

III. METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Tempat pelaksanaan penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Sidoarjo. Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari 2024.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : tabung reaksi, gelas ukur, cawan petri, *micropipet*, pipet steril, incubator, vortex, *laminar air flow*, api Bunsen, swab kapas steril, ose, jangka sorong, *cakram disk*, pinset, *objek glass*, aluminium foil, penutup kaca, alat tulis, label dan tissue.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* ATCC, ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.), *Eosin Methylen Blue Agar* (EMBA), *media Mueller-Hinton Agar* (MHA) (Oxoid®), disc kloramfenikol 30 µg/disk (Oxoid®), Etanol 96 % (Merck®), standar Mc. Farland no.0,5 (E Merck®), dan DMSO (Dimetil Sulfoksida).

3.3 Metode penelitian

3.3.1 Jenis penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan metode difusi cakram disk (*Kirby-Bauer*), yang mengenai sensitivitas ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.)

sebagai antibakteri alami terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dibandingkan dengan antibiotik kloramfenikol. Penelitian ini menggunakan lima perlakuan dan lima kali pengulangan, sampel didapatkan dari rumus Federer (1977).

3.3.2 Variabel Penelitian

Penelitian yang dilakukan dengan menggunakan beberapa variabel yaitu:

- a. Variabel bebas : ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) dengan konsentrasi
- b. Variabel terikat : diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.
- c. Variabel kontrol : suhu inkubasi, volume suspensi bakteri, kulit manggis

3.3.3 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel bakteri *Escherichia coli* yang dibiakkan pada media EMBA. Sampel penelitian tersebut di berikan dengan ekstrak kulit manggis dengan 5 macam perlakuan. Sampel yang dibutuhkan didapatkan dengan perhitungan dari rumus Federer (1977) sebagai berikut :

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

Keterangan :

n = jumlah ulangan

t = jumlah perlakuan

Berdasarkan rumus diatas, maka dapat ditemukan jumlah sampel perlakuan pada penelitian ini yaitu :

$$\begin{aligned}
 t(n-1) &\geq 15 \\
 5(n-1) &\geq 15 \\
 5n - 5 &\geq 15 \\
 5n &\geq 15 + 5 \\
 5n &\geq 20 \\
 n &\geq 4
 \end{aligned}$$

maka jumlah ulangan perlakuan minimal 4

3.3.4 Parameter Penelitian

Parameter yang dilakukan dalam penelitian ini adalah zona hambat dan persentase diameter zona hambat. Luas zona hambat diukur dari zona bening di sekitar kertas cakram yang menunjukkan seberapa rentan bakteri terhadap zat antibiotik.

3.3.5 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 5 kali pengulangan.

K - : (kontrol negatif) menggunakan DMSO (Dimetil Sulfoksida)

K+ : (kontrol positif) menggunakan antibiotik kloramfenikol

P1 : menggunakan ekstrak kulit manggis 50%

P2 : menggunakan ekstrak kulit manggis 60%

P3 : menggunakan ekstrak kulit manggis 70%

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia Mangostana L.*)

Pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Sidoarjo. Ekstrak Kulit manggis diperoleh dengan cara metode maserasi. Didalam metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Sebanyak 1 kg kulit manggis (*Garcinia mangostana L.*) terlebih dahulu dibersihkan dan kemudian diangin-anginkan lalu dirajang halus, dikeringkan pada suhu ruang atau di oven dengan suhu 40° atau dapat dilakukan penjemuran dibawah sinar matahari selanjutnya dihaluskan dengan blender sampai menjadi serpihan serbuk yang kemudian diayak dengan menggunakan ayakan mesh 40. Selanjutnya menimbang simplisia serbuk kulit buah manggis sebanyak kurang lebih 360 gram, Proses ekstraksi dilakukan dengan merendam serbuk kulit manggis dengan etanol 96%.

