

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rencana Penelitian

Jenis penelitian ini adalah observasional dengan pendekatan *cross sectional* yaitu penelitian yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanolik tanaman Sarang semut terhadap bakteri *Salmonella typhi* dari isolat pasien klinis dan kultur bakteri dari laboratorium Universitas Setia Budi. Penelitian ini dilakukan dengan cara mengekstrak tanaman sarang semut yang telah dibuat dari beberapa konsentrasi (25%, 50%, 75%, 100%), kemudian diuji daya hambat antibiotiknya, zona hambat yang terbentuk dibandingkan dengan kontrol positif (antibiotik) dan kontrol negatif (DMSO 2%) untuk difusi, Sedangkan dilusi menggunakan beberapa konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25 %, 3,125 %, 1,56%.

B. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari-Juni 2019. Tempat penelitian yang digunakan untuk penelitian yaitu di Laboratorium Fitokimia dan Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tumbuhan Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*) yang tumbuh didaerah Wamena, Provinsi Papua.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah umbi Sarang semut yang diambil dari daerah asalnya.

D. Variable Penelitian

1. Identifikasi Variable Utama

Variable utama adalah aktivitas antibakteri dari ekstrak Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*) terhadap *Salmonella typhi*.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama dapat dibedakan dari berbagai macam variable, yaitu variable bebas dan variable tergantung.

a. Variable bebas

Variable bebas dari penelitian ini adalah ekstrak etanolik umbi sarang semut (*Myrmecodia pendens*).

b. Variable tergantung

Variable tergantung dari penelitian ini adalah diameter zona hambat yang terbentuk dari bakteri *Salmonella typhi* dari kultur Laboratorium dan sampel kultur isolat rumah sakit.

3. Definisi Oprasional Variabel Utama

- a. Sampel uji adalah ekstrak umbi Sarang Semut (*Myrmecodia penden*) yang tumbuh di Wamena, Provinsi Papua yang diambil lalu di jemur kering udarakan sampai Nampak kering atau kadar airnya berkurang.
- b. Serbuk Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*) merupakan tanaman yang diambil dari pohon lalu dipotong potong sesuai ukuran dijemur, setelah itu dikeringkan mengguakan oven hingga kering lalu dibuat menjadi serbuk dan diayak menggunakan ayakan nomor 40.
- c. Ekstrak etanolik sarang semut didapatkan dari sumber penyaringan Sarang semut dengan metode perkolasi dengan pelarut etanol 96%.
- d. Aktivitas antibakteri menggunakan uji yang ditentukan dengan metode difusi dengan mengukur luas zona hambat dengan mengguakan kontrol positif antibiotik Cloramphenicol dan kontrol negetif DMSO 2%.

E. Bahan dan Alat

1. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*).

2. Bakteri Uji

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Salmonella typhi* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi

Universitas Setia Budi, Surakarta dan isolasi sampel dari RSUD Moewardi.

3. Media

Media yang digunakan adalah *Mueller Hilton Agar* (MHA), *Brain Heart Infusion* (BHI), *Salmonella Selektif Agar* (SSA), medium *Kligler Iron Agar* (KIA), *Simmon Citrat Agar* (Citrat), *Sulfida Indol Montility* (SIM), *Lysine Iron Agar* (LIA).

4. Bahan lain

Bahan lain yang digunakan adalah: Spirtus, cat Gram A (*Kristal violet*), Gram B (*Lugol iodine*), Gram C (*Alkohol*), Gram D (*Safranin*).

5. Alat penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah: nampan, kain, tabung reaksi, cawan petri, ayakan, evaporator, timbangan analitik, autoclave, incubaror, oven, satu set alat perkolasi, mesin penggiling, mikroskop, rak tabung, kapas, ose, batang pendeduk, beaker glas, lampu Bunsen, inkas, mistar, botol sampel steril, alat pelindung diri lengkap.

F. Prosedur penelitian

1. Deskripsi tanaman

Tahap pertama penelitian adalah melakukan determinasi tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*). Determinasi tanaman dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman dengan ciri-ciri morfologi baik secara makroskopis maupun secara mikroskopis tanaman

Sarang Semut. Determinasi tanaman dilakukan dilaboratorium Mikrobiologi Dan Fitokimia Universitas Sebelas Maret.

