

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni s.d Agustus 2013 di laboratorium Patologi, Entomologi dan Mikrobiologi Fakultas Pertanian dan Peternakan UIN SUSKA RIAU.

#### **B. Alat dan Bahan**

##### **1. Alat**

Pisau, blender, toples maserasi, oven, corong pisah, Erlenmeyer, Destilasi, tabung reaksi, shaker, *Laminar Air Flow (LAF)*, inkubator, cawan petri, *bunsen burner*, jarum ose, mikropipet, Kertas cakram, Penggaris, cawan petri.

##### **2. Bahan**

Etanol, ekstrak daun pandan (*Pandanus amaryllifolius*), kertas saring, Tetraciklin, media *Natrium Klorida* (NaCl), media *Nutrient Agar* (NA), kultur murni bakteri *Bacillus cereus* dan bakteri *Escherichia coli* yang didapatkan dari laboratorium Biokimia Universitas Riau Pekanbaru.

#### **C. Cara Kerja**

## 1. Ekstraksi Pandan

Sebanyak 1 kg daun pandan, di cuci dan ditiriskan. Kemudian daun pandan di potong-potong kecil, potongan tersebut di jemur di ruangan sampai benar-benar kering. Setelah kering, potongan tersebut dihancurkan dengan blender agar jadi serbuk (*Simplisia*). *Simplisia* yang dihasilkan di timbang sebanyak 200 g kemudian di maserasi (Perlakuan maserasi yaitu dengan cara merendam *simplisia* ke dalam pelarut etanol 96% 600 ml (1:3) selama 1 hari, kemudian di saring dengan kertas penyaring).

Residu/ampasnya kembali di maserasi lagi, dengan cara yang sama sampai pelarutnya jernih. Ekstrak maserasi/filtrat yang dihasilkan di tampung menjadi satu dan diuapkan dengan menggunakan alat Destilasi pada suhu 45-50°C sampai pelarut habis menguap, sehingga dihasilkan ekstrak kental daun pandan.

## 2. Pembuatan Variasi Konsentrasi Ekstrak Daun Pandan

Ekstrak kental daun pandan di buat 5 seri konsentrasi (10%, 20%, 30%, 40% dan 50%) dengan menggunakan etanol.

a. Persiapan ekstrak etanol daun pandan 50%

2,25 mL ekstrak kental daun pandan dilarutkan dalam 4,5 mL etanol dalam tabung reaksi.

b. Persiapan ekstrak etanol daun pandan 40%

1,84 mL ekstrak kental daun pandan dilarutkan dalam 4,6 mL etanol dalam tabung reaksi.

c. Persiapan ekstrak etanol daun pandan 30%

1,41 mL ekstrak kental daun pandan dilarutkan dalam 4,7 mL etanol dalam tabung reaksi.

d. Persiapan ekstrak etanol daun pandan 20%

0,96 mL ekstrak kental daun pandan dilarutkan dalam 4,8 mL etanol dalam tabung reaksi.

e. Persiapan ekstrak etanol daun pandan 10%

0,49 mL ekstrak kental daun pandan dilarutkan dalam 4,9 mL etanol dalam tabung reaksi.

Hasil seri konsentrasi tersebut seperti ditunjukkan pada tabel berikut:

**Tabel 3.1. Pembuatan konsentrasi gram ekstrak daun pandan**

Konsentrasi (% v/v)	Ekstrak daun pandan (mL)
10	0,49
20	0,96
30	1,41
40	1,84
50	2,25

### **3. Persiapan Alat dan Bahan Uji**

- a. Semua peralatan seperti cawan petri, tabung reaksi, Erlenmeyer, kertas cakram, pipet, Kaca batang L, kertas cakram, disterilisasikan dengan menggunakan oven selama 2 jam pada suhu 170°C dan tekanan 1 atm.

- b. Medium yang digunakan akan disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C<sup>1</sup>

#### **4. Pembuatan Media**

##### **a. Pembuatan Medium NA (*Nutrient Agar*)**

Medium NA sebanyak 8 gram dilarutkan dalam 1 liter aquades. Larutan diaduk hingga homogen. kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 5 mL dan ditutup dengan kapas dan aluminium foil untuk disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm.

##### **b. Pembuatan Larutan Natrium Klorida 0,9%**

Sebanyak 9 g NaCl ditimbang dan dilarutkan dengan air suling, dimasukkan dalam labu ukur 1000 ml sampai larut sempurna, ditambahkan air suling sampai batas labu, dimasukkan dalam Erlenmeyer steril yang tertutup, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit.

#### **5. Uji Aktivitas Antibakteri**

##### **a. Regenerasi Bakteri Uji**

Sebelum dipakai dalam uji antibakteri, bakteri yang akan dipakai setiap kali harus diregenerasi terlebih dahulu. Langkah pertama yang dilakukan adalah membuat biakan agar miring yaitu menggoreskan biakan dari stok bakteri ke media *Natrium Agar* (NA) miring. Kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

---

<sup>1</sup> Debi A. Mpila. "Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mayana (*coleus atropurpureus* [L] benth) terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *pseudomonas aeruginosa* secara *in-vitro*" Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado

biakan bakteri ini merupakan aktivitas awal dari stok bakteri yang dapat disimpan pada suhu 4-5°C.

#### **b. Uji aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Pandan**

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi dengan menggunakan kertas cakram. Pemiakan murni bakteri *Bacillus cereus* dan *Escherichia coli* masing-masing digores 1 ose dan ditumbuhkan dalam Erlenmeyer yang berisi 10 ml media NaCl. Kultur bakteri dalam media NaCl ini di inkubasi pada suhu ruang dengan menggunakan Inkubator bergoyang. Setelah itu dari biakan tersebut diambil sebanyak 100 µL.

Kemudian dimasukkan kedalam cawan petri yang telah steril, lalu dituang 20 mL media Padat NA. Selanjutnya Kertas cakram dengan diameter 6 mm dicelupkan dalam Etanol 96 %, Tetrasiklin 500 mg, serta 5 seri ekstrak etanol daun pandan dengan konsentrasi 50 µL. Lalu kertas cakram tersebut dikering anginkan hingga cairan tidak menetes lagi. Kemudian dimasukkan kedalam cawan petri yang telah berisi media dan biakan tersebut, lalu di inkubasi selama 12-18 jam pada suhu 37°C dalam inkubator.

Hasil inkubasi akan menunjukkan adanya koloni bakteri uji dan zona bening di sekitar kertas, yang menandakan adanya efek penghambatan larutan uji terhadap bakteri uji. Zona bening yang ada merupakan zona hambat yang dapat di ukur dengan menggunakan Penggaris.