Selama proses perendaman dilakukan pengadukan setiap 2 menit pertama lalu didiamkan selama 24 jam. Hasil perendaman selama 24 jam kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring untuk mendapatkan filtrat kemudian, dilakukan perendaman kembali dengan penambahan pelarut. Maserasi kembali dengan pelarut etanol 96%, kemudian diaduk selama 2 menit pertama, lalu di diamkan kembali selama 24 jam.

Ekstrak yang diperoleh disaring dengan kertas saring, kemudian ekstrak yang didapatkan di uapkan pelarutnya dengan menggunakan evaporator dengan

suhu 69°C selama 2-4 jam tergantung jumlah ekstrak sehingga akan didapatkan ekstrak kental yang bebas dari pelarut. Ekstrak yang dihasilkan digunakan untuk pengujian selanjutnya. Ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) akan digunakan dan dibuat konsentrasinya. Untuk membuat ekstrak menjadi beberapa konsentrasi dalam perlakuan dicampurkan dengan DMSO (Dimetil Sulfoksida).

3.4.2 Pembuatan Konsentrasi Kulit Manggis

Variasi konsentrasi kulit manggis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 50%, 60% dan 70%.

- a. Pembuatan konsentrasi kulit manggis 50% yaitu, 0,5 mg ekstrak kulit manggis dengan pelarut DMSO (Dimetil Sulfoksida) ad 1 ml.
- b. Pembuatan konsentrasi kulit manggis 60% yaitu 0,6 mg ekstrak kulit manggis dengan pelarut DMSO (Dimetil Sulfoksida) ad 1 ml.
- c. Pembuatan konsentrasi kulit manggis 70% yaitu 0,7 mg ekstrak kulit manggis dengan pelarut DMSO (Dimetil Sulfoksida) ad 1 ml.

3.4.3 Isolasi dan Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*

Tahap awal pelaksanaan dimulai dengan mengambil sejumlah koloni bakteri *Escherichia coli*. Selanjutnya bakteri *Escherichia coli* di streak di media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) untuk peremajaan bakteri, kemudian diinkubasi selama 1 jam dengan suhu 37° C. Hasil dari pewarnaan pada media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) adalah berwarna *hijau metallic*.

Kemudian dilanjutkan dengan pewarnaan gram pada bakteri *Escherichia coli* yang berguna untuk mengetahui biakan murni dari bakteri *Escherichia coli*. Pewarnaan gram dilakukan dengan mengambil satu koloni bakteri *Escherichia coli* dengan menggunakan ose pada media EMBA. Hasil pewarnaan gram adalah gram negatif dan morfologi bakteri *Escherichia coli* adalah cocobasil dan berwarna merah.

Uji biokimia bakteri *Escherichia coli* dengan beberapa metode yaitu TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), SIM (*Sulfide Indol Motility*), SCA, Urease, dan MR-VP.

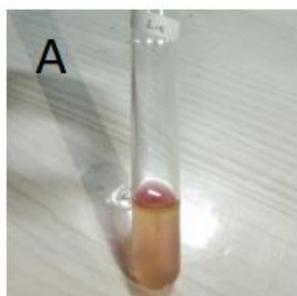
Media TSIA merupakan media untuk melihat kemampuan suatu mikroorganisme dalam memfermentasikan gula. Media TSIA digunakan sebagai pengujian biokimia untuk membedakan beberapa jenis bakteri yang termasuk kelompok Enterobacteriaceae. Media TSIA terdiri dari 3 jenis gula yaitu glukosa, sukrosa dan laktosa (Aminollah, 2016). Hasil dari pengujian *Escherichia coli* dengan media TSIA adalah slide berwarna kuning, dasar

berwarna kuning dan akan terbentuk fermentasi laktosa atau sukrosa, terdapat gas (+), dan H₂S (-)



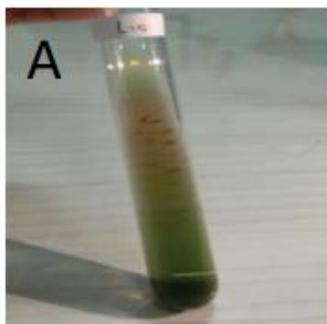
Gambar 3.1 Hasil TSIA Positif (+) (Noviana, 2014)