2. Penentuan Kadar Air Serbuk Sarang Semu

Penentuan kadar air serbuk Sarang Semut ditimbang sebanyak 20 gram dan masukan pada labu alas bulat kemudian ditambahkan *xylene* 100 mL atau sampai semua bahan terendam. Pasang alat destilasi *Bidwell sterling* dan dipanaskan dengan api kecil, pemanasan dihentikan apabila sudah tidak ada air yang terdestilasi pada skala *receiver*.

3. Pembuatan ekstrak etanolik Sarang Semut

Mula-mula serbuk sarang semut yang didapat ditimbang sesuai kebutuhan, masukan ke dalam wadah kemudian dibasahi dengan pelarut (10 bagian bahan 2,5-5 bagian pelarut) diaduk sampai rata, ditutup dan didiamkan pada tempat yang terlindung dari cahaya selama 3 jam. Siapkan alat perkolasi, masukan bahan yang telah dibasahi ke dalam bejana perkolasi sedikit demi sedikit sambil sesekali ditekan, kemudian masukan kertas saring diatas permukaan serbuk, meneteskan pelarut dari corong pisah ke dalam serbuk dengan kecepatan 1 mL/ menit sampai didapat pelarut setinggi 1cm di atas permukaan serbuk, lalu didiamkan selama 24 jam, meneteskan pelarut dan filtrate dengan kecepatan yang sama (1 mL/menit) sampai filtrate berwarna jernih. Ekstrak yang didapat kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C sampai pelarut etanol habis. Kemudian didapatkan hasil ekstrak etanolik umbi sarang semut

4. Pembuatan presentase konsentrasi ekstrak umbi Sarang Semut

Pembuatan Ekstrak umbi sarang semut dapat dilihat pada tabel dibawah ini

Tabel 1. Konsentrasi ekstrak umbi Sarang Semut

Konsentrasi ekstrak umbi sarang semut	Ekstrak etanolik umbi sarang semut	DMSO 2% (mL)
25%	0,25 mL	0,75mL
50%	0,5 mL	0,5 mL
75%	0,75 mL	0,25 mL
100%	1 mL	0

5. Uji bebas etanol

Ekstrak pekat diuji bebas etanol dengan cara uji eksterifikasi. 5 tetes ekstrak pekat tambah 5 tetes asam asetat dan 2 tetes asam sulfat pekat kemudian dipanaskan. Hasil uji dinyatakan bebas etanol jika tidak ada bau eter yang khas.

6. Identifikasi golongan senyawa

a. Flavonoid

Sebanyak 2 mL ekstrak di tambah 2 ml etanol 95%, 0,05 Gram serbuk seng dan 2 mL HCN 2N. larutan dididihkan selama 2 menit dan kemudian ditambahkan 2 ml HCL pekat, hasil positif jika terbentuk warna merah jingga atau kuning (Rummanggit *et al.*, 2015)

b. Polifenol

Sebanyak 2 mL sampel di larutkan dalam aquades 10 mL, dipanaskan 5 menit lalu disaring, filtrate ditambah 4-5 FeCL₃ 5%

adanya fennol ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman (Rummanggit *et al.*, 2015)

c. Tanin

Sebanyak 2 mL ekstrak ditambahkan 2 mL air dan kemudian di tambahkan beberapa tetes FeCl_3 1%. Hasil positif jika terbentuk larutan berwarna biru kehitaman (Rummanggit *et al.*, 2015)

7. Pembuatan media Mueller Hilton agar (MHA)

Mueller Hilton agar (MHA) ditimbang sebanyak 28,5 gram, di masukan ke dalam panci dan ditambah aquades sebanyak 750 mL selanjutnya dipanaskan hingga larut. Dimasukan ke dalam *bacer glass* kemudian di tuangkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 10 mL dan di tutup dengan kapas lalu disterilkan dengan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit. Didinginkan $\pm 50^\circ\text{C}$ selanjutnya di tuangkan kedalam cawan petri steril. Setelah dingim, medium dapat dibungkus dengan kertas dan disimpan ke dalam kulkas.

