

III. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Sidoarjo dan Laboratorium Mikrobiologi Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. Penelitian dilaksanakan pada bulan 01 Januari – 30 Januari 2024.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat

Adapun alat yang di gunakan untuk penelitian yaitu: bejana maserasi, rotavapor, corong bushner, kertas saring, blender, autoklaf, laminar air flow, pinset, tabung reaksi, rak tabung reaksi, erlenmeyer, cawan petri, vortex, jangka sorong elektrik, ose bulat, mikroskop binokuler, objek glass, pipet, spuit, kamera, api bunsen, inkubator, micropipet, yellow tip, plate spreader, cork borer, handscon, masker, alat tulis, dan kertas label.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan antara lain bunga kecombrang (*Etilingera elatior*), disc tetracyclin 30 µg, biakan bakteri *Staphylococcus aureus*, media MSA (*Mannitol Salt Agar*), dan kertas cakram 6 mm.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris, menggunakan rancangan eksperimental murni (*true experimental design*). Uji efek ekstrak

ekstrak bunga kecombrang (*Etilingera elatior*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan cara uji in vitro labolatoris.

3.3.2 Variabel Penelitian

Variabel bebas yaitu ekstraksi bunga kecombrang dengan konsentrasi 80%, 90% dan 100%. Variabel terikat yaitu hasil uji Uji Difusi Disk Kirby-Bauer dan daya hambat. Variabel kendali yaitu konsentrasi *Staphylococcus aureus*. Kelompok perlakuan dalam penelitian terdiri atas 5 kelompok dengan pengelompokan setelah perhitungan Federer masing-masing 3 ulangan yaitu uji antibakteri ini dilakukan terdiri atas 5 perlakuan dengan masing-masing 3 ulangan yaitu P1: Media MHA + ekstrak bunga kecombrang 80%. P2: Media MHA + ekstrak bunga kecombrang 90%. P3: Media MHA + ekstrak bunga kecombrang 100%. K+: Media MHA + tetracycline. K-: Media MHA + DMSO (*Dimethyl sulfoxide*).

3.3.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* yang dibiakkan pada media MHA (*Muller Hinton Agar*) yang ditambahkan dengan ekstrak bunga kecombrang (*Etilingera elatior*) dengan lima perlakuan dan pengulangan lima kali pada masing-masing sampel. Sehingga sampel yang yang digunakan sebanyak 25, berdasarkan rumus Federer (1977) sebagai berikut

Rumus Federer (1977) :

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

t = jumlah kelompok

n = jumlah sampel

Dari perhitungan rumus Federer tersebut maka jumlah sampel yang didapatkan dalam penelitian yaitu :

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

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \rightarrow \mathbf{n \geq 5}$$

Maka jumlah ulangan perlakuan yaitu sebanyak 5 kali pengulangan.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pemeriksaan Pemurnian Isolat *Staphylococcus aureus*

3.4.1.1 Uji Media Selektif

Sebelum dilaksanakan penelitian, bakteri *Staphylococcus aureus* terlebih dahulu dilakukan proses pemeriksaan pemurnian isolat. Pemeriksaannya yaitu dengan media MSA (*Mannitol Salt Agar*). Koloni pada bakteri *Staphylococcus aureus* berbentuk bulat, dengan tepi rata, permukaan yang cembung, dan berwarna kuning keemasan (Lastian, dkk., 2019).

3.4.1.2 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengamati morfologi sel bakteri dan mengetahui kemurnian sel bakteri. Inokulasi bakteri, kemudian fiksasi dengan memanaskan objek glass diatas api bunsen lalu tambahkan kristal violet dan biarkan selama 1-2 menit kemudian bilas dengan air mengalir, tambahkan larutan lugol dan diamkan selama 30 detik kemudian bilas dengan air mengalir,