Media SIM (*Sulfide Indol Motility*) digunakan untuk pergerakan bakteri. Uji SIM adalah uji biokimia yang dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan sulfida, indol, dan motilitas. Hasil yang menunjukkan positif adalah apabila terdapat gambaran awan pada garis tusukan maka dapat dikatakan positif untuk motilitas. Selain itu dapat diketahui pula untuk produksi H₂S dengan terbentuknya presipitat berwarna hitam (Mishra, 2012). Hasil SIM pada bakteri *Escherichia coli* adalah Sulfida -, Indol +, Motilitas +.



Gambar 3.2 Hasil Indol + (Noviana, 2014).

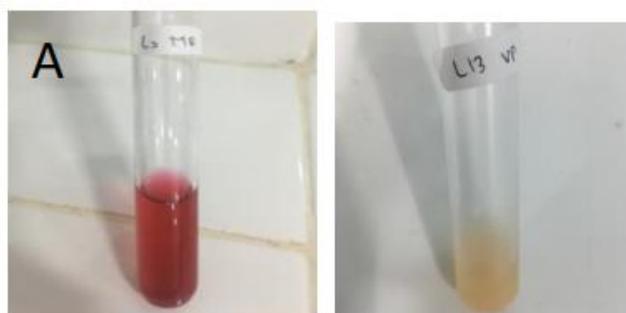
Uji sitrat (SCA) digunakan untuk menentukan apakah bakteri menggunakan natrium sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon. Dengan adanya sitrat media menggunakan garam ammonium sebagai satu-satunya sumber nitrogen (Mahon, 2015). Hasil Uji SCA pada bakteri *Escherichia coli* adalah tidak terdapat perubahan warna karena bakteri *Escherichia coli* tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon sehingga warnanya tetap berwarna hijau (-).



Gambar 3.3 Hasil Sitrat Negatif (-) (Suardana, 2014).

Uji urease digunakan untuk membedakan organisme berdasarkan kemampuannya untuk menghidrolisis urea dengan enzim urease. Urea merupakan produk dekarboksilasi asam amino tertentu yang dapat dihidrolisis menjadi amonia dan karbon dioksida dengan bakteri yang mengandung enzim urease. Uji urease didasarkan pada reaksi hidrolisis urea oleh enzim urease menjadi amonia dan karbon dioksida (Leboffe and Pierre., 2011). Hasil uji urease pada bakteri *Escherichia coli* adalah negatif karena *Escherichia coli* tidak memiliki enzim urease.

Uji MR-VP terdiri dari dua tahap, yaitu uji MR dan uji VP. Uji MR didasarkan pada kemampuan bakteri untuk menghasilkan asam campuran dari metabolisme glukosa. Asam campuran ini akan bereaksi dengan indikator methyl red membentuk warna merah (Hemraj, *et.al.*, 2013). Uji VP didasarkan pada kemampuan bakteri untuk menghasilkan asetoin dan metil glioksal dari metabolisme glukosa. Asetoin dan metil glioksal akan bereaksi dengan reagen alfa-naftol dan KOH membentuk warna merah (Sari & Apridamayanti, 2014). Hasil MR-VP pada bakteri *Escherichia coli* adalah MR + (terbentuk warna merah), VP – (tidak terbentuk warna merah).



Gambar 3.4 Hasil MR (+) dan VP (-) (Suardana, 2014).