8. Pembuatan Media Brain Heart Infusion (BHI)

Brain Heart Infusion (BHI) ditimbang sebanyak 1,85 gram, dimasukan ke dalam panci dan ditambah aquades sebanyak 50 mL selanjutnya dipanaskan lalu dimasukan kedalam *backer glass* kemudian dituangkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 5 mL dan disumbat dengan kapas lalu disterilkan ke dalam *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit, setelah dingin dibungkus dengan kertas dan disimpan ke dalam kulkas.

9. Pembuatan Media *Salmonella Sigela Agar* (SSA)

Salmonella sigela agar (SSA) ditimbang sebanyak 6,3 Gram, kemudian ditambahkan aquadest steril sebanyak 100 mL, dipanaskan hingga larut lalu tuang ke dalam cawan petri steril berdiameter 15 cm, medium di biarkan memadat, kemudian dimasukkan ke dalam lemari es.

10. Pembuatan *Kliger Iron Agar* (KIA)

Kliger Iron Agar (KIA) ditimbang 1,1 gram, kemudian ditambahkan aquades steril sebanyak 20 mL, panaskan hingga larut lalu tuang ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 mL kemudian disumbat dengan kapas dan di sterilkan mengguakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian miringkan tabung sehingga medium membentuk lereng dan dasar, didinginkan dan dimasukkan ke dalam kulkas.

11. Pembuatan Media *Sulfida Indol Moltility* (SIM)

Sulfida Indol Moltility (SIM) ditimbang sebanyak 0,6 gram, kemudian ditambahkan aquades steril sebanyak 20 mL, panaskan hingga larut masukan ke dalam tabung reaksi sebanyak 3 mL kemudian disumbat dengan kertas dan disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit, tabung didirikan dalam keadaan berdiri tegak dan di masukan ke dalam kulkas.

12. Pembuatan Media *Lysine Iron Agar* (LIA)

Lysine Iron Agar (LIA) ditimbang sebanyak 0,64 gram, kemudian di tambahkan aquades steril sebanyak 20 mL, panaskan hingga larut lalu tuangkan ke dalam tabung reaksi 5 mL, panaskan hingga larut lalu tuang

ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 mL kemudian disumbat dengan kapas dan disterilkan menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit, kemudian miringkan tabung sehingga media membentuk lereng dan dasar, dinginkan dan masukan ke dalam kulkas.

13. Pembuatan Media *Simmon Citrat* (Citrat)

Simmon Citrat (Citrat) di timbang sebanyak 0,46 gram, kemudian ditambahkan aquades steril sebanyak 20 mL, panaskan hingga larut lalu tuang ke dalam tabung reaksi 5 mL kemudian disumbat dengan kapas dan di sterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian miringkan tabung hingga tabung membentuk lereng dan dasar, dinginkan dan masukan ke dalam kulkas.

14. Identifikasi bakteri dari sampel pasien dan kultur laboratorium

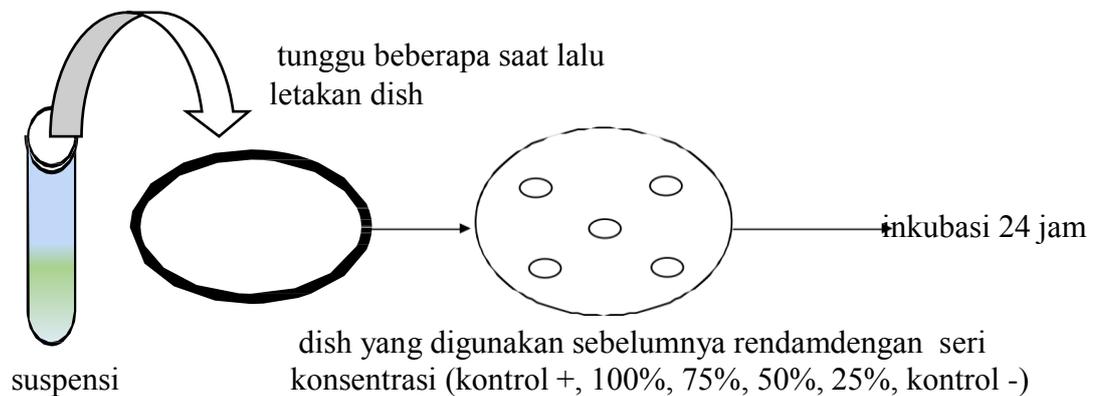
a. Pembuatan suspensi

Isolasi bakteri sampel pasien rumah sakit dan kultur laboratorium dari media SSA diinokulasikan pada media BHI, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kekeruhan yang terbentuk pada BHI diambil 1-2 ose dan dimasukan kedalam BHI steril kemudian dihomogenkan dengan Fortex lalu dibandingkan dengan standar *Mac. Farland*. Suspensi ini yang digunakan untuk uji sensitivitas.