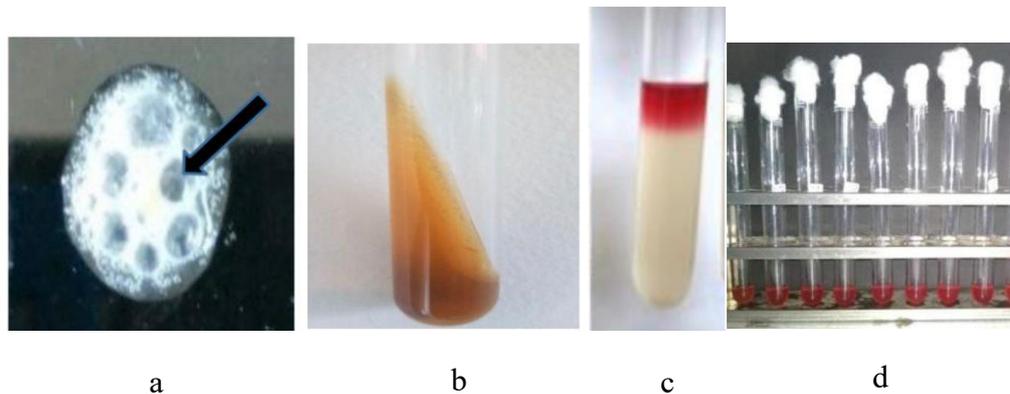
tambahkan etanol biarkan selama beberapa detik kemudian bilas dengan air mengalir dan tambahkan safranin, biarkan selama 1-2 menit kemudian bilas dengan air mengalir lalu keringkan sediaan ulas dan amati dibawah mikroskop. Morfologi sel isolat adalah gram positif, berbentuk kokus tersusun dalam kelompok-kelompok tidak teratur (menyerupai buah anggur), dapat pula tersusun empat-empat (tetrad), membentuk rantai (3-4 sel), berpasangan atau satu-satu. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif dan berbentuk kokus yang menghasilkan warna ungu pada pewarnaan Gram (Dewi, 2013).

3.4.1.3 Uji Biokimia

Uji katalase pada media MSA didapatkan bahwa semua isolat (bakteri) menunjukkan reaksi positif. Fungsi dari uji katalase pada bakteri berbentuk kokus yaitu untuk membedakan antara *Staphylococcus* dan *Streptococcus*, yang dimana semua galur *Staphylococcus* bersifat katalase positif (Dewi, 2013).

Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) dilakukan dengan mengambil satu koloni bakteri uji dari MSA dengan ose jarum, kemudian ditusukkan sampai ke dasar tabung TSIA dan lakukan secara zigzag pada bagian miring media. Lalu inkubasi selama 24 jam. Bakteri *Staphylococcus aureus* akan memfermentasikan gula, sehingga hasil yang ditunjukkan adalah perubahan media menjadi kuning/kuning atau A/A. Bakteri *Staphylococcus aureus* memberikan hasil uji katalase positif dimana enzim katalase atau peroksidase sangat berperan dalam kelangsungan hidup mikroba (Lasmini, dkk., 2022).

Hasil pengujian MR positif ditandai dengan terjadinya perubahan warna media dari kuning menjadi kemerahan/merah setelah di tetesi indikator *Methyl Red*. Warna merah yang menunjukkan pH media oleh produk asam dalam jumlah besar yang dihasilkan dari fermentasi glukosa. Lalu pengujian VP (*Voges Proskauer*) digunakan untuk menentukan kemampuan dari bakteri menghasilkan produk akhir yang netral dari fermentasi glukosa melalui jalur butanediol, hasil negatif ditandai dengan tidak adanya perubahan warna pada media setelah ditambahkan indikator (Manalu, dkk.,2020).



Gambar 3. 1 (a) Uji katalase positif, (b) Uji TSIA positif, (c) Uji MR positif, (d) Uji VP positif
(Sumber: Lasmini, dkk., 2022)

3.4.2 Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Koloni bakteri dari media MSA (*Mannitol Salt Agar*) yang telah diinokulasi diambil dengan kawat ose steril lalu disuspensikan kedalam tabung yang berisi 2 ml larutan NaCl 0,9% menggunakan vortex, hingga di peroleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan Mc. Farland 0,5 atau setara dengan 10^6 - 10^8 . Perlakuan yang sama dilakukan pada setiap jenis bakteri uji (Ipit, 2015).