3.4.4 Pembuatan Suspensi Bakteri *Escherichia coli*

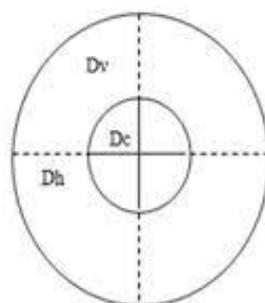
Bakteri *Escherichia coli* yang telah dicek kemurniannya diambil sejumlah koloni dari media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) kemudian koloni tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi NaCl fisiologis dan dihomogenkan dengan menggunakan vortex, lalu kekeruhan disamakan dengan standar Mc.Farland 0,5 atau setara dengan $1 \times 10^6 - 1 \times 10^8$.

3.5 Pengujian Sensitivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana* L.)

Uji sensitivitas antibakteri ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dengan menggunakan metode difusi cakram disk. Langkah-langkah dalam melakukannya yaitu mencelupkan cotton swab kedalam tabung reaksi yang berisikan bakteri yang telah diuji dengan standar Mc.Farland kemudian melakukan streak dengan cotton swab pada media MHA (*Muller Hinton Agar*) dan diamkan selama 10 menit atau sampai mengering. Sebelumnya rendam kertas cakram ke dalam masing-masing konsentrasi ekstrak kulit manggis yaitu 50%, 60%, dan 70%. Kemudian letakkan kertas cakram yang telah direndam ke dalam media MHA (*Muller Hinton Agar*). Pada setiap cawan petri yang berisi media MHA (*Muller Hinton Agar*) terdapat 3 kertas cakram berdiameter 6 mm. Beri label pada masing-masing cawan petri yang telah diletakkan kertas cakram dengan masing-masing konsentrasi, kontrol negatif serta kontrol positif. Perlakuan ini diulang sebanyak lima kali. Kemudian cawan petri diinkubasi di dalam incubator selama 18-24 jam pada suhu 37 °C. Pengamatan yang dilakukan dari uji sensitivitas antibakteri ekstrak kulit manggis, yaitu dengan mengamati zona bening yang terbentuk di sekitar sumuran kemudian diameter zona bening diukur dengan jangka sorong.

3.5 Pengamatan Zona Hambat

Pengamatan yang dilakukan 1 x 24 jam selama masa inkubasi berlangsung. Daerah bening yang terbentuk merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap antibiotik atau ekstrak antibakteri yang digunakan sebagai bahan uji. Hasil uji dinyatakan dengan lebar diameter zona hambat. Diameter zona hambat diukur dalam satuan milimeter (mm) dengan menggunakan jangka sorong. Kemudian diameter zona hambat dikategorikan kekuatan daya antibakterinya berdasarkan penggolongan (Saputera dkk., 2019). Pengukuran zona hambat yang terbentuk diukur secara vertical, horizontal dan ukuran kertas cakram dengan satuan milimeter (mm) menggunakan jangka sorong.



Gambar 3.5 Cara Pengukuran Zona Hambat (Harti,2015)

$$\text{Zona hambat} = \frac{(D1-D3)+(D2-D3)}{2}$$

Keterangan :

D1 = diameter horizontal

D2 = diameter vertical

D3 = diameter kertas cakram ($\pm 6\text{mm}$)

3.6 Persentasi Diameter Zona Hambat

Menghitung nilai persentase diameter zona hambat pertumbuhan bakteri dapat menggunakan rumus PIDG (*Percentage Inhibition of Diameter Growth*) dengan satuan persentase (%) sebagai berikut (Widhowati dkk., 2022) :

