

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis Penelitian**

Penelitian ini termasuk dalam penelitian eksperimen murni (*Pure Eksperimen*) pada skala laboratorium, dengan memberikan perlakuan (*treatment*) terhadap objek penelitian serta adanya kontrol penelitian.<sup>50</sup>

#### **B. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilaksanakan selama 2 bulan, yaitu pada bulan Desember 2014 sampai dengan Januari 2015. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Sel Dan Molekuler Fakultas Tarbiyah dan Ilmu Keguruan Program Studi Pendidikan Biologi Palangka Raya.

#### **C. Populasi dan Sampel Penelitian**

Populasi pada penelitian ini adalah semua mikroorganisme bakteri *Staphylococcus aureus*. Sedangkan sampel penelitian adalah sebagian dari *Staphylococcus aureus* yang ditumbuhkan pada 25 medium lempeng NA di Laboratorium Mikrobiologi IAIN Palangka Raya.

---

<sup>50</sup>Yayu Srirahayu, *Isolasi Pemurnian dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Sinensetin dari Ekstrak Daun Kumis Kucing (Otrhosiphonis aristatus)*, Jurusan Kimia, IPB 2003

#### D. Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini terdiri dari variabel bebas dan variabel terikat. Sebagai variabel bebas adalah perlakuan konsentrasi ekstrak daun Inai (*Lawsonia inermis* L.) sedangkan variabel terikatnya adalah pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

#### E. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), karena faktor kondisi lingkungan dapat diseragamkan (homogen), kecuali faktor perlakuan yang diberikan. Oleh karena dasar teoritis dan jarak tingkat perlakuan belum ada, berdasarkan hasil uji pendahuluan pada umur 1x24 jam dengan konsentrasi 80% terlihat bahwa zona bening yang tampak berjarak 4,97 mm, daerah yang tampak tersebut merupakan zona bening terluas dari hasil uji pendahuluan yang telah dilakukan. Maka dari itu berdasarkan teori perancangan himpunan perlakuan bahwa perlakuan yang diperkirakan berpengaruh paling baik selaras dengan hipotesis yang diajukan sebelum penelitian harus diletakkan diantara minimal dua perlakuan lain yang bertaraf lebih rendah dan lebih tinggi, tetapi diperkirakan mempunyai pengaruh kurang baik dibanding perlakuan hipotesis tersebut.<sup>51</sup> Oleh sebab itu rentangan dan taraf perlakuan konsentrasi ekstrak

---

<sup>51</sup>Kemas Ali Hanafiah, *Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi*. Jakarta: Rajawali Pers, 2010, h. 6

daun inai (*Lawsonia inermis* L) pada penelitian ini disusun menjadi 5 taraf, yaitu :

S<sub>0</sub> = Akuades steril tanpa ekstrak daun Inai 0 %.

S<sub>1</sub> = Ekstrak daun Inai dengan konsentrasi 60 %.

S<sub>2</sub> = Ekstrak daun Inai dengan konsentrasi 70 %.

S<sub>3</sub> = Ekstrak daun Inai dengan konsentrasi 80 %.

S<sub>4</sub> = Ekstrak daun Inai dengan konsentrasi 90 %.

Jumlah ulangan ditentukan berdasarkan rumus federer:  $(t-1)(r-1) \geq 15$ , dimana t adalah perlakuan dan r adalah ulangan.<sup>52</sup> Berdasarkan hasil perhitungan diperoleh jumlah ulangan sebanyak 5 kali, sehingga total unit penelitian ini adalah 5 taraf x 5 ulangan = 25 unit. Tujuan dilakukannya ulangan ini yaitu untuk memperkecil terjadinya tingkat kesalahan yang akan terjadi. Adapun perhitungan ulangan adalah sebagai berikut:

$$(t - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$(5 - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$4(r - 1) \geq 15$$

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 15 + 4$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq \frac{19}{4}$$

$$r \geq 4,75 = 5$$

---

<sup>52</sup>Kemas Ali Hanafiah, *Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi*. Jakarta: Rajawali Pers, 2010, h.9

