

III. MATERI DAN METODE

3.1. Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat (B2P2TOOT) dan Obat Tradisional Tawangmangu dan Laboratorium Bakteriologi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Sidoarjo, pada bulan Desember 2023.

3.2. Materi Penelitian

3.2.1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: cawan petri, vortex, ose, rak tabung reaksi, inkubator, api bunsen, autoklaf, tabung reaksi, erlenmeyer, mikropipet *plate spreader*, spektrofotometer, *juicer*, alat tulis.

3.2.2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: Isolat *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, media larutan Mcfarland 0,5, media Pepton, media *Nutrient Agar*, daun berenuk (*Crescentia cujete*), aquades, antibiotik kloramfenikol, masker, kertas saring, dan kertas label.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorik mengenai uji MIC infusa daun berenuk terhadap pertumbuhan *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Teknik pengambilan sampel yang digunakan yaitu *post-test* dengan analisis data menggunakan *random sampling* terhadap 12 perlakuan dan 5 pengulangan.

3.3.2. Variabel Penelitian

Variabel-variabel dalam penelitian ini adalah variabel bebas, kendali dan terikat. Variabel bebas yaitu infusa daun berenuk dengan berbagai konsentrasi dan antibiotik kloramfenikol 30µg/mL. Variabel kendali yaitu bakteri MRSA. Variabel terikat yaitu nilai absorbansi suspensi MRSA dan jumlah koloni MRSA terhadap infusa daun berenuk.

3.4. Teknik Pengambilan Sampel

Sampel diambil di akhir periode riset (*post-test*) dan diperbanyak menggunakan media *Nutrient Agar*. Selanjutnya membuat suspensi MRSA dan diletakkan di tabung reaksi sebanyak 1 ml. Setelah itu tambahkan infusa daun berenuk dengan berbagai konsentrasi.

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Determinasi Spesies

Determinasi spesies dilakukan di Balai Besar Litbang Tanaman Obat dan Obat Tradisional Tawangmangu, Jawa Tengah.

3.5.2. Pembuatan Infusa Daun Berenuk

Pertama pilih daun berenuk yang segar dan keringkan dengan oven selama 1 jam pada suhu 80°C. Daun dihaluskan menggunakan *juicer*. Lalu daun direbus dan tambahkan 10% aquades. Perbandingannya yaitu 1 bagian daun dilarutkan dengan 10 bagian pelarut/aquades (1:10). Kemudian dididihkan selama 15 menit. Lalu angkat dan saring. Setelah itu, dinginkan pada suhu ruang. Infusa daun berenuk siap digunakan.

3.5.3. Pengkayaan MRSA

Sampel diambil dari isolat murni yang terjaga dari kontaminasi dan diseleksi menggunakan media selektif MRSA yaitu *Todd Hewitt Agar*. Setelah itu bakteri diperkaya menggunakan media *Nutrient Agar* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

3.5.4. Pembuatan Suspensi

Sebanyak satu koloni bakteri diambil pada media menggunakan ose bulat steril, kemudian diinokulasikan dalam media pepton lalu divortex. Setelah itu, suspensi disetarakan dengan larutan *McFarland* 0,5 dengan kepadatan sel bakteri $10^6 - 10^8$ sel/mL. Suspensi siap digunakan.

3.5.5. Pembuatan Konsentrasi

Suspensi bakteri sebanyak 1 ml di dalam tabung reaksi dicampurkan kloramfenikol 30 μ g/mL dan infusa daun berenek dengan berbagai konsentrasi (256 μ L/mL, 128 μ L/mL, 64 μ L/mL, 32 μ L/mL, 16 μ L/mL, 8 μ L/mL, 4 μ L/mL, 2 μ L/mL, 1 μ L/mL, dan 0 μ L/mL). Terdapat 11 perlakuan untuk infusa daun berenek dengan lima kali pengulangan dan 1 perlakuan untuk kloramfenikol. Tabung reaksi yang telah diisi suspensi dan bahan uji diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, bahan uji diletakkan pada kuvet kemudian dimasukkan ke dalam spektrofotometer untuk melihat nilai absorbansinya. Hasil data pengukuran antar bahan uji akan dijadikan perbandingan.

3.5.6. Perhitungan Koloni

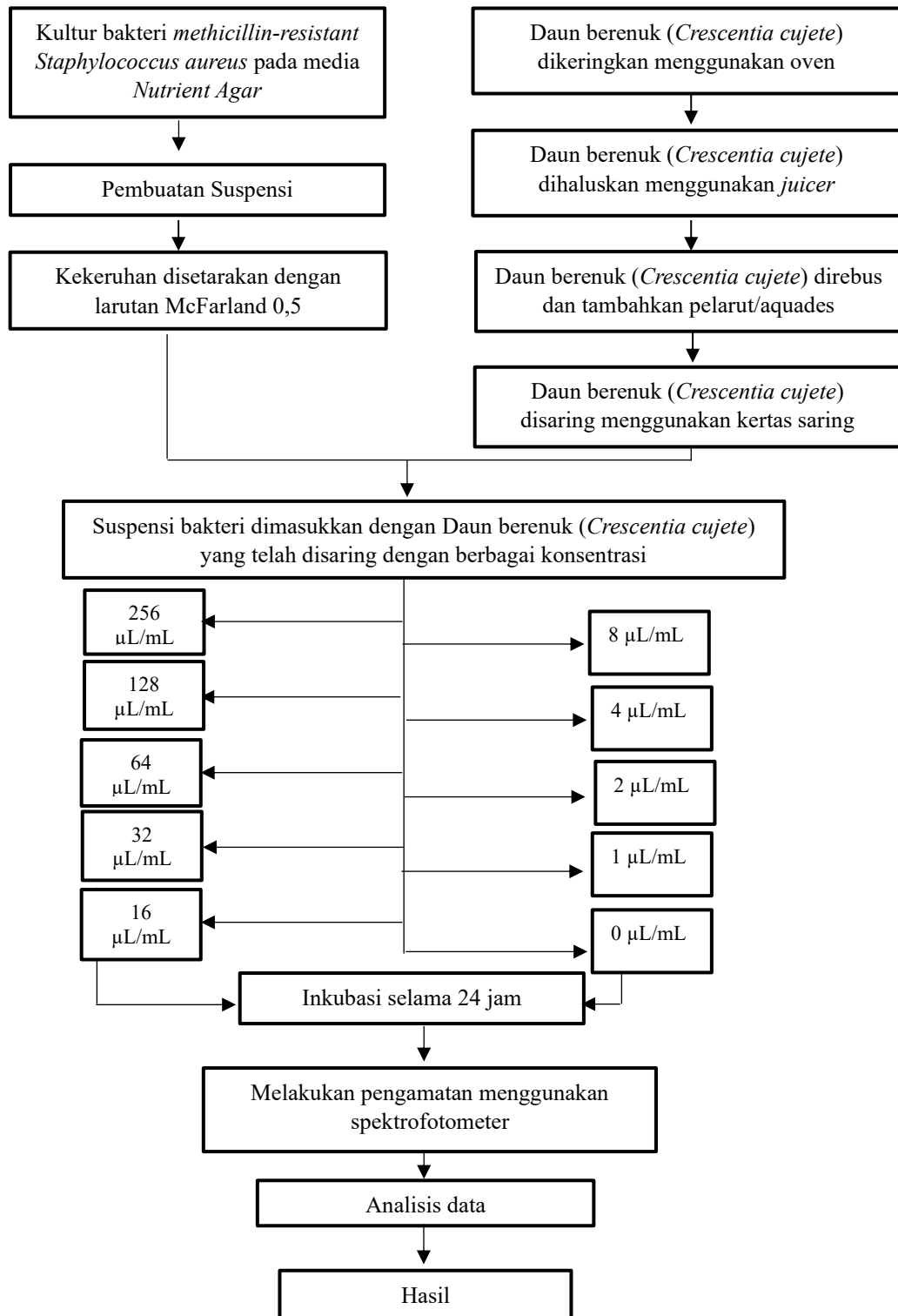
Pertama hitung total jumlah bakteri dalam sampel menggunakan uji *total plate count* (TPC). Masukkan sebanyak 1mL dari setiap Pengenceran ke dalam media *Nutrient Agar* lalu inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, hitung koloni menggunakan *colony counter*.

Setelah itu, dilanjutkan dengan menentukan konsentrasi agen antimikroba menggunakan uji *minimum bactericidal concentration* (MBC). Gunakan sampel dari uji TPC. Sampel diinokulasi ke dalam *Nutrient Agar* dan ditambahkan konsentrasi agen antimikroba. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, perhatikan hasilnya. Catat konsentrasi agen antimikroba terendah di mana tidak ada pertumbuhan bakteri yang terlihat pada media.

3.6. Analisis Data

Data hasil penelitian diolah menggunakan *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) dan dilanjutkan uji *Post-Hoc* sebagai uji lanjutan untuk mendapatkan taraf signifikan ($\alpha = 0,05$) dari hasil uji MIC infusa daun berenek terhadap pertumbuhan *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*.

3.7. Kerangka Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Penelitian.