3.4.3 Ekstraksi

Ekstrak bunga kecombrang dibuat dengan cara maserasi. Bunga kecombrang 250gr diiris halus dan dikeringkan pada suhu ruang kemudian dihaluskan dengan blender sampai menjadi serpihan serbuk. Proses ekstraksi dilakukan dengan merendam serbuk bunga kecombrang dengan etanol 96 %. Selama proses perendaman dilakukan pengadukan setiap 6 jam pertama. Hasil rendaman yang sudah 24 jam kemudian disaring untuk mendapatkan filtrat kemudian dilakukan perendaman kembali dengan penambahan pelarut, maserasi dilakukan selama 3x24 jam. Ekstrak bunga kecombrang kemudian diproses di rotary vacuum evaporator dengan suhu 40°C untuk mendapatkan ekstrak kental bunga kecombrang. Kemudian ekstrak kental dibuat dalam konsentrasi 80%, 90%, dan 100% dengan DMSO. Kontrol positif antibiotik tetrasiklin digunakan konsentrasi 30 µg dan kontrol negatif menggunakan DMSO (Hibatullah dan Yuliana, 2021).

3.4.4 Pembuatan Stok Konsentrasi Ekstrak Bunga Kecombrang

Variasi konsentrasi ekstrak bunga kecombrang yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 80%, 90%, 100% :

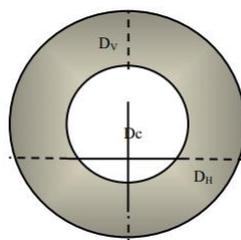
- a. Pembuatan konsentrasi bunga kecombrang 80% yaitu, 0,8 ml ekstrak bunga kecombrang dengan pelarut DMSO sampai 1 ml.
- b. Pembuatan konsentrasi bunga kecombrang 90% yaitu, 0,9 ml ekstrak bunga kecombrang dengan pelarut DMSO sampai 1 ml.
- c. Pembuatan konsentrasi bunga kecombrang 100% yaitu, 1 ml ekstrak bunga kecombrang dengan pelarut DMSO sampai 1 ml.

3.4.5 Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram (*Test Kirby-Bauer*)

Dua cawan petri MHA (*Mueller Hinton Agar*) disiapkan, kemudian dikultur dengan *Staphylococcus aureus* 0,1 cc, lalu digoreskan menggunakan kapas ulas steril diatas media uji. Kapas ulas steril diputar beberapa kali, prosedur ini diulangi sebanyak dua cawan petri. Kertas cakram ekstrak dengan diameter 6 mm ditempelkan pada media MHA. Kontrol positif tetrasiklin 30 μ L dan kontrol negatif (DMSO) diletakkan pada media MHA. Ekstrak etanol bunga kecombrang (*Etlingera elatior*) masing-masing kosentrasi 80%, 90%, dan 100%. Selanjutnya media MHA yang telah ditempli cakram diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, setiap perlakuan diulang sebanyak 5 kali, kemudian dilakukan pengukuran diameter zona hambat dengan jangka sorong yang dinyatakan pada satuan milimeter (Sari dan Fajriaty, 2017).

3.4.6 Perhitungan Zona Hambat

Pengamatan dilakukan selama 24 jam masa inkubasi. Zona bening pada sekitar cakram merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap bahan anti bakteri yang digunakan sebagai bahan uji dan dinyatakan dengan luas zona hambat. Zona hambat yang terbentuk pada kertas cakram, kemudian diukur diameter ventrikal dan diameter horizontal dengan satu mm menggunakan jangka sorong (Toy, dkk., 2015).



Gambar 3. 2 Pengukuran diameter zona hambat (Toy, dkk., 2015)

Rumus: $\frac{(Dv-Dc) + (Dh-Dc)}{2}$

2

Keterangan :

Dv : Diameter vertikal

Dh : Diameter horizontal

Dc : Diameter cakram

3.4.7 Parameter Penelitian

Pengamatan yang telah diperoleh selama ± 24 masa inkubasi yang berfungsi sebagai parameter penelitian, luas dari zona hambat diukur dari zona bening di sekitar kertas cakram yang menunjukkan seberapa rentan bakteri terhadap zat antibiotik. Menghitung nilai persentase diameter zona hambat pertumbuhan bakteri dapat menggunakan rumus PIDG (*Percentage Inhibition Of Diameter Growth*) (Widhowati, dkk., 2022).