## F. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Alat-alat yang digunakan adalah:

**Tabel 3.1 Alat yang digunakan dalam penelitian**

No.	Nama Alat	Jumlah
1	Mikropipet	2 buah
2	Hand sprayer 200 ml	1 buah
3	Labu Erlenmeyer 150 ml	5 buah
4	Beaker glass 50 ml	9 buah
5	Beaker glass 200 ml	2 buah
6	Beaker glass 500 ml	2 buah
7	Labu Erlenmeyer 500 ml	5 buah
8	Gelas ukur 25 ml	2 buah
9	Gelas ukur 100 ml	2 buah
10	Saputangan	5 buah
11	Inkubator	1 buah
12	Pisau	2 buah
13	Pengaduk kaca	2 buah
14	Cawan petri	30 buah
15	Jarum inokulasi berkelong	4 buah
16	Jangka sorong	1 buah
17	Tabung reaksi	4 buah
18	Lampu spiritus	2 buah
19	Panci	2 buah
20	Autoklap	1 buah
21	Pinset	2 buah
22	Oven	1 buah
23	Kulkas	1 buah
24	Timbangan	1 buah
25	Blender	1 buah
26	Korek api	1 buah
27	Kompor	1 buah
28	LAF	1 buah
29	Hot Plate Stirer	1 buah
30	Gunting	2 buah
31	Baskom	2 buah
32	Saringan/Penyaring	2 buah
<b>No</b>	<b>Alat</b>	<b>Jumlah</b>
33	Tabung reaksi pendek	5 buah

34	Gelas selai	4 buah
35	Tip mikropipet	4 buah
36	Pipet	5 buah
37	Termometer	2 buah
38	Nampan	4 buah
39	Blender	1buah
40	Neraca digital	1buah

2. Bahan-bahan yang digunakan adalah:

**Tabel 3.2Bahan yang digunakan dalam penelitian**

No	Nama Bahan	Jumlah
1	Daun Inai ( <i>Lowsonia inermis</i> L.)	1 kg
2	Agar powder	5,47 gr
3	<i>Beef extract</i>	1,22 gr
4	<i>Becto peptone</i>	2,02 gr
5	Alcohol 90%	5000 ml
6	Aquades	2000 ml
7	Kapas	2 gulung
8	Vaselin	secukupnya
9	Kultur murni <i>Staphylococcus aureus</i>	1 tabung
10	Kertas saring	2lbr
11	Kasa	1 pak
12	Kertas kraf	3 lbr
13	Kertas temple	1pak
14	Alcohol 70 %	500 ml
15	Cotton buds	3 pak
16	Lysol	Secukupnya

### G. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data pada penelitian ini adalah teknik observasi langsung terhadap objek penelitian, melalui kegiatan pengukuran. Pengukuran data dilakukan berjumlah 25 cawan petri berumur 1 x 24 jam, 2 x 24 jam, 3 x 24 jam, dan 4 x 24 jam setelah pemberian perlakuan.

Data diambil pada semua unit penelitian, yaitu berupa hasil pengukuran lebar (dalam satuan mm) antara sisi terluar *paper disc* yang mengandung

ekstrak perlakuan dengan koloni *Staphylococcus aureus* di permukaan medium lempeng NA (*Nutrien Agar*). Hal ini yang diukur adalah jarak koloni tumbuh *Staphylococcus aureus* yang terdekat dengan *paper disc*.

## H. Teknik Analisis Data

Teknik analisis data yang digunakan untuk menguji hipotesis adalah analisis variansi (ANAVA) yang merupakan teknik analisis data yang menguji perbedaan rerata nilai dua sampel atau lebih. Langkah-langkah pengujian hipotesis menggunakan analisis variansi menurut Kemas Ali Hanafiah (2010) adalah sebagai berikut :

### 1. Menyusun data ke dalam tabel

Data yang dikumpulkan seluruhnya dimasukkan ke dalam Tabel 3.3 data hasil penelitian, seperti di bawah ini

**Tabel 3.3 Contoh Tabel Data Distribusi Pengamatan**

Perlakuan	Ulangan					Total	Rata-rata
	1	2	3	4	5		
S <sub>0</sub>							
S <sub>1</sub>							
S <sub>2</sub>							
S <sub>3</sub>							
S <sub>4</sub>							
<b>Total</b>							