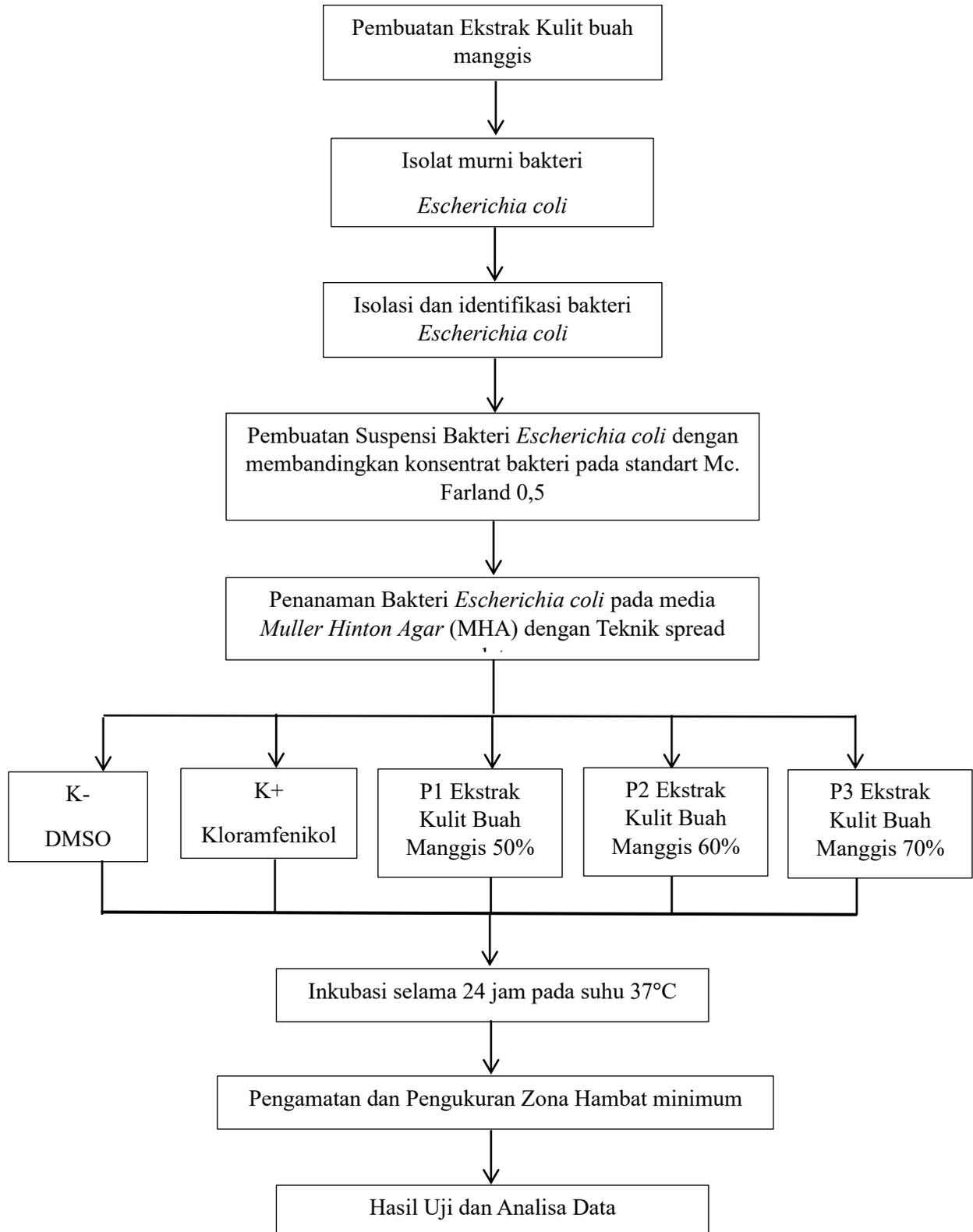
$$\text{PIDG (100\%)} = \frac{A-B}{B} \times 100\%$$

Keterangan :

A = Diameter zona bening

B = Ukuran kertas cakram

3.7 Kerangka Penelitian



3.8 Analisis Data

Data hasil penelitian berupa rata-rata dari zona hambatan pada media agar, diolah dengan uji statistik menggunakan uji one way Analysis of Variance (ANOVA). Selanjutnya dilakukan uji Post Hoc LSD (*Least Significant Difference*) pada variabel penelitian untuk mendapatkan taraf signifikan ($\alpha = 0,01$) dari hasil uji atau sensitivitas ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) sebagai antibakteri alami terhadap bakteri *Escherichia coli*. Pengolahan data penelitian dilakukan dengan menggunakan program komputer *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS).