

III. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Bakteriologi Universitas Muhammadiyah Sidoarjo dan Laboratorium Mikrobiologi Universitas Wijaya Kusuma Surabaya pada tanggal 2 Desember-2 Januari 2024.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat

Adapun 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*, black disk, pinset, *object glass*, aluminium foil, penutup kaca, alat tulis, label dan tissue.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini antara lain; *Escherichia coli*. Daun kecombrang yang didapatkan secara online, media *Muller Hinton Agar* (MHA), *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA), etanol 96%, ekstrak daun kecombrang, *standard larutan Mc, farland* 0,5, pelarut DMSO (Dimetil Sulfoksida), media pepton, NaCl fisiologis, krista violet, safranin, lugol oil, emersi, aquades, alkohol 96%, antibiotik Tetrasiklin 30 µg.

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 *Escherichia coli*.

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 μ g dengan kontrol negatif menggunakan DMSO.

- **Variabel Terikat**

Daya hambat ekstrak daun kecombrang terhadap *Escherichia coli* dalam media *Mueller-Hiton Agar* (MHA) yang terbentuk dalam satuan millimeter (mm).

- **Variabel Kendali**

Escherichia coli dan Daun kecombrang.

3.3.3 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan lima perlakuan yaitu: K+ (Kontrol positif menggunakan tetrasiklin), K- (Kontrol negatif menggunakan DMSO), P1

(Menggunakan ekstrak daun kecombrang 65%), P2 (Menggunakan ekstrak daun kecombrang 75%), P3 (Menggunakan ekstrak daun kecombrang 85%).

Berdasarkan rumus Federer (1977) sampel yang digunakan dengan jumlah 5 perlakuan adalah 25 sampel.

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

Keterangan

n: Jumlah ulangan

t: Jumlah perlakuan

Bila menggunakan rumus tersebut, maka dapat ditemukan jumlah sampel perlakuan yaitu:

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

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

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

3.3.4 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%

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan Ekstrak Daun Kecombrang

Daun kecombrang didapat online sebanyak sepuluh kilogram lalu di jemur hingga kering dan dibuat serbuk dengan cara di blender dan diayak dengan menggunakan ayakan mesh ukuran 40. daun kecombrang yang menjadi serbuk ditimbang sebanyak 500 gram untuk dibuat 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.

3.4.2 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Daun Kecombrang

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 μ l ekstrak daun kecombrang di campur dengan DMSO 350 μ l sampai volume 1 ml.

- Pembuatan Konsentrasi 75%

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

- Pembuatan Konsentrasi 85%

Pembuatan ekstrak dengan konsentrasi 85% yaitu, 850 μ l daun kecombrang di campur dengan DMSO 150 μ l sampai volume 10 ml

3.4.3 Isolasi dan Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*

Tahap awal pelaksanaan dimulai dengan mengambil sejumlah koloni bakteri *Escherichia coli* di streak pada media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) untuk peremajaan, pada media EMBA koloni bakteri *Escherichia coli* berwarna hijau dan membentuk koloni yang bundar, cembung, dan halus dengan tepi yang nyata.

Pewarnaan gram bakteri *Escherichia coli* hasil yang dibapat bakteri gram negative yang berbentuk batang pendek atau sering disebut kokobasil. E.memiliki panjang sekitar 2 μ m, diameter 0,7 μ m, lebar 0,4-0,7 μ m, dan bersifat anaerob fakultatif.

3.4.4 Uji Biokimia

3.4.4.1 Uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)

Hasil uji TSIA pada isolat *Escherichia coli* menunjukkan perubahan warna kuning pada media pada bagian miring (slant) dan bawah (butt) dan muncul gas yang menyebabkan media jadi terangkat, akan tetapi tidak terlihat adanya H₂S. Hal ini bisa terjadi karena adanya perubahan warna kuning pada media TSIA menunjukkan bahwa bakteri *Escherichia coli* dapat memfermentasi glukosa yang menghasilkan gas (Leboffe dan Pierre., 2011).

3.4.4.2 Uji *Sulfide Indol Motility* (SIM)

Media Sulfide Indole Motility (SIM) merupakan media semi solid berwarna krem Hasil positif (motil) pertumbuhan bakteri akan menyebar menjauhi garis inokulasi dan terjadi migrasi (pergerakan) didalam media sehingga media menjadi keruh (turbid) dan hasil negatif (non motil) pertumbuhan hanya terlihat di sepanjang garis inokulasi dan media tidak menjadi keruh. membuktikan bahwa *Escherichia coli* mampu menghasilkan enzim triptophase dengan mengubah asam amino triptofan dalam medium SIM menjadi Indol, amoniak, dan asam piruvat secara deaminasi dimana dimetilaminobenzaldehid (komposisi pada reagen Kovac) akan bereaksi dengan indol menjadi quinoidal merah (Tantri, 2017).