b. Metode

1) Difusi

Kapas lidi yang telah dicelupkan kedalam suspensi yang sudah disamakan dengan standart *Mac. Farland* kekeruhannya dan tunggu beberapa menit agar cairan meresap kedalam kapas lidi steril kemudian diangkat dan diperas dengan cara menekannya pada dinding tabung bagian dalam dan diutar-putar setelah itu kapas lidi steril di swab secara merata ke media MHA yang telah dibuat kemudian masukan dist yang telah diisi dengan konsntrasi tertentu, kontrol positif dan kontrol negatif inkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Perlakuan tersebut dilakukan 3 kali pengulangan.

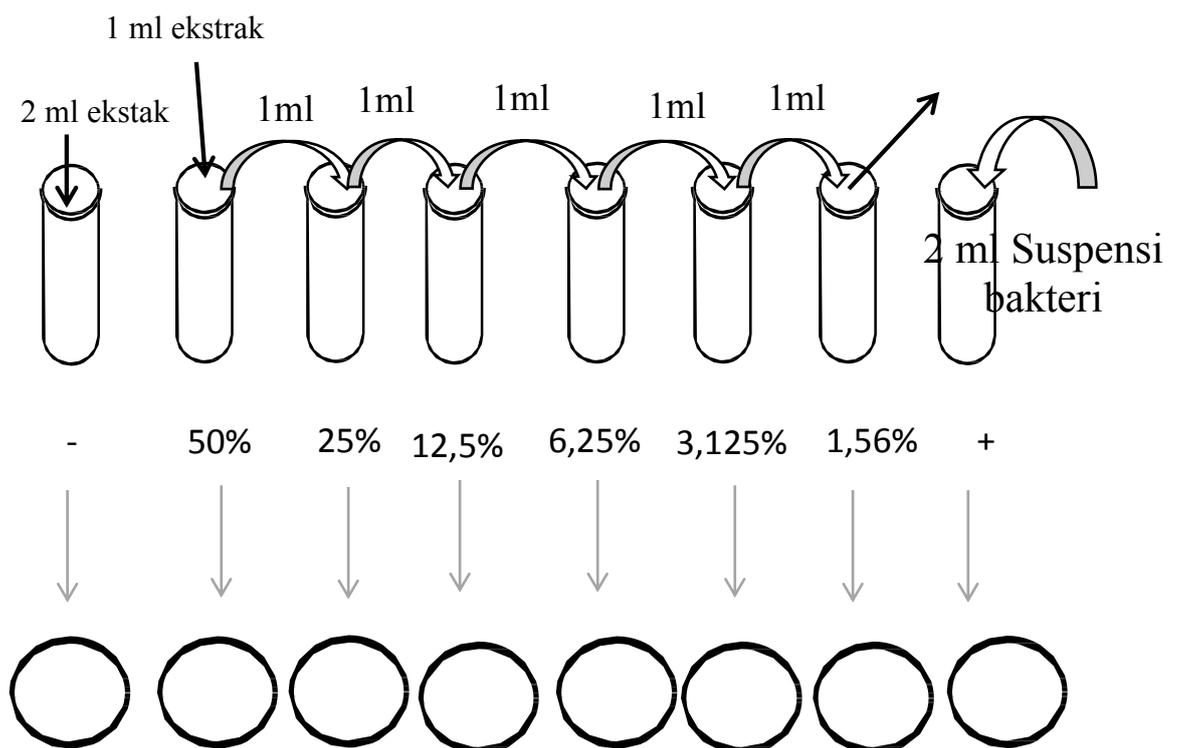


Gambar 1. Prosedur metode difusi

2) Dilusi

Metode dilusi digunakan untuk mengetahui konsentrasi terendah sediaan yang dapat menghambat membunuh bakteri uji. Metode dilusi menggunakan 8 tabung reaksi steril terdiri

dari 6 tabung reaksi steril sebagai seri konsentrasi ekstrak Sarang Semut dan 2 tabung steril sebagai kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif dimasukan sebanyak 2 mL suspensi bakteri *Salmonella thypi*, sedangkan pada tabung reaksi steril kontrol negatif dimasukan 2 mL ekstrak Sarang semut. Larutan stok dibuat seri konsentrasi menjadi 6 seri konsentrasi meliputi 50%, 25%, 12,5%, 6,25 %, 3,125 %, 1,56%.



