

III. METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi Universitas Muhammadiyah Sidoarjo pada 01 Januari – 30 Januari 2024.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan untuk penelitian yaitu tabung reaksi, gelas ukur, autoklaf, cawan petri, *micropipette*, pipet steril, inkubator, vortex, *laminar air flow*, api bunsen, kapas swab steril, ose, jangka sorong, *cakram disk*, pinset, *object glass*, *aluminium foil*, penutup kaca, *juicer*, alat tulis, label dan tissue.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini yaitu biakan *Staphylococcus aureus.*, daun kecombrang yang didapatkan secara online, media *Muller Salt Agar* (MSA), etanol 96%, ekstrak daun kecombrang, *standard larutan Mc, farland 0,5*, pelarut *Dimetil Sulfoksida* (DMSO), krista violet, alkohol 96%, antibiotik tetrasiklin.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental mengenai efek ekstrak daun kecombrang sebagai antibakteri alami dibandingkan dengan antibiotik tetrasiklin terhadap *Staphylococcus aureus.*

3.3.2 Variabel Penelitian

Variabel-variabel dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- **Variabel Bebas**

Ekstrak daun kecombrang dengan konsentrasi 65%, 75%, 85%, kontrol positif menggunakan antibiotik tetrasiklin 30 µg dengan kontrol negatif menggunakan DMSO.

- **Variabel Terikat**

Daya hambat ekstrak daun kecombrang terhadap *Staphylococcus aureus*. dalam media *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang terbentuk dalam satuan millimeter (mm).

- **Variabel Kendali**

Asal *Staphylococcus aureus* dan Daun kecombrang.

3.4 Teknik Pengambilan Sampel

Penelitian ini menggunakan jumlah ulangan perlakuan lima. Jadi sampel yang di gunakan adalah 15 cawan petri.

3.4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan penelitian eksperimental dengan rancangan acak lengkap (RAL), penelitian ini menggunakan lima perlakuan dengan lima ulangan:

- Kontrol negatif menggunakan DMSO
- Kontrol positif menggunakan tetrasiklin
- P1 menggunakan daun kecombrang 65%

- P2 menggunakan daun kecombrang 75%
- P3 menggunakan daun kecombrang 85%

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pembuatan Esktrak Daun Kecombrang

Daun kecombrang didapat online sebanyak sepuluh kilogram dengan berbentuk kering lalu dibuat serbuk dengan cara di blender dan diayak dengan menggunakan ayakan mesh ukuran 40. Daun kecombrang yang menjadi serbuk ditimbang sebanyak 500 gram. Daun kecombrang yang telah menjadi serbuk di kirim ke Laboratorium Bakteriologi Universitas Muhammadiyah Sidoarjo untuk dibuat suspensi ekstrak dengan metode maserasi. Ekstrak dibuat dengan cara mencampur daun kecombrang yang telah halus dengan larutan etanol 96%. Proses ekstraksi dengan cara meserasi selama 24 jam, dengan sesekali diaduk sehingga seluruh zat dapat tersari dalam pelarut, kemudian diuapkan dengan *Rotary evaporator*. Penguapan dilakukan sampai semua larutan menguap hingga ekstrak menjadi kental. Hasil ekstrak kemudian dibuatkan konsentrasi perlakuan dengan dicampur DMSO. Konsentrasi ekstrak yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah 65%, 75%, 85%.

- Pembuatan Konsentrasi 65%

Pembuatan ekstrak dengan konsentrasi 65% yaitu, 650 µl ekstrak daun kecombrang di campur dengan DMSO 350 µl sampai volume 1 ml.

- Pembuatan Konsentrasi 75%

Pembuatan ekstrak dengan konsentrasi 75% yaitu, 750 µl daun kecombrang di campur dengan DMSO 250 µl sampai volume 1 ml.

- Pembuatan Konsentrasi 85%

Pembuatan ekstrak dengan konsentrasi 85% yaitu, 850 µl daun kecombrang di campur dengan DMSO 150 µl sampai volume 1 ml.

