

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental laboratorium. Metode penelitian dilakukan secara eksperimental bertujuan untuk mengetahui pengaruh variasi konsentrasi ekstrak dan waktu maserasi terhadap kemampuan ekstrak buah mengkudu untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada uji KHM. Dalam penelitian ini menggunakan metode difusi cakram untuk mengetahui zona hambat yang terbentuk, maka dapat ditentukan konsentrasi minimum ekstrak yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri tersebut.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2026 dengan tempat penelitian:

- 1) Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia Poltekkes Kesehatan Kemnkes Malang untuk proses ekstraksi.
- 2) Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang untuk pengujian konsentrasi hambat minimum.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan untuk pembuatan simplisia dan ekstraksi maserasi, yaitu pisau, telenan, mortar dan alu, neraca analitik (Radwag AS220R2), kaca arloji (Pyrex), spatula (Pyrex), toples maserasi, batang pengaduk (Pyrex), gelas ukur 100 mL (Pyrex), beaker glass 100 mL (Pyrex), beaker glass 2000 mL (Pyrex), cawan porselen, oven (memmert), grinder (Getra), mesh 40 μm (CBN), *rotary evaporator* (Heidolph), *waterbath* (Memmert).

Alat-alat yang digunakan untuk uji konsentrasi hambat minimum, yaitu neraca analitik, spatula, cawan petri, kapas, bunsen, pemantik api, *cotton swab*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, kaca arloji, beaker glass 100 mL, labu erlenmeyer 250 mL, magnetic stirrer, *hot plate*, mortar dan alu, kertas cakram, jarum ose, inkubator, gelas ukur 100 mL, pinset, *Laminar Air Flow* (LAF), inkubator, *autoclave*, oven, *waterbath*, dan vortex.

3.3.2 Bahan

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian, yaitu buah mengkudu (*Morinda citrifolia L.*), aquades, etanol 96%, bakteri *Staphylococcus aureus*, media *Mueller Hinton Agar* (MHA), DMSO (*Dimetil Sulfoksida*) 10%, larutan H_2SO_4 1%, larutan $BaCl$ 1%, antibiotik *Ciprofloxacin*, larutan NaCl fisiologis steril, kapas, dan aluminium foil.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi perlakuan terhadap konsentrasi ekstrak buah mengkudu dan waktu maserasi.

3.4.2 Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah nilai konsentrasi hambat minimum pada ekstrak buah mengkudu terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.5 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

No.	Nama Variabel	Definisi	Satuan dan Alat Pengukuran	Skala Data
1.	Konsentrasi ekstrak buah mengkudu	Konsentrasi ekstrak buah mengkudu yang digunakan sebagai perlakuan uji antibakteri	Presentase (%)	Interval
2.	Waktu maserasi	Lama waktu perendaman buah mengkudu dalam pelarut pada proses maserasi	Jam atau hari	Rasio
3.	Diameter zona hambat	Diameter zona bening di sekitar cakram yang menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	Milimeter (mm), pengukuran menggunakan penggaris	Rasio

3.6 Metode Penelitian

3.6.1 Pengambilan sampel

Teknik pengambilan sampel yang dilakukan adalah purposive sampling. Purposive sampling adalah teknik pengambilan sampel menggunakan subjek berdasarkan kriteria tertentu yang relevan dengan kebutuhan penelitian (Andriani *et al.*, 2025). Sampel buah mengkudu diperoleh dari pekarangan rumah yang berada di daerah Pandaan, Kabupaten Pasuruan.

3.6.2 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat yang tahan panas dilakukan menggunakan oven pada suhu 170°C selama 1 jam. Alat yang tidak tahan panas disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.6.3 Preparasi Sampel

Pengambilan sampel buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dilakukan menggunakan golok dengan memilih buah yang telah matang dan segar. Selanjutnya, buah dicuci menggunakan air mengalir hingga bersih, lalu dikupas kulitnya, dipotong tipis-tipis, dan dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C. Buah yang telah kering diblender hingga menjadi serbuk halus dan diayak dengan ayakan 40 mesh untuk memperoleh serbuk simplisia. Serbuk simplisia ditimbang dan diteruskan dengan metode maserasi (Antara *et al.*, 2014).

3.6.4 Pembuatan Ekstrak Sampel Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.)

Pembuatan ekstrak buah mengkudu dilakukan dengan metode ekstraksi maserasi. Metode ini digunakan untuk mengekstraksi buah mengkudu. Berikut adalah proses maserasi yang dilakukan:

1. Simplisia kering buah mengkudu sebanyak 50 g direndam ke dalam pelarut etanol 96% sebanyak 500 mL (1:10) dan didiamkan selama 1x24 jam dalam suhu kamar. Larutan ekstrak disaring untuk memisahkan ampas dan filtrat. Selanjutnya, hasil filtrat dievaporasi dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental (Malinggas *et al.*, 2015). Selanjutnya ekstrak kental dibuat dengan konsentrasi 40%, 60%, dan 80% dengan melarutkan masing-masing 0,4 g, 0,6 g, dan 0,8 g ekstrak ke dalam 3 mL DMSO 10% (Rizki *et al.*, 2021).