**a) Menghitung faktor koreksi (FK) :**

$$\text{Faktor koreksi (FK)} = \frac{T_{ij}^2}{r \times t}$$

**b) Menghitung jumlah kuadrat (JK) :**

$$\text{JK Total} = T(Y_{ij}^2) - FK$$

$$\text{JK Perlakuan} = \frac{TA^2}{r} - FK$$

$$\text{JK Galat} = \text{JK}_{\text{Total}} - \text{JK}_{\text{Perlakuan}}$$

**c) Menghitung derajat bebas (db) :**

$$\text{Db}_{\text{Perlakuan}} = t - 1$$

$$\text{Db}_{\text{Galat}} = (rt - 1) - (t - 1)$$

$$\text{Db}_{\text{Total}} = rt - 1$$

**d) Menghitung kuadrat tengah (KT) :**

$$\text{KT}_{\text{Perlakuan}} = \frac{\text{JK perlakuan}}{V1 = \text{Db Perlakuan}}$$

$$\text{KT}_{\text{Galat}} = \frac{\text{JK galat}}{V2 = \text{Db Galat}}$$

**e) Menghitung harga F hitung :**

$$F_{\text{Hitung}} = \frac{\text{KT perlakuan}}{\text{KT galat}}$$

**f) Menghitung harga koefisien keragaman (KK) :**

Koefisien keragaman merupakan suatu koefisien yang menunjukkan derajat kejituan (*precision* atau *accuracy*) dan keandalan kesimpulan/hasil yang diperoleh dari suatu percobaan, yang merupakan deviasi baku per unit percobaan dan dinyatakan dalam satuan persen (%). Secara umum dapat dikatakan bahwa jika KK

makin kecil dalam batas tertentu berarti derajat kejituan dan keandalan akan makin tinggi dan akan makin tinggi pula keabsahan (validitasnya). Rumus menghitung KK adalah :

$$KK = \frac{\sqrt{KT \text{ galat}}}{Y} \times 100\%$$

$$Y = \frac{T_{ij}}{rt} = \frac{\sum Y_{ij}}{rt}$$

Hubungan nilai KK dan macam uji beda yang sebaiknya dipakai yaitu :

- 1) Jika KK besar, (minimal 10% pada kondisi homogen atau minimal 20% pada kondisi heterogen), uji lanjutan yang sebaiknya digunakan adalah uji Duncan, karena uji ini dapat dikatakan yang paling teliti.
- 2) Jika KK sedang, (antara 5-10% pada kondisi homogen atau antara 10-20% pada kondisi heterogen), uji lanjutan yang sebaiknya dipakai adalah uji BNT (Beda Nyata Terkecil) karena uji ini dapat dikatakan juga berketelitian sedang.
- 3) Jika KK kecil (maksimal 5% pada kondisi homogen atau maksimal 10% pada kondisi heterogen), uji lanjutan yang sebaiknya dipakai adalah uji BNJ (Beda Nyata Jujur) karena uji ini tergolong kurang teliti.

## 2. Membuat data hasil penelitian pada Uji ANAVA

**Tabel 3.4 Contoh Tabel Ringkasan Analisis Variansi**

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F-Hitung**	F-Tabel
					1%
Perlakuan					
Galat					
Total					

Keterangan: \*\*= berbeda sangat nyata

$t_n$ =tidak berbeda nyata

## 3. Pengujian Hipotesis

Hipotesis yang diajukan pada penelitian ini disusun dalam bentuk hipotesis statistik, yaitu:

$H_0$ = Perlakuan pemberian konsentrasi ekstrak daun Inai (*Lawsonia inermis* L.) **tidak berpengaruh** signifikan dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

$H_1$  = Perlakuan pemberian konsentrasi ekstrak daun Inai (*Lawsonia inermis* L.) **berpengaruh** signifikan atau sangat signifikan dalam menghambat daerah pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Pengujian Hipotesis dilakukan dengan cara membandingkan harga  $F_{hitung}$  dengan  $F_{tabel}$ . Adapun kriteria pengujian hipotesis adalah sebagai berikut :