3.5.2 Isolasi dan Identifikasi *Staphylococcus aureus*.

1. *Mueller Salt Agar* (MSA)

Tahap pelaksanaan dimulai dengan membeli isolat murni di Universitas Muhamadiyah Sidoarjo. Selanjutnya mengambil satu koloni bakteri *Staphylococcus aureus*. dari *Mueller Salt Agar* (MSA) dengan ose. Kemudian bakteri *Staphylococcus aureus*. di streak pada media *Mueller Salt Agar* (MSA) untuk peremajaan, selanjutnya diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Lalu isolasi *Staphylococcus aureus*. koloni bakteri yang tumbuh *Staphylococcus* berwarna kuning, sehingga media MSA akan berubah dari warna merah menjadi kuning (Karimela, dkk., 2017).

2. Pewarnaan gram

Pewarnaan gram dimulai dengan menggunakan satu koloni *Staphylococcus aureus*. dengan menggunakan ose, lalu letakkan ke objek glas yang sudah ditetesi aquadest. Kemudian tetesi dengan pewarna *kristal violet* selama satu menit dan warna dibuang, setelah satu menit, lalu dilunturkan alkohol 90% selama 30 detik.

Setelah itu alkohol dibuang dengan aquadest dan diberi pewarnaan kedua safranin, kemudian dikeringkan dan diamati dengan mikroskop. Hasil pewarnaan gram berbentuk coccus, berkelompok dan berpasangan seperti buah anggur, berwarna ungu dan tidak membentuk spora berarti gram positif.

3.5.3 Uji Biokimia

- ***Triple Sugar Iron Agar (TSIA)***

Isolat bakteri diinokulasikan pada media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) dengan cara ditusuk tegak lurus pada bagian butt dan cara zig-zag pada bagian slant. Kemudian biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati perubahan warna media. Apabila pada bagian lereng (*slant*) media berwarna merah dan bagian dasar (*butt*) berwarna kuning, maka bakteri mampu memfermentasi glukosa. Apabila pada bagian lereng (*slant*) dan bagian dasar (*butt*) berwarna kuning, maka bakteri mampu memfermentasi glukosa, laktosa dan sukrosa. Kemudian bila bakteri mampu mendesulfurisasi asam amino maka media akan berubah warna menjadi hitam, dan media akan terangkat atau pecah apabila terbentuk gas (Kursia, 2020).

- **Uji Katalase**

Uji katalase dilakukan dengan cara satu mengambil ose isolat bakteri dengan menggunakan jarum ose kemudian dioleskan pada *object glass* lalu ditetaskan sebanyak 1 tetes larutan H₂O₂. Toelle *et al* (2014) menyatakan bahwa katalase positif ditunjukkan adanya gelembung gas (O₂) yang diproduksi oleh genus *Staphylococcus*. *Staphylococcus sp.* menggunakan katalase untuk melindungi dari

hidrogen peroksida (H_2O_2) dengan mengubahnya menjadi air dan oksigen (Locke *et al.* 2013). Uji katalase berguna dalam identifikasi kelompok bakteri tertentu. Uji katalase pada bakteri bentuk kokus digunakan untuk membedakan *Staphylococcus* dan *Streptococcus*. Kelompok *Streptococcus* memberi reaksi negatif, sedangkan *Staphylococcus* memberikan reaksi positif (Lay 1994).

- **Uji Metil Red-Voges Proskauer (MR- VP)**

Uji Metil Red-Voges Proskauer (MR-VP) dilakukan dengan cara diinokulasikan 1 ose biakan ke dalam media MR-VP dan diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 24 jam. Kemudian media MR-VP tersebut dimasukkan $\frac{1}{2}$ bagian kedalam tabung reaksi steril lain, sehingga terdapat 2 tabung reaksi (tabung reaksi A dan tabung reaksi B), tabung reaksi B berisi media MR-VP diinkubasi kembali pada suhu $37^\circ C$ selama 24 jam. Selanjutnya tabung reaksi A dilakukan Uji *Voges Proskauer* (VP), uji VP digunakan untuk menentukan kemampuan bakteri tersebut menghasilkan produk akhir yang netral dari fermentasi glukosa. Dilakukan dengan cara tabung reaksi A ditetaskan 2 tetes reagen *α -naphthol* dan kalium hidroksida, apabila berwarna merah muda atau merah tua menunjukkan reaksi positif. Selanjutnya uji *Metil Red* dilakukan dengan cara tabung reaksi B yang telah diinkubasi selama 48 jam, ditetaskan 2 tetes reagen *metil red*, jika berwarna merah muda atau merah tua menunjukkan reaksi positif (Darmawi, dkk., 2019).

3.5.4 Pembuatan Suspensi *Staphylococcus aureus*

Bakteri uji yang telah diinokulasi diambil dengan kawat ose steril lalu disuspensikan kedalam tabung yang berisi 2 ml larutan NaCl 0,9% hingga di peroleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan 0,5 Mc. Farland. Perlakuan yang sama dilakukan pada setiap jenis bakteri uji (Mpila, dkk., 2012).

3.5.5 Uji Sensitivitas Daun Kecombrang Terhadap *Staphylococcus aureus*

Uji sensitivitas antibakteri ekstrak daun kecombrang dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. dilakukan menggunakan metode difusi cakram disk. Suspense bakteri yang telah diuji dengan standart Mc. Farland diambil sebanyak 0,1 ml dan diteteskan pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) setelah itu diratakan dengan menggunakan metode streak.

Kertas cakram yang telah direndam kedalam ekstrak daun kecombrang 65%, 75%, dan 85% masing- masing konsentrasi ditempelkan pada cawan petri diatasnya. Pada setiap cawan petri media *Mueller Hinton Agar* (MHA) berisi 2 kelompok yaitu kontrol berupa kontrol negatif DMSO dan kontrol positif tetrasiklin dan kelompok perlakuan berupa konsentrasi 65%, 75%, dan 85%. Beri label pada masing-masing cawan petri yang telah diletakkan kertas cakram dengan masing-masing perlakuan dan kontrol. Perlakuan ini diulang sebanyak lima kali. Kemudian cawan petri diinkubasi didalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengamatan hasil dari uji sensitivitas antibakteri ekstrak daun kecombrang, yaitu dengan mengamati zona jernih diukur dengan jangka sorong.

3.5.6. Pengamatan Zona Hambat

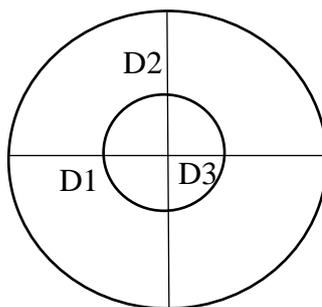
Pengamatan dilakukan 1 x 24 jam selama masa inkubasi berlangsung. Daerah bening yang terbentuk merupakan petunjuk kepekaan terhadap antibiotik atau ekstrak antibakteri yang digunakan sebagai bahan uji. Hasil uji dinyatakan dengan lebar diameter zona hambat. Diameter zona yang diukur dalam satuan millimeter (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 vertikal, horizontal dan ukuran kertas cakram dengan satuan millimeter (mm) menggunakan jangka sorong.

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

Keterangan : D1 = Diameter horizontal

D2 = Diameter vertical

D3 = Diameter kertas cakram (± 6 mm)



3.5.7 Uji Fitokimia

Uji fitokimia adalah suatu pengujian untuk mengidentifikasi senyawa yang terkandung dalam suatu tanaman yang meliputi pengujian senyawa flavonoid,

alkaloid, saponin, dan tannin (Jafar, dkk., 2020). Uji fitokimia dilakukan untuk melihat senyawa yang terdapat pada daun kecombrang.

a. Flavonoid

Sampel dalam HCL pekat ditambah amil alcohol, apabila memberikan warna jingga maka reaksi positif.

b. Alkaloid

Pengujian alkaloid dilakukan dengan menggunakan tiga jenis reagen yaitu mayer, bouchardat, dan dragendorf dimana negatif dihasilkan endapan putih/kuning untuk reagen mayer, larutan coklat hitam untuk reagen bouchardat, dan endapan merah bata untuk reagen dragendorf.

c. Saponin

Uji saponin dilakukan dengan reagen HCl 2N diketahui positif yang ditandai terbentuknya busa setelah pengocokan.