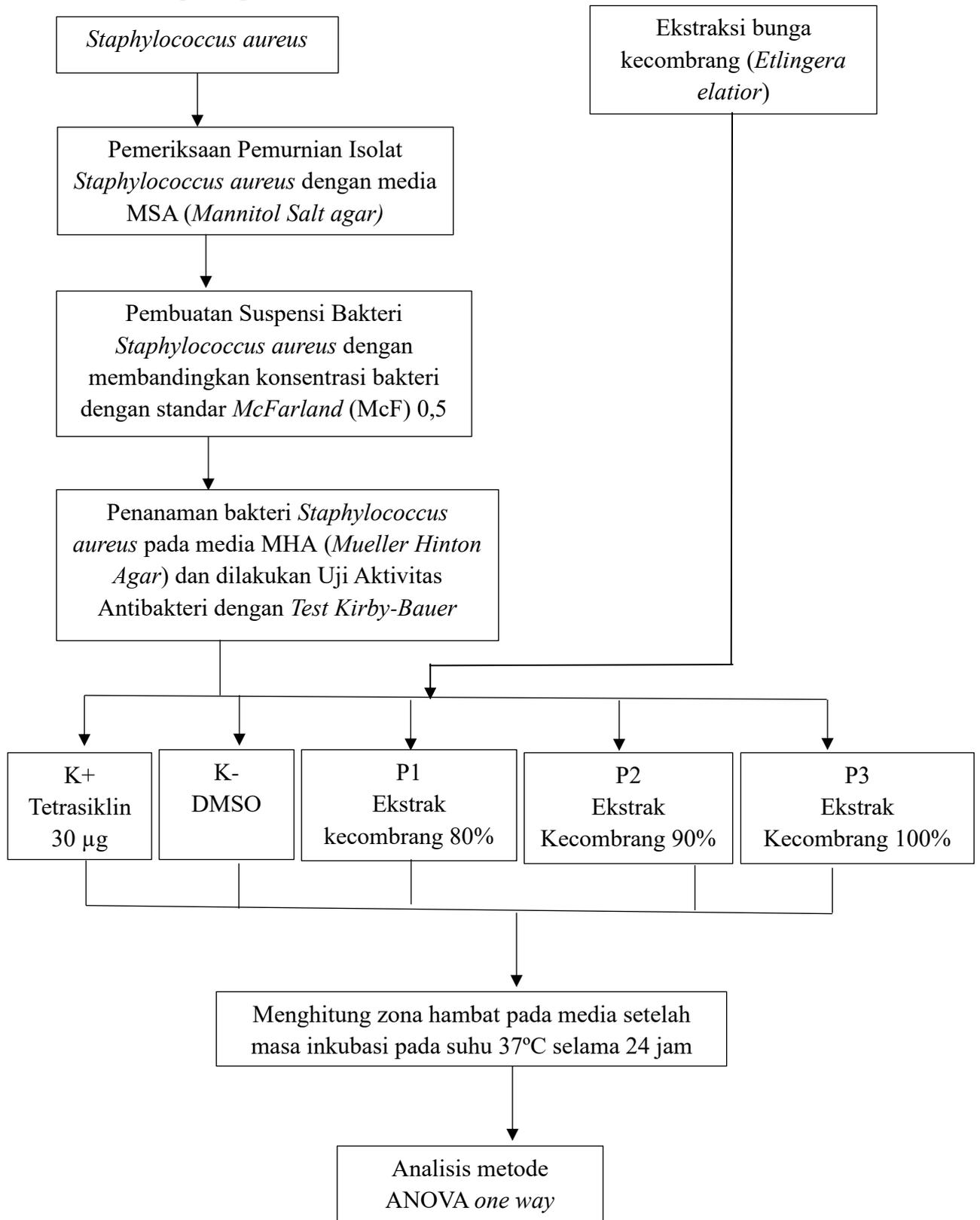
$$\text{PIDG (\%)} = \frac{A - B}{B} \times 100$$

Keterangan :

A = Diameter zona bening

B = Ukuran kertas cakram

3.4.8 Kerangka Operasional Penelitian



3.5 Analisi Data

Pengumpulan data berupa data kuantitatif daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* lalu dilakukan analisis memakai uji *Analysis Of Variance* (ANOVA *one way*) buat mengetahui efektivitas di perlakuan penelitian. Adanya perbedaan yang nyata ($\alpha=0,05$) antara kelompok perlakuan dengan diberi ekstrak bunga kecombrang dengan yang tanpa perlakuan pada pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Penafsiran dan penyimpulan hasil, dilakukan berdasarkan uji ANOVA dari setiap perlakuan untuk dibandingkan hasilnya, sehingga mendapatkan kelompok perlakuan yang paling efektif dibandingkan dengan kelompok perlakuan positif (dengan perlakuan obat generik) dan perlakuan negatif (tanpa terapi).