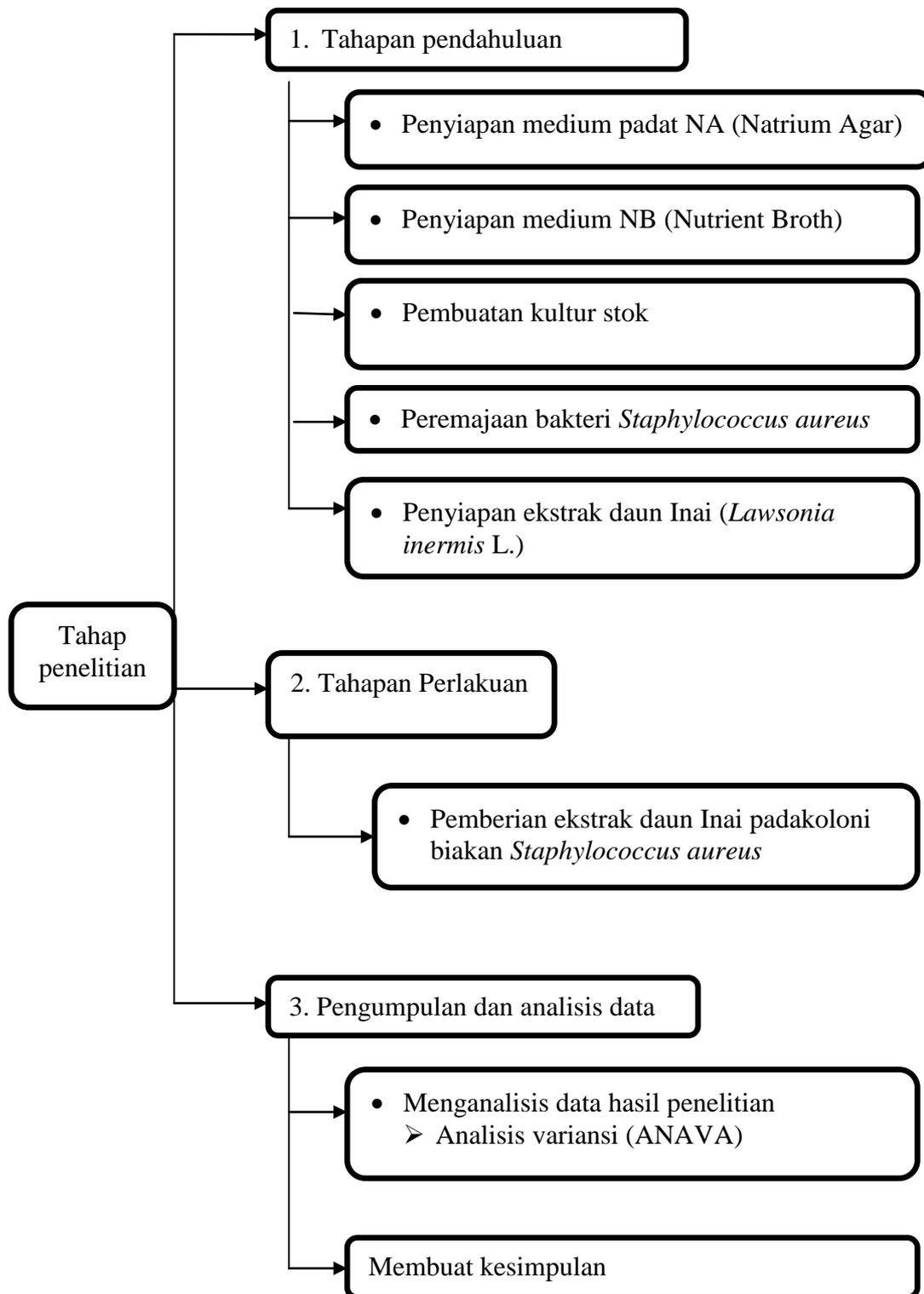
- Jika harga  $F_{hitung} < F_{tabel}$  1 % berarti  $H_0$  diterima, sedangkan  $H_1$  ditolak dan dinyatakan bahwa perlakuan yang diberikan tidak berpengaruh nyata.
- Jika harga  $F_{hitung} \geq F_{tabel}$  1 % berarti  $H_0$  ditolak, sedangkan  $H_1$  diterima dan dinyatakan bahwa perlakuan yang diberikan berpengaruh sangat nyata.

#### **4. Uji lanjut**

Apabila  $F$  hitung  $\geq F$  tabel 1 % maka dapat dinyatakan perlakuan yang diberikan berpengaruh nyata, sehingga dapat dilanjutkan dengan uji BNT 1%.

##### **1) Skema Alur Penelitian**

Langkah-langkah dalam pengumpulan data yang diawali dengan tahapan pendahuluan, perlakuan, dan pengujian yang dijelaskan dalam diagram pada Gambar3.1 berikut:



**Gambar 3.1 Diagram Alur Penelitian**



### 3) Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini dilakukan dalam 2 tahap, meliputi tahap pendahuluan dan tahap perlakuan, dengan langkah-langkah sebagai berikut:

#### 1. Tahap pendahuluan

a. **Pembuatan medium miring NA (*Nutrien Agar*)** sebagai bahan kultur stok bakteri *Staphylococcus aureus*. Dalam pembuatan medium ini, yang digunakan sebagai bahan kultur stok Bakteri *Staphylococcus aureus* ini berjumlah 5 tabung medium miring. Dalam pembuatan kultur stok ada beberapa hal yang perlu disiapkan yaitu:

1) Menyiapkan alat-alat yang bersih, kering dan steril seperti:

**Tabel 3.6 Tabel Alat Pembuatan Medium Miring NA (*Nutrien Agar*)**

No	Alat	Jumlah
1	Hot plate	1
2	Pengaduk besi	1
3	Tabung reaksi	5
4	Gelas beaker 50 ml	1
5	Mikropipet	1
6	Tip mikropipet	2
7	Magnetik stirer	1
8	Kapas	Secukupnya
9	Kain kasa	secukupnya
10	Karet gelang	secukupnya
11	Kertas sampul	Secukupnya
12	Gelas selai	1
13	Neraca digital	1
14	Kulkas	1

2) Menimbang komponen medium dengan menggunakan timbangan neraca digital, adapun dalam bentuk volume yang diinginkan yaitu:

- a) *Beef extract* 0,135 gram
- b) *Bacto peptone* 0,225 gram
- c) *Agar powder* 0,675 gram
- d) *Aquades* 45 ml

**Perhitungan:**

*Formula medium nutrien agar (NA)*

- a) *Beef extract* 3 gram
- b) *Becto peptone* 5 gram
- c) *Agar powder* 15 gram

(catatan: harus memperhitungkan terlebih dahulu dengan seksama medium yang ingin diperlukan berdasarkan perbandingan dari fomula medium NA (*Nutrien agar*) di atas.<sup>53</sup>

Komposisi pembuatan medium miring yaitu:

**Tabel 3.7 Tabel Perhitungan untuk pembuatan medium miring NA (*Nutrien agar*)**

<b>Medium miring</b>
Jumlah tabung X 5ml (5 adalah ukuran volume untuk di dalam tabung $1 \times 5 \times 5 \text{ ml} = 25 \text{ ml}$ $= 25 + 20$ $= 45 \text{ ml}$
(20 ini merupakan cadangan apabila jumlah yang telah ada masih kurang untuk medium)
<b>Perhitungan:</b> a) <i>Beef extract</i> (3 gr) = 0,135 gram b) <i>Becto peptone</i> (5 gr) = 0,225 gram c) <i>Agar powder</i> (15 gr) = 0,675 gram d) <i>Aqudest</i> = 45 ml
Jadi total pembuatan Medium NA, berjumlah 1,035 gram ditambahkan aquadest 45 ml.

<sup>53</sup>Noor Hujjatusnaini, Petunjuk Praktikum Mikrobiologi, Palangka Raya: STAIN 2012, h. 2

- 3) Menimbang bahan seperti *beef extract*, *bacto peptone* dan *agar powder* pada timbangan neraca digital sesuai dengan komposisi yang dibutuhkan serta diperhitungkan.
- 4) Melarutkan semua bahan tersebut di dalam beaker glass 50 ml yang telah berisi *aquadest* sebanyak 45 ml, kemudian mengaduknya secara konstan serta meletakkannya di atas *hot plate stirer*, selama 10-15 menit sampai homogen.
- 5) Memasukan larutan tersebut sebanyak 5 ml ke dalam tabung reaksi dengan menggunakan mikropipet, kemudian setelah itu menutup setiap tabung dengan sumbat kapas yang telah dibungkus dengan kain kasa,
- 6) Sterilkan seluruh tabung reaksi yang telah berisi larutan medium ke dalam autoklap pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lb (pound) selama 15 menit.
- 7) Setelah proses sterilisasi selesai, selanjutnya bahan-bahan dibiarkan selama 1-2 jam.
- 8) Meletakkan tabung reaksi dalam keadaan miring dengan kemiringan 45° dengan menyandarkannya pada tumpukan kapas. Kemudian memasukkannya ke dalam lemari es.
- 9) Menunggu selama 2x24 jam, jika medium tetap bersih dan tidak ditumbuhi jamur atau bakteri, maka medium dapat digunakan.

