BAB 3
METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis penelitian eksperimental. Penelitian eksperimental diartikan sebagai metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap yang lain dalam kondisi terkendali (Sugiono, 2010). Penelitian meliputi penyiapan bahan, determinasi tumbuhan, pembuatan ekstrak, memfraksinasi ekstrak, dan uji aktivitas antibakteri hasil fraksinasi ekstrak buah pare. Metode pengujian antibakteri yang digunakan adalah difusi cakram.

3.2. Definisi Operasional

Definisi operasional adalah mendefinisikan variabel secara operasional berdasarkan karakteristik yang diamati, memungkinkan peneliti untuk melakukan observasi atau pengukuran secara cermat terhadap suatu objek atau fenomena. Definisi operasional ditentukan berdasarkan parameter yang dijadikan ukuran dalam penelitian. Sedangkan cara pengukuran merupakan cara dimana variabel dapat diukur dan ditentukan karakteristiknya (Hidayat, 2007).

Definisi operasional penelitian disajikan dalam tabel sebagai berikut :

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Devinisi Operasional	Parameter	Alat Ukur	Kategori
1.	Uji aktivitas antibakteri hasil fraksinasi ekstrak buah pare (*Momordica charantia L*)	Mengukur potensi aktivitas daya hambat suatu senyawa pada buah pare (*Momordica charantia* L) terhadap bakteri *Bacillus subtilis*	Zona hambat	Penggaris (mm)	1. Lemah = ≤ 5 mm 2. Sedang = 6 – 10 mm 3. Kuat = 11 – 20 mm 4. Sangat kuat = > 20 mm

3.3. Populasi, Sampel, dan Sampling

3.3.1. Populasi

Populasi adalah wilayah generalisasi yang terdiri atas : obyek/ subyek yang mempunyai kualitas dan karakteristik tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk kemudian dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya (Sugiyono, 2010). Populasi dalam penelitian ini adalah buah pare (*Momordica charantia* L) yang diambil dari perkebunan buah pare di Kandangan Kalimantan Selatan.

3.3.2. Sampel

Sampel adalah bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi tersebut (Sugiyono, 2010). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia dari buah pare yang berat nya 300 gr dan dimaserasi dengan etanol 96% lalu ekstraknya difraksinasi dengan etil asetat : aquadest (1:1 v/v), dan hasil fraksinasi diambil sebagai sampel percobaan.

3.3.3. Sampling

Teknik sampling adalah merupakan teknik pengambilan data untuk menentukan sampel yang akan digunakan dalam penelitian, terdapat berbagai teknik sampling yang digunakan (Sugiyono, 2010). Sampling yang digunakan dalam penelitian ini adalah *purposive sampling*.

3.4. Tempat dan Waktu Penelitian

3.4.1. Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Banjarmasin.

3.4.2. Waktu

Waktu penelitian dilakukan bulan November 2017 sampai bulan Mei tahun 2018.

3.5. Alat Pengumpulan Data

3.5.1. Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut : Lemari pendingin, inkubator, neraca analitik, oven, autoklaf, botol kaca, corong pisah, mikro pipet, alumunium foil, cawan petri, jangka sorong, alat-alat gelas (tabung reaksi, beker glass, gelas ukur, corong dan erlenmayer), jarum ose, lampu bunsen dan kertas cakram.

Sebanyak 300 gr simplisia buah pare (*Momordica charantia L*) diekstraksi menggunakan etanol 96% sebanyak 2 L, kemudian direndam selama 7 hari sambil sesekali dikocok, saring kemudian ampasnya diremaserasi kembali dengan 250 ml etanol 96% selama 1 hari. Setelah itu disaring dan diuapkan, setelah itu masukkan ekstrak kedalam corong pisah ditambahkan larutan metanol : n-hexan (1:1 v/v) gojok sampai terbentuk larutan terpisah, ambil larutan dibagian atas (metanol) setelah itu difraksinasi kembali meggunakan etil asetat : aquadest (1:1 v/v) gojog sampai kedua larutan terpisah, lalu ambil larulan yang diatas (etil asetat). Setelah itu media agar dituang kedalam cawan petri steril kemudian diberi segel dan diberi nomor 1-5 sebagai tanda untuk kertas cakram. Nomor 1 yaitu tandan untik kontrol positif (Amoxisillin), 2-4 untuk hasil fraksinasi ekstran etanol buah pare dengan masing-masing konsentrasi 10%, 25%, 50% dan nomor 5 untuk kontrol negatif (etil asetat). Selanjutnya 0,1 ml inokulom dimasukkan kedalam cawan petri, diratakan menggunakan cotton bud agar media agar dan suspense bakteri tercampur rata. Setelah itu, cakram kertas yang telah ditetesi dengan sejumlah sampel dan pelarut ditempatkan pada medium padat yang sebelumnya telah diinokulasi bakteri uji pada permukaannya. Setelah diinkubasi, dilakukan pengukuran diameter zona hambat disekitar zona cakram. Memiliki aktivitas antibakteri jika timbul zona bening. Sedangkan jika tidak memiliki aktivitas antibakteri tidak timbul zona bening.

3.5.2. Reagenasi

Reagen dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut : Buah pare (*Momordica charantia* L), Etanol 96%, Etil Asetat, Metanol, n-heksan, Aquadest, NaCl, Bakteri *Bacillus subtilis.* Nutrien Agar, Kapas Berlemak dan Amoxsisillin.

3.6. Teknik Pengambilan Data

3.6.1. Teknik Pengambilan Data

Teknik pengambilan data dalam penelitian ini adalah dengan menggunakan uji labolatorium

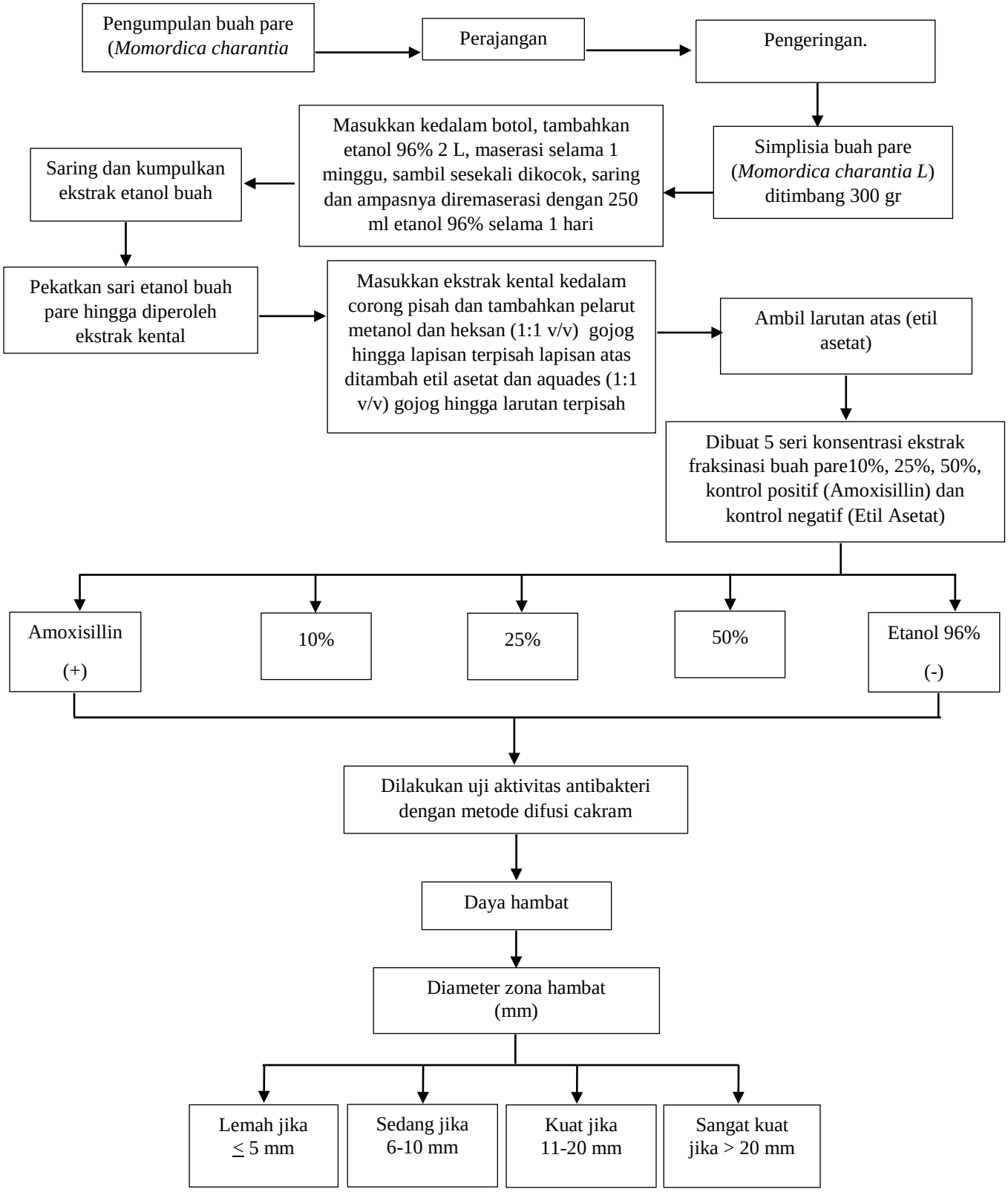
3.6.2. Pemeriksaan Laboratorium

Ekstraksi buah pare menggunkan metode maserasi, untuk metode fraksinasi yang digunakan adalah metode ekstrasi cair-cair dan uji aktivitas antibakteri dari hasil fraksinasi ekstrak buah pare menggunakan metode difusi cakram.

3.6.2.1. Prinsip

a. Ekstrak etanol buah pare diambil dengan cara maserasi
b. Hasil fraksinasi diambil dengan cara ekstrak cair-cair
c. Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram

3.6.2.2. Prosedur Kerja



Gambar 3.1 Skema Kerja

a. Pembuatan Ekstrak Dengan Metode Maserasi

Sebanyak 300 gr serbuk simplisia buah pade dimasukkan ke dalam botol kaca, kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 2 L. Rendam simplisia selama 1 minggu sambil sesekali di aduk, saring kemudian ampasnya diremaserasi kembali dengan 250 ml etanol 96% selama 1 hari. Setelah itu ekstrak disaring dan diuapkan hingga menjadi ekstrak kental.

b. Fraksinasi Ekstrak Buah Pare

Ekstrak kental yang didapat dimasukkan kedalam corong pisah kemudian tambahkan pelarut metanol dan heksan (1:1 v/v) gojog gingga terbentuk larutan yang terpisah, ambil lapisan larutan atas (metanol). Filtrat ditambahkan etil asetat dan aquadest (1:1 v/v), gojog gingga terbentuk larutan yang terpisah, ambil lapisan larutan yang diatas (etil asetat) (Dellyna dkk, 2014).

c. Uji Aktivitas Antibakteri

1) Pembuatan Media Agar

Ditimbang nutrien agar sebanyak 14 gr kemudian disuspensikan dengan aquadest hingga 500 ml. Kemudian disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit (Sari, 2015).

2) Pembuatan Antibiotik Sebagai Kontrol Positif

Ditimbang amoxisillin sebanyak 1,5 mg kemudian diencerkan dengan aquadest sebanyak 50 ml (Sari, 2015).

3) Pembuatan Larutan NaCl

Ditimbang NaCl sebanyak 900 mg kemudian diencerkan dengan aquadest sebanyak 100 ml. Setelah itu disterilkan dengan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit (Sari, 2015).

4) Pembuatan Media Agar Dalam Tabung Reaksi

Kedalam tabung reaksi dimasukan media nutrien agar yang sudah disterilisasi, kemudian didiamkan pada suhu kamar ditunggu hingga sediaan membeku pada posisi miring kemudian disimpan dalam lemari pendingin (Sari, 2015).