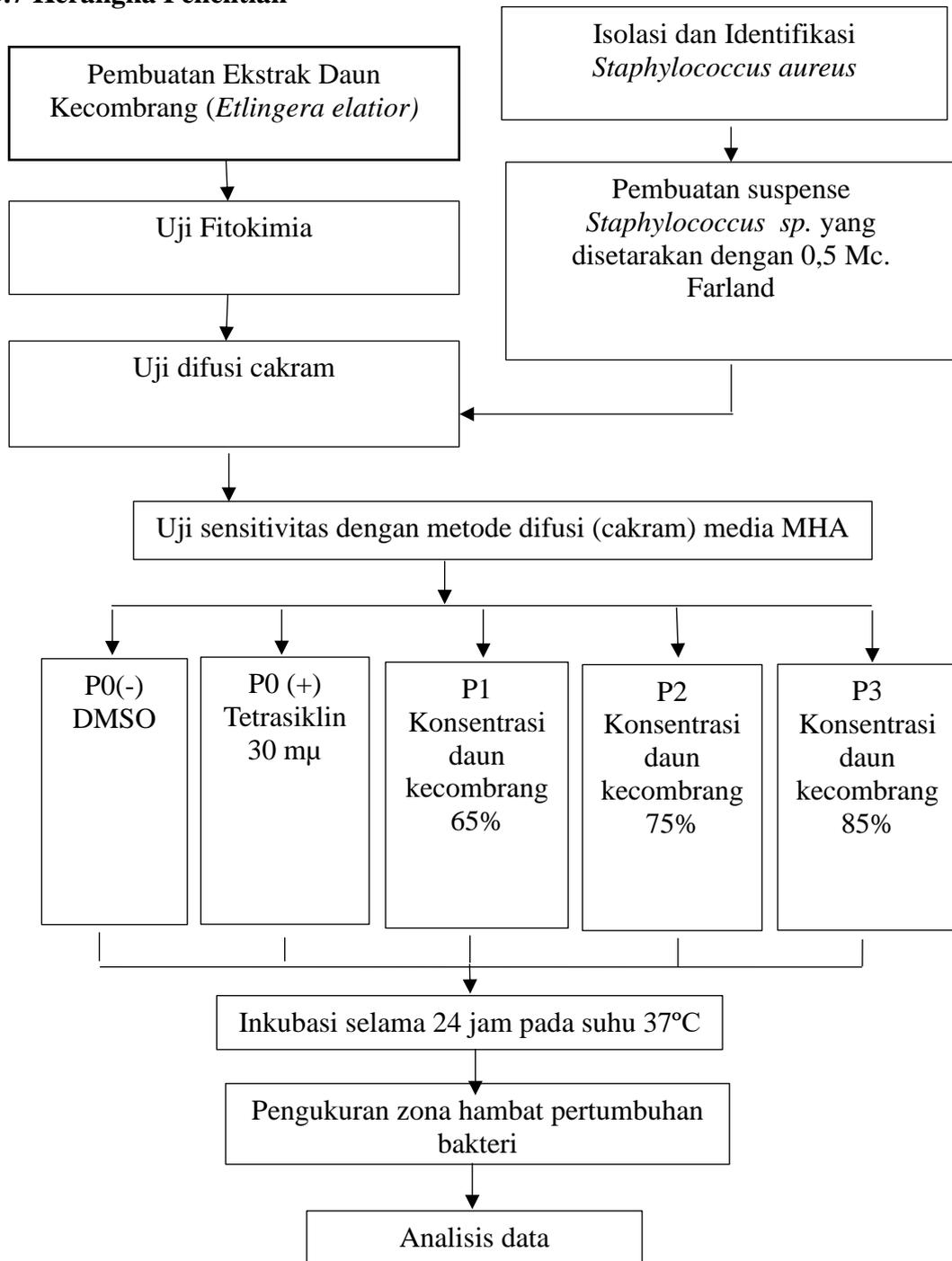
d. Fenolik

Berdasarkan kemampuan reagen Folin-Ciocalteu untuk mengoksidasi gugus hidroksil (OH-) dari senyawa fenol, yang kemudian membentuk kompleks berwarna biru.

3.6 Parameter Penelitian

Parameter penelitian ini adalah pengamatan yang dilakukan selama 24 jam masa inkubasi. Luas zona hambat diukur dari zona bening disekitar kertas cakram yang menunjukkan seberapa rentan bakteri terhadap zat antibiotik atau sampel ekstrak yang digunakan (Widhowati dkk., 2022).

3.7 Kerangka Penelitian



3.8 Analisis Data

Analisis data untuk mengetahui efektivitas daun kecombrang sebagai antibakteri alami terhadap *Staphylococcus aureus*. dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data yang dianalisis dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) dan taraf kepercayaan yang digunakan dalam penelitian ini $\alpha = 0,05$. Untuk menentukan peringkat efektivitas signifikan perlakuan digunakan uji jarak Duncan dengan taraf kepercayaan $\alpha = 0,05$