**b. Pembuatan Kultur murni *Staphylococcus aureus***

Sebelum pembuatan kultur murni dilakukan, ada beberapa hal yang perlu di siapkan yaitu:

- 1) Dalam pembuatan kultur murni ini pengerjaannya dilakukan dalam LAF di Laboratorium Mikrobiologi. Sebelum menggunakan LAF ada beberapa hal yang harus dikerjakan yaitu:
  - a) LAF terlebih dahulu harus disterilkan, dengan menggunakan alkohol 70% pada ruang LAF dengan menyeluruh.
  - b) Menutup pintu LAF, lalu menghidupkan lampu ultraviolet selama 2 jam, setelah itu menghidupkan blower LAF selama 1 jam, (upayakan jangan ada dalam ruang selama menghidupkan lampu UV dan Blower, untuk menghindari terjadinya radiasi). Setelah selesai kemudian mematikan blower dan menunggu 30 menit.
  - c) Setelah blowering selesai, kegiatan selanjutnya memasukan seluruh alat dan bahan yang akan digunakan ke dalam LAF.
  - d) Setelah semuanya selesai, barulah LAF siap untuk digunakan.<sup>54</sup>
- 2) Menyiapkan alat-alat yang bersih, kering dan steril, seperti: jarum inokulasi, sarung tangan, lampu bunsen, korek dan gelas selai.
  - a) Menyiapkan 5 medium miring
  - b) Menyiapkan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yang akan diremajakan.
  - c) Menulis nama koloni bakteri pada medium miring
  - d) Kemudian secara aseptik menginokulasi koloni bakteri tersebut ke dalam medium miring dengan arah zig-zag.

---

<sup>54</sup>Noor Hujjatusnaini, Petunjuk Praktikum Mikrobiologi, Palangka Raya: STAIN 2012, h.5

- e) Menyimpan koloni bakteri tersebut ke dalam inkubator dengan suhu dan waktu yang telah disesuaikan.<sup>55</sup>

**c. Pembuatan medium NB (*Nutrien Broth*)**

- 1) Menyiapkan alat-alat yang bersih, kering dan steril.

**Tabel3.8 Tabel Alat Pembuatan medium NB(*Nutrien Both*)**

NO	Alat	Jumlah
1	Pengaduk Besi	1
2	Beaker glas 50 ml	1
3	Gelas selai	1
4	Tabung reaksi pendek	5
5	Mikropipet	1
6	Tip Mikropipet	2
7	Magnetik stirer	1
8	Kapas	Secukupnya
9	Kain kasa	Secukupnya
10	Hot plate	1
11	Neraca digital	1
12	Inkubator	1

- 2) Menimbang komponen medium dengan menggunakan timbangan analitis atau neraca digital untuk volume yang diinginkan, yaitu:
- a) *Beef extract* 0,12 gram
  - b) *Becto peptone* 0,20 gram
  - c) *Aquades* 40 ml
- 3) Melarutkan semua bahan tersebut ke dalam Beaker Glass 50ml yang telah berisi Aquadest sebanyak 40ml, kemudian mengaduknya secara konstan serta meletakkannya di atas hot plate stirer selama 10-15 menit sampai homogen.

<sup>55</sup>Fressty Yoesnita Affrianti, “Uji aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Sombung (*Blumae Balsamifera* (L.) DC.) Terhadap pertumbuhan *Salmonella sp.* Dan *Escherichia coli*”, Palangka Raya: STAIN, 2013 h, 49

- 4) Memasukkan larutan sebanyak 5 ml ke dalam 5 tabung reaksi pendek (medium NB) dengan menggunakan mikropipet, kemudian menutup setiap tabung dengan sumbat kapas yang telah dibungkus dengan kain kasa.
- 5) Mensterilkan seluruh tabung reaksi (4 tabung) yang sudah berisi larutan medium ke dalam autoklav pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lb (pound) selama 15 menit.
- 6) Setelah proses sterilisasi selesai, selanjutnya bahan-bahan dibiarkan selama 15 menit terlebih dahulu, agar medium dingin.
- 7) Kemudian medium *Nutrien Borth* dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu dan waktu yang telah disesuaikan.
- 8) Menunggu selama 2x24 jam, jika medium tetap bersih dan tidak ditumbuhi jamur dan bakteri, maka medium dapat digunakan.

**d. Membuat medium lempeng NA (*Nutrien Agar*)**

Pembuatan medium lempeng NA (*Nutrien Agar*) ini digunakan sebagai bahan untuk proses perlakuan bakteri *Staphylococcus aureus* nantinya. Dalam pembuatan medium, ada beberapa hal yang perlu disiapkan yaitu:

- 1) Menyiapkan alat-alat yang bersih, kering dan steril seperti:

**Tabel 3.9 Tabel Alat Pembuatan medium lempeng NA (*Nutrien Agar*)**

No	Alat	Jumlah
1	Pengaduk besi	1
2	Beaker glass 500 ml	1
3	Cawan petri	30
4	Mikropipet	2
5	Tip mikropipet	4
6	Kulkas	1
7	Hot plate dan Magnetik stirer	2
8	Karet gelang	Secukupnya
9	Kertas sampul	Secukupnya
10	Gelas selai	1
11	Neraca digital	1

- 2) Menimbang komponen medium dengan menggunakan timbangan neraca digital, adapun untuk volume yang diinginkan yaitu:
  - a) *Beef extract* 0,96 gram
  - b) *Becto peptone* 1,60 gram
  - c) *Agar powder* 4,80 gram
  - d) *Aquades* 320 ml
- 3) Menimbang bahan seperti *beef extract*, *becto peptone* dan *agar powder* pada timbangan Neraca digital sesuai dengan komposisi yang dibutuhkan serta diperhitungkan.
- 4) Melarutkan semua bahan tersebut di dalam beaker glass 500 ml yang telah berisi *aquades* sebanyak 320 ml, kemudian mengaduknya secara konstan serta meletakkannya di atas *hot plate stirer*, selama 10-15 menit sampai homogen.
- 5) Memasukan larutan sebanyak 10 ml ke setiap masing-masing cawan yang berjumlah 30 cawan dengan menggunakan mikropipet, kemudian setelah itu cawan yang telah terisi medium dibungkus dengan kertas sampul dan mengikatnya dengan menggunakan karet gelang.
- 6) Sterilkan seluruh tabung reaksi yang telah berisi larutan medium ke dalam autoklap pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lb (pound) selama 15 menit.
- 7) Setelah proses sterilisasi selesai, selanjutnya bahan-bahan dibiarkan selama 1-2 jam dengan bungkus yang sudah dibuka.
- 8) Setelah medium padat kemudian dibungkus kembali dengan menggunakan kertas sampul dan mengikatnya menggunakan gelang karet lalu memasukkannya ke dalam lemari es.

- 9) Menunggu selama 2x24 jam, jika medium tetap bersih dan tidak ditumbuhi bakteri dan jamur, maka medium dapat digunakan.

**e. Inokulasi Bakteri dari Kultur Stok ke Medium NB**

Dalam proses inokulasi ini, pengerjaannya dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, dan sebelum menggunakan LAF, ada beberapa hal yang perlu dipersiapkan yaitu:

- 1) LAF terlebih dahulu harus disterilkan, dengan menggunakan alkohol 70% pada ruang LAF dengan menyeluruh.
- 2) Menutup pintu LAF, lalu menghidupkan lampu ultraviolet selama 2 jam, setelah itu menghidupkan blower LAF selama 1 jam, (upayakan jangan ada dalam ruang selama menghidupkan lampu UV dan Blower, untuk menghindari terjadinya radiasi). Setelah selesai kemudian mematikan blower dan menunggu 30 menit.
- 3) Setelah blowering selesai, kegiatan selanjutnya memasukan seluruh alat dan bahan yang akan digunakan ke dalam LAF.
- 4) Setelah semuanya selesai, barulah LAF siap untuk digunakan.

Dalam proses inokulasi dari kultur stok *Staphylococcus aureus* ke medium NB ada beberapa langkah yaitu sebagai berikut:

- 1) Menyiapkan alat-alat yang bersih, kering dan steril seperti: jarum inokulasi, sarung tangan, lampu bunsen, korek, gelas selai serta biakan Bakteri *Staphylococcus aureus* dari kultur stok.
- 2) Menyediakan kultur stok Bakteri *Staphylococcus aureus* yang ada pada 4 medium miring.
- 3) Menulis nama koloni bakteri pada medium NB yang telah dipersiapkan.

- 4) Secara aseptik menginokulasi koloni bakteri dari kultur stok tersebut ke masing-masing medium NB.
- 5) Menyimpan koloni bakteri tersebut ke dalam inkubator dengan suhu dan waktu yang telah disesuaikan.

**f. Pembuatan ekstrak daun Inai**

Sebelum tahap ini dilakukan, ada beberapa hal yang perlu disiapkan yaitu: menyiapkan alat-alat yang bersih dan bersih seperti (alat) blender, timbangan, baskom, panci. Bahan-bahan yang disiapkan adalah alkohol 90% sebanyak 3 liter dan daun Inai segar sebanyak 1 kg.