3.4.4.3 Uji *Simmon's Citrate Agar* (SCA)

Uji SCA merupakan uji yang dilakukan untuk mendeteksi kemampuan bakteri dalam memfermentasikan sitrat sebagai sumber karbon yang terkandung

pada media, dengan bantuan enzim citrate permease sehingga menyebarkan sitrat ke dalam sel yang ditandai dengan terbentuknya perubahan warna pada media. Bakteri *Escherichia coli* merupakan salah satu bakteri yang tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon utamanya, sehingga akan menunjukkan hasil negatif (Sapitri dan Afrinasari, 2019).

3.4.4.4 Uji Urease

Uji urease pada isolat *Escherichia coli* menunjukkan hasil yang negatif karena tidak adanya perubahan warna pada medium, warna tetap berwarna orange. Itu artinya *Escherichia coli* tidak dapat menghidrolisis urea karena tidak mempunyai enzim urease. Urease merupakan produk dekarboksilasi asam amino tertentu yang dapat dihidrolisis menjadi amonia dan karbon dioksida dengan bakteri yang mengandung enzim urease (Leboffe, and Pierre., 2011).

3.4.4.5 Uji MR

Uji MR digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam melakukan fermentasi asam campuran. Hasil uji MR pada isolat *Escherichia coli* menunjukkan hasil yang positif karena ditunjukkan dengan perubahan warna merah pada media. Hal ini bisa terjadi karena suatu organisme yang melakukan fermentasi asam campuran akan menghasilkan asam yang cukup sehingga terjadi penurunan hasil pada pH (Hemraj, *et.al.*, 2013).

3.4.4.6 Uji VP

Hasil uji VP pada isolat *Escherichia coli* menunjukkan hasil yang negatif karena ditunjukkan dengan tidak adanya perubahan warna pada media, itu artinya *Escherichia coli* tidak dapat menghasilkan acetoin (Hemraj, et.al., 2013).

3.4.5 Pembuatan Suspensi Bakteri *Escheerichia coli*

Bakteri *Escherichia coli* yang telah dicek kemurniannya diambil sejumlah 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 kekeruhandisamakan dengan standar Mc.Farland 0,5 atau setara dengan $1 \times (10^6 - 10^8)$ (Mpila dkk., 2012).

3.4.6 Pengujian Sensitivitas Antibakteri

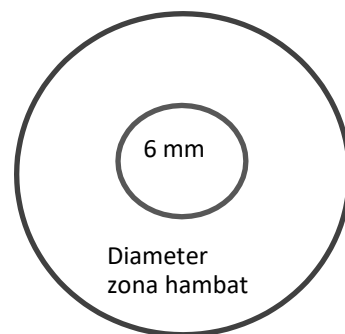
Uji sensitivitas antibakteri ekstrak daun kecombrang dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dengan menggunakan difusi cakram disk. Bakteri yang telah diuji dengan standart Mc. Farland diambil sebanyak 0,1 ml dan ditetaskan pada media MHA setelah itu diratakan dengan menggunakan metode *streak* dengan diamkan selama 10 menit. Media MHA yang telah di tambahkan suspensi bakteri dibiarkan sampai memadat. Sebelumnya rendam kertas cakram kedalam masing-masing konsentrasi ekstrak daun kecombrang yaitu 65%, 75% dan 85%. Kemudian letakkan kertas cakram yang telah direndam kedalam media MHA. Pada setiap cawan petri yang berisi media MHA 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 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 (Kipimbob, 2019).

3.4.7 Pengamatan Zona Hambat Minimum

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 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. Menghitung nilai presentase diameter zona hambat pertumbuhan bakteri dapat menggunakan rumus PIDG (*Percentage Inhibition of Diametre Growth*) sebagai berikut (Widhowati dkk., 2022).

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

Keterangan :

A = Diameter zona cakram bening

B = Ukuran kertas cakram

3.6 Analisis Data

Analisis data untuk mengetahui efektivitas daun kecombrang sebagai antibakteri alami terhadap *Escherichia coli* 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 $\alpha=0,05$.

3.7 Kerangka Penelitian

