

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai dengan April 2017 di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Teknologi Kimia Industri Medan.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu saringan, cawan petri, *beaker glass*, gelas ukur, spatula, pipet tetes, kawat ose, kapas lidi, kertas saring, satu set tabung reaksi, rak tabung, corong *buchner*, penangas, kertas label, cawan porselin, pinset, *blank disc*, lampu bunsen, jangka sorong dan alat dokumentasi.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium*), media *Nutrien Agar* (NA) dan media *Muller Hilton Agar* (MHA). Bahan kimia yang digunakan antara lain adalah aquades, pelarut etil asetat dan pelarut DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*). Bakteri uji yang digunakan adalah *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

#### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian bersifat eksperimental dengan menggunakan data kuantitatif. Dengan konsentrasi ekstrak yang digunakan yaitu 20%, 40%, 60% dan 80%, serta kontrol (0%) dengan ulangan sebanyak lima kali. Parameter yang diamati adalah diameter zona hambat yang terbentuk oleh masing-masing konsentrasi ekstrak.

### **3.4 Prosedur Kerja**

#### **3.4.1 Preparasi Sampel**

Sampel buah andaliman dibersihkan dan dikeringkan menggunakan cahaya matahari. Sampel kemudian dihaluskan dan ditimbang sebanyak 200 gram, lalu disaring menggunakan saringan berukuran 40 mesh.

#### **3.4.2 Ekstraksi Senyawa Aktif Andaliman**

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut etil asetat terhadap 200 gram simplisia buah andaliman dalam 800 ml pelarut etil-asetat selama 3x24 jam. Hasil maserasi disaring menggunakan corong *buchner* dan kertas saring, kemudian ekstrak dipisahkan menggunakan penangas untuk memperoleh ekstrak kasar etil asetat.

#### **3.4.3 Pembuatan Suspensi Uji**

Pembuatan suspensi uji yaitu dengan mengambil koloni murni *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang sudah dikultur murni pada media *Nutrient Agar* (NA). Masing-masing satu ose bakteri biakan di suspensi didalam tabung reaksi, ditambahkan 10 ml aquades dengan tingkat kekeruhan  $10^8$  CFU.

#### **3.4.4 Uji Antibakteri**

Ekstrak buah andaliman dibuat konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80% serta kontrol (0%) dengan pengenceran digunakan pelarut DMSO. Suspensi biakan menggunakan kapas lidi steril dimasukkan kedalam tabung inokulum suspensi bakteri. Kapas lidi kemudian dioleskan secara merata pada permukaan media *Multi Hilton Agar* (MHA). Selanjutnya *blank disc* dimasukkan kedalam masing-masing konsentrasi ekstrak buah andaliman selama beberapa detik lalu langsung

diletakkan diatas permukaan media MHA sesuai dengan konsentrasinya. Setelah itu media diinkubasi pada suhu ruang selama 1x24 jam.

#### **3.4.5 Pengukuran Diameter Zona Hambat**

Pengukuran diameter zona hambat ekstrak terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yaitu dengan melihat zona hambat pada diameter *disc* masing-masing konsentrasi. Jika terbentuk zona hambat disekitar *disc*, maka mengindikasikan bahwa ekstrak buah andaliman dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Menurut metode *Kirby-baurier of Susceptibility Test*, diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong.

#### **3.5 Analisis Data**

Data yang diperoleh dari hasil penelitian adalah diameter zona hambat masing-masing konsentrasi ekstrak buah andaliman terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Data yang diperoleh akan dianalisis secara statistik menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan lima perlakuan dan lima ulangan.

Uji hipotesis dilakukan dengan analisis sidik ragam atau ANOVA dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) untuk mengetahui konsentrasi terbaik ekstrak etil asetat buah andaliman dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.