Gambar 2. Prosedur pengerjaan metode dilusi

c. Identifikasi mikroskopis

Pengecetan Gram: koloni bakteri yang telah dibuat preparat ditetesi dengan Gram A (Kristal violet) dengan waktu 60 detik, kemudian di bilas dan ditetesi Gram B (Lugol iodine) selama 60 detik, bilas dengan Gram C (alkohol) 15-30 detik, warnai kembali dengan Gram D (safranin) dengan waktu 60 detik, kemudian bilas dan keringkan. Hasil dilihat dibawah mikroskop dengan perbesaran 100 kali. Hasil pengecetan Gram pada bakteri *Salmonella typhi* yaitu bersifat Gram negatif yang berwarna merah dan berbentuk batang.

d. Identifikasi makroskopis

1) Menggunakan medium *Salmonella Selective Agar* (SSA) sampel diinokulasi dengan goresan menggunakan jarum ose steril pada medium *Salmonella Selective Agar* (SSA). Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

2) Menggunakan uji biokimia

Sampel di inokulasikan pada medium *Kliger Iron Agar* (KIA) dengan cara tusuk gores, medium *Sulfida Iron Moltolity* (SIM) dengan cara di tusuk, medium *Lysine Iron Agar* (LIA) dengan cara tusuk gores, medium *Simmon Citrat* (Citrat) dengan cara gores. Kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 18-24 jam.

e. Pembacaan hasil zona hambat

- 1) Diameter zona hambat bening > 20 mm = daya hambat sangat kuat
- 2) Diameter zona hambat bening 10-20 = daya hambat kuat
- 3) Diameter zona hambat bening 5-10 = daya hambat sedang
- 4) Diameter zonahambat bening <5 = daya hambat lemah

15. Standarisasi bakteri menggunakan *Mc.Farland*

Bakteri uji diambil 2 ose steril dan dimasukkan secara aseptis kedalam tabung reksi kedalam media yang berisi 5 ml media *Brain Heart Infusion* (BHI) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kekeruhan disetarakan dengan *Mc. Farland* $1,5 \times 10^8$ cfu/mL (1,5 mL Barium Klorida dalam 8,5 Asam Sulfat).

16. Pengujian aktifitas antibakteri

Kapas lidi steril dicelupkan ke dalam suspense bakteri yang sudah distandarkan kekeruhannya dengan *Mc,Farland* dan ditunggu hingga cairan meresap pada kapas. Kemudian suspense bakteri diinokulasikan merata pada media *Muller Hinton Agar* (MHA) kemudian didiamkan 5 menit. Papaer disk yang telah di rendam pada ekstrak ± 2 jam di letakkan diatas media *Muller Hinton Agar* (MHA). Kontrol positif antibiotik cloramphenicol dan kontrol negatif DMSO (2%). Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Perlakuan tersebut dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan.

G. Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh dari uji aktifitas antibakteri ekstrak etanolik Sarang Semut terhadap bakteri *Salmonella typhi* kultur murni dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta dan isolate pasien Dari RSUD Dr.Moewardi secara difusi teknik cakram kertas dianalisis dengan menggunakan uji statistik.

1. Analisis of Variance (One Way ANOVA)

Analisis of Variance (One ANOVA) satu jalan dengan software SPSS 21. Dengan syarat bila skala pengukura variable numeric, dan berdistribusi normal dan varians data sama dengan uji statistic tersebut maka dapat di putuskan:

- a. Bila $p < (0,05)$, maka hipotesis penelitian diterima (menolak H_0) yang berarti ada perbedaan variens data.
- b. Bila nilai $p > (0,05)$ maka hipotesis penelitian ditolak (menerima H_0) yang berarti tidak ada perbedaan variens datanya.