5) Pembiakan Bakteri

a) Pembuatan Stok Kultur

Diambil koloni bakteri *Bacillus subtilis* dengan menggunakan jarum ose yang disterilisasikan debgan lampu bunsen, kemudian ditanamkan pada media nutrien agar miring dengan cara menggoreskan, setelah itu diinkubasi dalam inokubator pada suhu $\pm$ 35° C selama 18–24 jam (Sari, 2015).

b) Penyimpanan Inokolum

Diambil stok kultur bakteri *Bacillus subtilis* dengan menggunakan jarum ose yang sudah disterilisasi kemudian disuspensikan dalam ampul yang berisi larutan NaCl 0.9 sampai diperoleh kekeruhan yang sama dengan larutan standar Mc. Farland dimana konsentrasi bakteri 1,5X10CFU/ml (Sari, 2015).

6) Sterilisasi Alat

Alat-alat disterilisasi pada suhu yang berkisar antara 110°-121° C seperti cawan petri, tip, tabung reaksi, cotton bud, media agar, disterilkan terlebih dahulu dengan alat autoklaf pada sudu 121^0C selama 15 menit. Jarum ose dibakar dengan lampu bunsen (Sari, 2015).

3.6.2.3. Uji Aktivitas Antibakteri Hasil Fraksinasi Ekstran Etanol Buah Pare

Media agar dituang kedalam cawan petri steril kemudian diberi segel dan diberi nomor 1-5 sebagai tanda untuk kertas cakram. Nomor 1 yaitu untuk kontrol positif (Amoxisillin), Nomor 2-4 tanda untuk hasil fraksinasi ekstrak buah pare dengan konsentrasi masing-masing konsentrasi 10%, 25%, 50% dan nomor 5 tanda untuk kontrol negatif (Etil Asetat). Selanjutnya 0,1 ml inokulom dimasukkan kedalam cawan petri, diratakan menggunakan cotton bud agar media dan suspensi bakteri tercampur rata. Setelah itu, cakram kertas yang telah ditetesi dengan sejumlah ekstrak dan pelarut ditempatkan pada medium padat yang sebelumnya telah diinokulasi bakteri uji pada permukaannya. Setelah diinkubasi, dilakukan untuk mengukur kekuatan hambatan dari obat terhadap mikroorganisme uji (Sari, 2015).

3.7. Analisa Data

Analisa data yang diperoleh :

Tabel 3.2 Tabel Analisa Data

Konsentrasi	**Rata-rata Diameter Zona Hambat (mm)**	**Kategori**
10%		
25%		
50%		
Kontrol (+)		
Kontrol (-)		

Keterangan :

Kontrol positif : Amoxisillin (30 ppm)

Ekstrak 10%-50% : Hasil fraksinasi ekstrak etanol buah pare

Kontrol negatif : Etanol (pelarut yang digunakan)

Zona hambat lemah : $\leq$ 5 mm

Zona hambat sedang : 6-10 mm

Zona hambat kuat : 11-20 mm

Zona hambat sangat kuat : > 20 mm

3.8. Etika Penelitian

Etika penelitian mencakup perilaku atau perlakuan penelitian terhadap subyek penelitian serta sesuatu yang dihasilkan oleh peneliti bagi masyarakat (Notoadmodjo, 2010). Menurut (Hidayat, 2007).

3.8.1. Tidak mengganggu atau merugikan orang lain yang bekerja pada tempat yang sama, seperti mematikan alat yang sedang digunakan orang lain jika percobaan maupun penelitian masih belum selesai.

3.8.2. Jangan mengganggu, membunuh, merusak organisme atau bakteri yang sedang digunakan untuk percobaan orang lain. Baik yang melakukan praktikum, percobaan, penelitian di laboratorium yang membutuhkan waktu lama, sebaiknya berilah label pada sempel, misalnya “jangan diganggu”, agar organisme atau percobaan tidak diganggu orang lain.