja KHM yaitu dengan membuat seri konsentrasi ekstrak etanol daun adas (*Foeniculum vulgare* Mill) yang terdiri dari tujuh tabung reaksi dengan interval pengenceran dua kali dan dimasukkan secara aseptis 1 ml aquades kedalam, tiap-tiap tabung kecuali tabung pertama. Konsentrasi 100% dimasukkan kedalam tabung pertama, selanjutnya konsentrasi yang akan dibuat yaitu 75%, 50%, 25%, 15%, 10%, dan 5% dimasukkan 1 ml larutan ekstrak etanol daun adas (*Foeniculum vulgare* Mill) ketabung dua dan dikocok kemudian dari tabung kedua diambil 1 ml dan dimasukkan kedalam tabung ketiga, dari tabung ketiga



diambil 1 ml, dimasukkan kedalam tabung keempat dan begitu seterusnya sampai tabung ketujuh diambil 1 ml. Dari tabung ketujuh diambil 1 ml dan dibuang ditambah 1 ml suspensi bakteri yang telah disesuaikan dengan standart Brown II dan telah diencerkan 1: 1000 kali pada semua tabung dari satu sampai tujuh diinkubasi selama satu hari pada suhu ruang 37 °C diamati kekeruhannya, kemudian ditentukan KHMnya. Selanjutnya diuji pada media *Potato Sucrosa Agar* (PSA) secara goresan. KHM bakteriosida ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada media *Potato Sucrosa Agar* (PSA).

### **3.8 Analisa Data**

Data-data hasil penelitian ini diukur dengan pendekatan :

1. Data-data parameter hasil uji ekstrak etanol daun adas dan uji aktivitas antibakteri dibandingkan dengan yang ada dalam referensi standard.
2. Data analisis dengan pendekatan statistik anava satu jalan dan uji t dengan taraf kepercayaan 95%.