Langkah-langkah kerja dalam pembuatan ekstrak daun Inai adalah sebagai berikut:

- 1) Menyiapkan dan mencuci 1000 gram daun Inai sampai bersih, kemudian dikeringkan.
- 2) Sebelum proses memblender dilakukan, daun Inai ditimbang terlebih dahulu, sampai didapatkan 1000 gram atau 1 kg.
- 3) Memblender daun Inai sebanyak 1000 gram dengan menambahkan 3000 ml alkohol 90%. Kemudian didiamkan selama 3 jam (proses meserasi)
- 4) Menyaring suspensi tersebut dengan menggunakan kain bersih, kemudian menyaringnya kembali dengan menggunakan kertas saring.
- 5) Hasil saringan dimasukkan ke dalam Beaker glass 1000 ml.
- 6) Kemudian melakukan proses penguapan ekstrak dengan cara sederhana, yaitu menggunakan “hot plate” dengan suhu terkontrol 75°C, untuk mengontrol derajat tersebut digunakan alat termometer.

- 7) Ekstrak daun Inai murni yang dihasilkan dalam bentuk pasta/gel kemudian dijadikan sebagai stok induk.<sup>56</sup>

## 2. Tahap Perlakuan dan Pengamatan

Sebelum tahapan ini dilakukan, ada beberapa hal yang perlu di siapkan yaitu: menyiapkan LAF serta alat-alat yang bersih, kering dan steril.

Adapun langkah-langkah kerja dalam menyiapkan taraf-taraf konsentrasi perlakuan ekstrak daun Inai adalah sebagai berikut.

- a) Menyiapkan 10 ml ekstrak daun Inai dengan konsentrasi 90%, yaitu dengan cara mencampurkan 9 ml stok induk ekstrak daun Inai dengan 1 ml aquades steril, yang bagian daun Inai adalah 9 ml dalam 10 ml volume atau 90 %, dimana perhitungan konsentrasi setiap perlakuan digunakan rumus  $M_1 V_1 = M_2 V_2$ .
- b) Menyiapkan 10 ml ekstrak daun Inai dengan konsentrasi 90%, 80%, 70% , 60% dan 0% sebagai kontrol perlakuan.<sup>57</sup>
- c) Pemberian ekstrak daun Inai pada koloni biakan *Staphylococcus aureus*.

Langkah-langkah kerja dalam pemberian ekstrak daun Inai pada koloni *Staphylococcus aureus* adalah sebagai berikut:

- a) Menyiapkan 25 cawan medium lempeng NA, dan memberikan kode-kode perlakuan pada setiap cawan.
- b) Menyiapkan *paper disc* dengan ukuran diameter 2 cm sebanyak 25 buah, kemudian merendamnya kedalam 5 beaker glass yang masing-masing beaker glass berisi 10 ml larutan ekstrak daun Inai dengan konsentrasi yang

---

<sup>56</sup>Wahid mursidi “ Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Daun Penamar Gantung ( *Tinospora crispa* L) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, Palangka Ray:STAIN 2014

<sup>57</sup>Fressty Yoesnita Affrianti, “Uji aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Sombung (*Blumae Balsamifera* (L.) DC.) Terhadap pertumbuhan *Salmonella sp.* Dan *Escherichia coli*”, Palangka Raya: STAIN, 2013 h,50-51

berbeda sesuai dengan taraf-taraf perlakuan, yaitu 60%, 70%, 80%, 90% dan pada konsentrasi 0% yang berfungsi sebagai kontrol. Perendaman dilakukan selama 30 menit.

- c) Menginokulasi kultur murni *Staphylococcus aureus* yang telah berumur 2x24 jam pada masing-masing 25 mediun NA, dengan menggunakan cotton bud.
- d) Meletakkan masing-masing 1 buah *paper disc* yang telah direndam selama 30 menit tersebut secara aseptik ke bagian tengah-tengah permukaan cawan yang berisi medium NA yang sudah berisi bakteri *Staphylococcus aureus* sesuai dengan kode perlakuan yang diberikan.
- e) Menyimpan semua cawan petri ke dalam inkubator dengan suhu 35°C.
- f) Melakukan pengambilan data dengan cara mengukur jarak antara tepian *paper disk* dengan koloni *Staphylococcus aureus* berumur 1x24 jam, 2x24 jam, 3x24 jam dan 4x24 jam.<sup>58</sup>

---

<sup>58</sup>Muhammad Oktriandana, "Pengaruh Ekstrak Daun Meniran (*Phyllanthus niruri*, L) Terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, h, 62-62.