2. Simplisia kering buah mengkudu sebanyak 50 g direndam ke dalam etanol 96% sebanyak 500 mL (1:2) dan didiamkan selama 3x24 jam dalam suhu kamar. Setiap 24 jam ekstrak disaring dan diganti dengan pelarut etanol yang baru. Remaserasi dilakukan sebanyak 3 kali maserasi, selanjutnya disaring untuk memisahkan ampas dan filtrat. Kemudian filtrat dari hari ke-1 sampai ke-3 disatukan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C, lalu diuapkan di *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental (Anggraeni, 2023). Selanjutnya ekstrak kental dibuat dengan konsentrasi 40%, 60%, dan 80% dengan melarutkan masing-masing 0,4 g, 0,6 g, dan 0,8 g ekstrak ke dalam 3 mL DMSO 10% (Rizki *et al.*, 2021).

3.6.5 Pembuatan Media MHA (Mueller Hinton Agar)

Media MHA (*Mueller Hinton Agar*) ditimbang sebanyak 9,5 g, kemudian dilarutkan dalam 250 mL aquadest. Media dipanaskan hingga homogen dan disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Media dibiarkan dingin pada suhu kurang dari 50°C, selanjutnya dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 20 mL. Proses penuangan media dilakukan di dalam LAF (*Laminar Air Flow*). Setelah itu, media MHA ditunggu hingga memadat (Mayaserli dan Shinta, 2021).

3.6.6 Pembuatan Larutan McFarland 0,5

Larutan *McFarland* dipakai sebagai standar kekeruhan suspensi bakteri uji. Larutan *McFarland* 0,5 dibuat dengan memipet larutan H_2SO_4 1% sebanyak 9,95 mL dan dituangkan ke dalam tabung reaksi. Tambahkan larutan $BaCl_2$ 1% sebanyak 0,05 mL, lalu dimasukkan ke dalam tabung yang berisi H_2SO_4 1%. Selanjutnya, dikocok sampai homogen dan terlihat keruh (Anggraeni, 2023).

3.6.7 Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan cara biakan bakteri diambil menggunakan jarum ose lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL larutan $NaCl$ 0,9% dan dikocok hingga homogen, kemudian disesuaikan dengan standar kekeruhan McFarland. Jika suspensi yang terbentuk kurang keruh, maka menambahkan koloni, sedangkan jika terlalu keruh, maka harus ditambahkan larutan $NaCl$ 0,9% (Budiharjo *et al.*, 2015).

3.6.8 Penanaman Pada Media MHA

Cotton swab dicelupkan ke dalam suspensi bakteri yang telah distandarisasi kekeruhannya. Kemudian diangkat dengan menekan pada dinding tabung untuk mengurangi kelebihan cairan. *Cotton swab* digoreskan secara merata pada permukaan agar dengan memutar cawan petri. Media dibiarkan selama 5-15 menit agar suspensi bakteri dapat meresap ke dalam agar (Mayaserli dan Shinta, 2021).

3.6.9 Pembuatan Kontrol Positif

Larutan kontrol positif dibuat dari tablet *Ciprofloxacin* 500 mg. Satu tablet *Ciprofloxacin* digerus, kemudian ditimbang sebanyak 0,05 g dan dilarutkan dalam 50 mL akuades. Dari larutan tersebut, diambil 1 mL, lalu ditambahkan akuades hingga 10 mL, sehingga diperoleh larutan *Ciprofloxacin* dengan konsentrasi $\frac{1\mu g}{10\mu l}$ (Sakul *et al.*, 2020).

3.6.10 Uji Difusi Cakram

Tahap pengujian metode difusi cakram dilakukan dengan 2 replikasi dengan menyiapkan dua cawan petri yang berisi media MHA. Pada setiap cawan yang sudah diinokulasikan bakteri, kemudian cawan petri pertama berisi 4 kertas cakram yaitu konsentrasi 40%, 60%, dan 80% dengan waktu maserasi selama 1x24 jam serta kertas cakram kontrol positif. Cawan kedua berisi 4 kertas cakram yaitu konsentrasi 40%, 60%, dan 80% dengan waktu maserasi selama 3x24 jam serta kertas cakram kontrol positif. Semua cawan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Mayaserli dan Shinta, 2021).

3.6.11 Pengamatan dan Pengukuran

Pertumbuhan mikroba diamati setelah proses inkubasi. Zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram, dilakukan pengukuran menggunakan penggaris dengan cara mengukur diameter horizontal dan diameter vertikal. Selanjutnya, hasil pengukuran tersebut dikurangi dengan diameter cakram 6 mm. Sebagai pembanding digunakan kertas cakram kontrol positif antibiotik *Ciprofloxacin* untuk bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.7 Pengolahan dan Analisis Data

3.7.1 Pengolahan Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah zona hambat minimum dari ekstrak buah mengkudu terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Penyajian data pada penelitian ini dalam bentuk tabel.

Tabel 3. 2 Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat dan Uji ANOVA

Waktu Maserasi	Konsentrasi Ekstrak	Hasil Pengukuran (cm)				Diameter Zona Hambat (mm)		Rata-rata (mm)	Sig
		Replikasi 1		Replikasi 2					
		x	y	x	y	1	2		
24 jam	40%								
	60%								
	80%								
	Kontrol positif								
72 jam	40%								
	60%								
	80%								
	Kontrol positif								

Keterangan:

X (horizontal)

Y (Vertikal)

3.7.2 Analisis Data

Data hasil pengujian dianalisis secara deskriptif, selanjutnya diolah menggunakan SPSS dengan uji ANOVA. Pengambilan kesimpulan dilakukan dengan melihat nilai signifikansi. Jika nilai signifikansi lebih kecil dari 0,05, maka terdapat perbedaan yang signifikan antar perlakuan sehingga analisis dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan.