

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Rancangan Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah penelitian observasional dengan pendekatan *cross sectional* yaitu penelitian yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanolik umbi Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*) terhadap *Staphylococcus aureus* kultur laboratorium dan kultur isolat sampel pasien rumah sakit. Penelitian ini dilakukan dengan cara mengekstrak umbi Sarang Semut yang telah dibuat menjadi beberapa konsentrasi (25%, 50%, 75%, 100%), kemudian diuji daya hambat antibakterinya dengan metode difusi dan dilusi.

#### **B. Waktu dan Tempat Penelitian**

##### **1. Waktu penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari sampai dengan bulan Juni 2019.

##### **2. Tempat penelitian**

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Fitokimia dan Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

#### **C. Populasi dan Sampel**

Subjek dalam penelitian ini adalah umbi Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*). Sedangkan objek pada penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* kultur laboratorium dan kultur isolat sampel pasien rumah sakit.

## **1. Populasi**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu umbi Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*) yang tumbuh di daerah Wamena, Papua.

## **2. Sampel**

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah umbi sarang semut yang diambil secara acak di daerah Wamena, Papua. Proses pengambilan dilakukan secara acak.

## **D. Variabel Penelitian**

### **1. Identifikasi Variabel Utama**

Variabel utama pada penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari ekstrak etanolik umbi Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

### **2. Klarifikasi Variabel Utama**

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas dan variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak umbi Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*). Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat yang terbentuk dari bakteri *Staphylococcus aureus* dari kultur laboratorium dan isolat sampel pasien rumah sakit.

### **3. Definisi Operasional Variabel Utama**

- a. Sampel uji adalah umbi Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*) diperoleh di daerah Wamena, Papua. Pengambilan sampel dilakukan secara acak.

b. Serbuk umbi Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*) dicuci bersih dan ditiriskan, kemudian dikering anginkan di udara dan dikeringkan dengan sinar matahari secara langsung dan tidak langsung dengan oven hingga kering, kemudian dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan 40 mesh.

c. Ekstrak etanolik umbi Sarang Semut adalah ekstrak yang diperoleh dari sumber penyarian umbi Sarang Semut dengan metode perkolasi dengan pelarut etanol 96%.

d. Aktivitas antibakteri adalah uji yang ditentukan dari metode difusi dengan mengukur diameter zona hambat dengan menggunakan kontrol positif antibiotik dan kontrol negatif DMSO (Dimetil Sulfoksida) dan metode dilusi dengan mengukur tingkat kejernihan sebagai parameternya dan pertumbuhan koloni pada media.

## **E. Alat dan Bahan**

### **1. Alat Penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alat pelindung diri, tabung perkolator, corong pisah, batang pengaduk, gelas ukur, cawan penguapan, erlenmeyer, penangas air, timbangan analitik, botol penampung spesimen, rangkaian *bidwell-sterling*, rak tabung reaksi, tabung reaksi, tabung vial, cawan petri steril, *beaker glass*, inkas, kaca objek, mikroskop, pinset, pembakar spiritus, jarum ose, kapas lidi steril, jarum ent, incubator, oven, autoclave, kompor.

### **2. Bahan penelitian**

Bahan yang digunakan untuk penelitian adalah:

**a. Sampel penelitian**

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak etanolik umbi Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*).

**b. Bakteri uji**

Bakteri uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* dari kultur laboratorium dan isolat sampel pasien rumah sakit.

**c. Media**

Media yang digunakan yaitu medium *Brain Heart Infusion* (BHI), *Vogel Johnson Agar* (VJA), *Mueller Hilton Agar* (MHA).

**d. Uji Sensitivitas Bakteri****1) Metode Difusi**

Bahan yang digunakan yaitu media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dan cakram disk dengan melihat daerah hambatan disekitar cakram disk.

**2) Metode Dilusi**

Bahan yang digunakan yaitu media *Brain Heart Infusion* (BHI) dengan mengukur tingkat kejernihannya dan media *Vogel Johnson Agar* (VJA) dengan melihat pertumbuhan koloni.

**e. Bahan Lain**

Bahan - bahan lain yang digunakan seperti: spiritus, cat gram (A,B,C, dan D), minyak imersi, aquadest, etanol 96%, DMSO 2%, ciprofloxacin, larutan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$  3%), larutan plasma citrat, HCL pekat, HCL 2N,  $FeCl_3$  1%, NaOH,  $H_2SO_4$  pekat, NaCl 10%.

## **F. Prosedur Penelitian**

### **1. Determinasi Tanaman**

Tahap pertama penelitian adalah melakukan deskripsi tanaman Sarang Semut. Deskripsi tanaman dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman Sarang Semut dengan ciri – ciri morfologi baik secara makroskopis maupun mikroskopis tanaman. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi Universitas Sebelas Maret Surakarta.

### **2. Preparasi Sampel**

Seribu gram umbi Sarang Semut yang sudah dipotong – potong dicuci bersih kemudian ditiriskan lalu dikeringkan dengan sinar matahari secara langsung, dilanjutkan dengan pengeringan menggunakan oven selama 5 hari. Sampel yang telah kering diserbukkan dengan menggunakan alat giling, kemudian diayak dengan ayakan 40 mesh dan disimpan dalam wadah tertutup.

### **3. Penetapan Kadar Air Serbuk Umbi Sarang Semut**

Penetapan kadar air serbuk umbi Sarang Semut dilakukan dengan menggunakan alat *bidwell sterling*. Caranya dengan ditimbang serbuk umbi Sarang Semut sebanyak 20 gram lalu dimasukkan kedalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut xylen sebanyak 125 ml, kemudian pasang alat *bidwell sterling*, lalu dipanaskan dengan api kecil, dihentikan bila tidak ada tetesan air lagi pada skala, kemudian diukur kadar air dengan melihat volume air pada skala tersebut.

#### **4. Pembuatan Ekstrak Perkolasi Umbi Sarang Semut**

Serbuk umbi Sarang Semut ditimbang 100 gram. Serbuk yang sudah ditimbang dimasukan ke beaker glass dan ditambah etanol 96%, ditutup dan didiamkan selama 3 jam, kemudian dimasukkan ke dalam bejana silindris yang diberi sekat berpori. Etanol 96% dialirkan dari atas ke bawah melalui serbuk secara terus menerus dengan kecepatan 1 mL/menit. Perkolasi dihentikan jika cairan yang keluar sudah tidak berwarna dan jika diuapkan tidak meninggalkan sisa. Kemudian dilanjutkan ke tahap pengentalan ekstrak.

#### **5. Uji Bebas Etanol**

Ekstrak umbi Sarang Semut yang telah dipekatkan dilakukan uji bebas etanol dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah dengan asam asetat dan asam sulfat pekat, kemudian dipanaskan. Hasil positif bebas etanol jika tidak tercium bau ester yang khas.

#### **6. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanolik Sarang Semut**

Skrining fitokimia terhadap ekstrak etanolik umbi Sarang Semut meliputi pemeriksaan flavonoid, tanin, dan polifenol.

##### **a. Identifikasi flavonoid**

Sebanyak 2 ml ekstrak ditambahkan 2 ml etanol 95%, 0,5 gram serbuk seng dan 2 ml HCl 2N. Larutan didiamkan selama 1 menit dan kemudian ditambahkan 2 ml HCl pekat. Hasil positif jika terbentuk warna merah jingga atau kuning (Rumanggit *et al.*, 2015).

### b. Identifikasi Tanin

Sebanyak 2 ml ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setelah itu ditambahkan 2-3 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  1%, jika bahan mengandung tanin maka akan dihasilkan larutan berwarna hijau kehitaman atau biru tua (Utami, 2014).

### c. Identifikasi Polifenol

Sebanyak 2 ml sampel dilarutkan dalam aquadest 10 ml, dipanaskan selama 5 menit kemudian disaring, filtrat ditambahkan 4-5 tetes  $\text{FeCl}_3$  5%. Adanya fenol ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua hijau kehitaman (Ningsih *et al.*, 2016).

## 7. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Etanolik Sarang Semut

Pembuatan konsentrasi ekstrak etanolik Umbi Sarang Semut dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1.** Konsentrasi Ekstrak Etanolik Umbi Sarang Semut

Konsentrasi Ekstrak Sarang Semut	Ekstrak Etanolik Sarang Semut	DMSO 2%(mL)
25%	0,25 mL	0,75
50%	0,5 mL	0,5
75%	0,75 mL	0,25
100%	1 mL	0

## **8. Isolasi dan Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus***

### **a. Isolasi dan Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus* dengan media VJA**

Isolasi dan identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan kultur pada media VJA. Prosedur kultur di media VJA untuk *Staphylococcus aureus* adalah:

1) Bakteri *Staphylococcus aureus* kultur laboratorium dan isolat sampel pasien diinokulasikan pada media BHI sebagai media pengaya. Media BHI diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

2) Bakteri dari media BHI diinokulasikan pada media VJA yang sebelumnya ditambah dengan kalium telurit 1% kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

3) Pembacaan koloni pada media VJA

Bentuk : Bulat

Warna koloni : Hitam

Tepi koloni : Halus

Permukaan : Cembung

### **b. Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus* dengan Uji Katalase**

Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan uji katalase. Prosedur uji katalase untuk *Staphylococcus aureus* adalah:

1) Lihat pertumbuhan koloni pada media VJA, koloni yang tumbuh akan diuji katalase.



- 2) Larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diteteskan di *object glass* kemudian ambil 1 ose koloni lalu dicampur dengan perlahan dan diamati adanya gelembung-gelembung udara.

**c. Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus* dengan Uji Koagulase**

Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan uji koagulase. Prosedur uji koagulase untuk *Staphylococcus aureus* adalah:

- 1) Lihat pertumbuhan koloni pada media VJA, koloni yang tumbuh diinokulasikan ke media BHI kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- 2) Media BHI mengalami kekeruhan
- 3) Satu mL larutan plasma citrat dimasukkan kedalam tabung reaksi steril kemudian ditambahkan 3-4 ose suspensi bakteri, dihomogenkan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- 4) Diamati adanya penggumpalan antara suspensi bakteri dengan plasma citrat.

**d. Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus* dengan Pengecatan Gram**

Ambil 1 ose bakteri dari media BHI ratakan di objek glass yang kering dan bebas lemak secara aseptis kemudian fiksasi sebentar. Genangi preparat dengan cat Gram A (Kristal Violet) tunggu 3 menit,

kemudian buang cat dan aliri dengan air. Genangi dengan Gram B (Lugol Iodin) tunggu 1 menit, kemudian buang cat dan aliri dengan air mengalir. Genangi dengan Gram C (Alkohol) tunggu sampai cat luntur, kemudian buang cat dan aliri dengan air mengalir. Genangi dengan Gram D (Safranin) tunggu 1-2 menit, kemudian buang cat dan aliri dengan air mengalir, tiriskan, preparat kering udarakan. Amati dengan mikroskop perbesaran 100x dengan minyak imersi.

### **9. Pembuatan Suspensi Bakteri`**

Isolat bakteri *Staphylococcus aureus* dari media VJA diinokulasikan pada media BHI, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kekeruhan yang terjadi pada media BHI kemudian diambil 1-2 ose dan dimasukkan ke BHI steril kemudian dihomogenkan dengan vortex lalu dibandingkan dengan standart *Mc. Farland*. Suspensi ini yang digunakan untuk uji sensitifitas.

### **10. Pengujian Aktivitas Antibakteri**

#### **a. Metode Kertas Cakram *disk diffusion***

Cakram kertas yang telah direndam larutan uji diletakan di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling cakram.

#### **b. Metode Dilusi**

Metode dilusi cair dilakukan dengan menyiapkan 8 tabung reaksi yang sudah steril dengan cara memasukkan bahan uji ke dalam masing- masing tabung reaksi kecuali tabung kontrol positif. Masing-masing tabung tersebut mempunyai

beberapa konsentrasi pengenceran yaitu 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, dan 1,56%. Masing-masing tabung diisi 0,5 ml media BHI dari tabung 2 sampai 7 secara aseptik, kemudian tabung 1 ditambahkan 1 ml ekstrak bahan uji, tabung 2 dimasukkan 0,5 ml larutan ekstrak bahan uji, kemudian dari tabung 2 dipipet ke dalam tabung 3 sebesar 0,5 ml, begitu seterusnya sampai tabung 7 dan dibuang. Tabung 2 sampai 7 ditambahkan 0,5 ml suspensi bakteri. Tabung 8 dimasukkan suspensi bakteri sebanyak 1 ml. tabung terakhir berlaku sebagai kontrol positif. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Diamati kekeruhan lalu dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif. Konsentrasi paling rendah yang tidak menunjukkan kejernihan adalah KHM sedangkan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan cara diinokulasi secara goresan pada media VJA diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Konsentrasi Bunuh Minimum ditunjukkan oleh media yang tidak menunjukkan pertumbuhan koloni pada media.

## **11. Pembacaan Hasil**

### **a. Metode Difusi**

Pembacaan hasil dilakukan setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C dengan melihat zona transparan (radikal) disekitar sumuran. Daerah bening merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap antibiotik atau bahan antibakteri lainnya yang digunakan sebagai bahan uji yang dinyatakan dengan lebar diameter (mm) menggunakan penggaris. Kemudian diameter zona hambat dikategorikan kekuatan daya antibakterinya berdasarkan penggolongan.

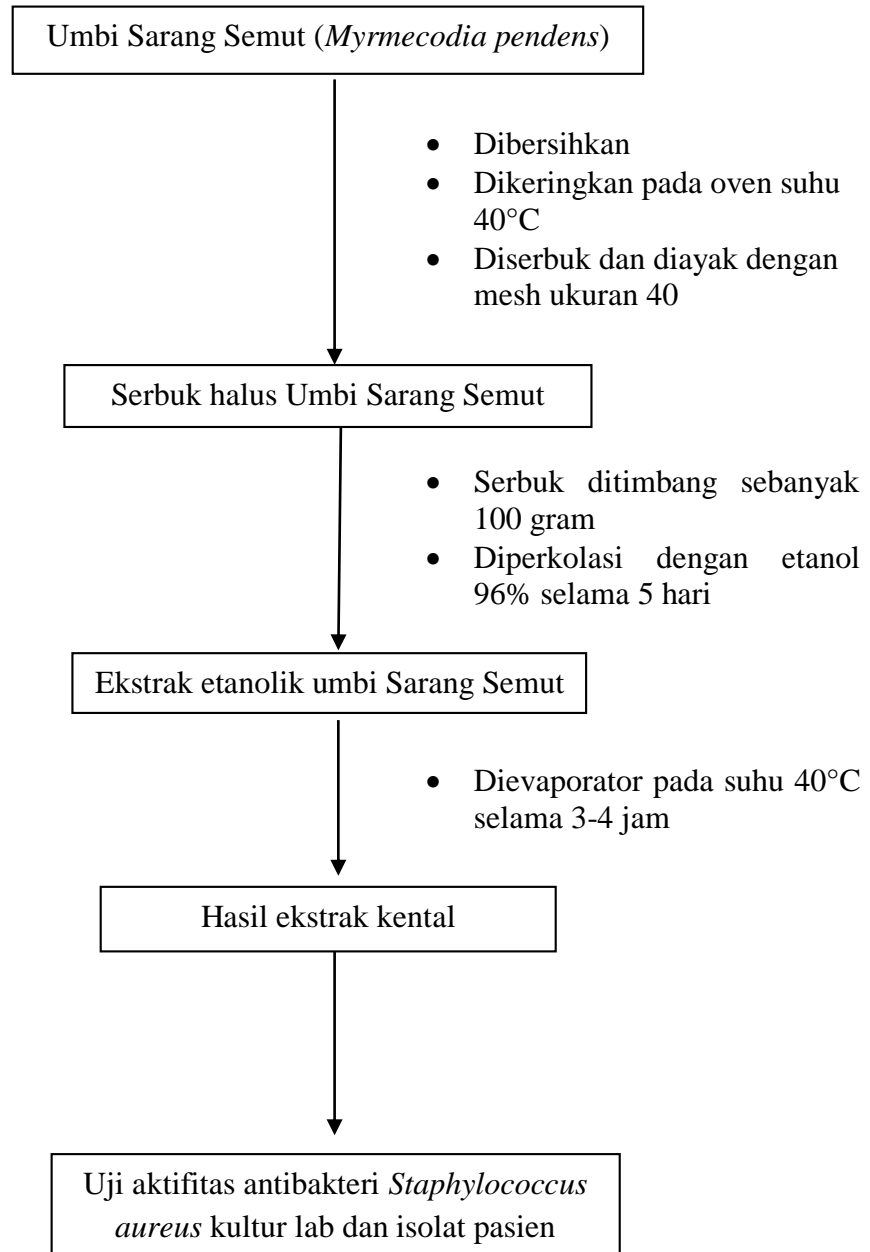
Widyasanti *et al.*, (2015), yaitu sebagai berikut:

- a. Diameter zona bening >20 mm artinya daya hambat sangat kuat.
- b. Diameter zona bening 11-20 mm artinya daya hambat kuat.
- c. Diameter zona bening 6-10 mm artinya daya hambat sedang.
- d. Diameter zona bening <5 mm artinya daya hambat lemah

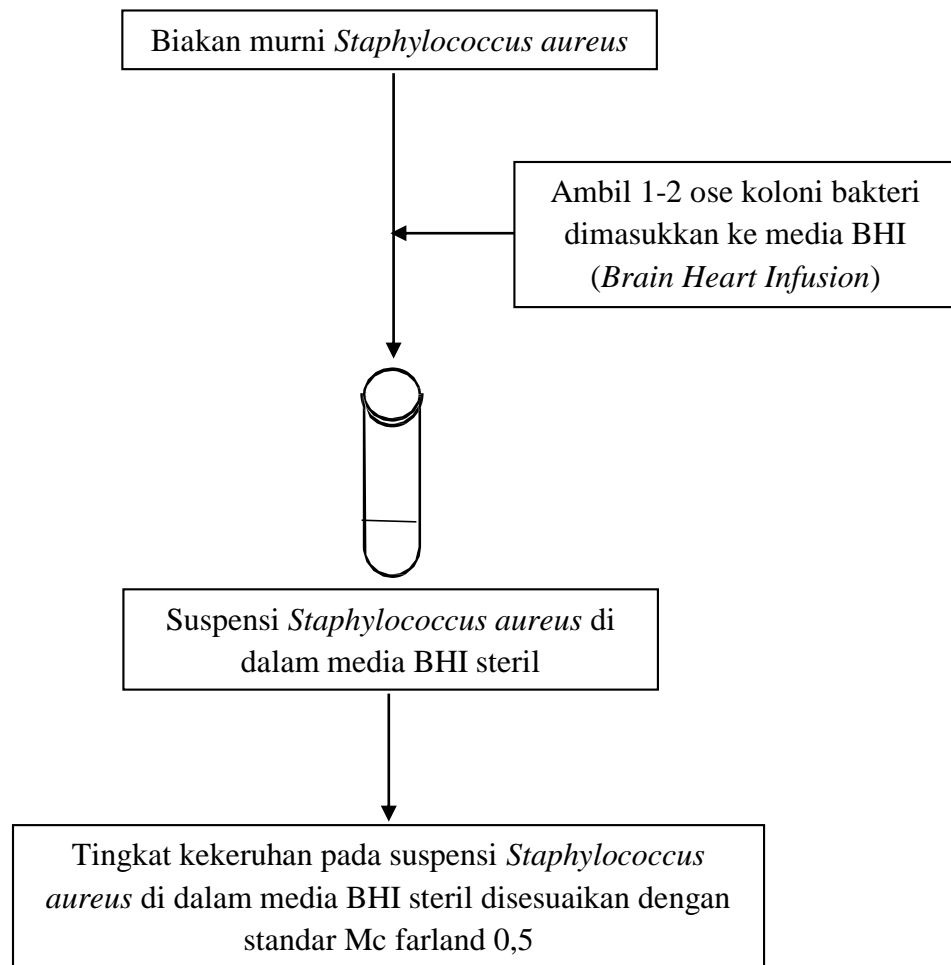
#### **G. Teknik Analisis Data**

Data yang diperoleh dari uji aktivitas antibakteri ekstrak etanolik Sarang Semut terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* kultur murni di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta dan kultur isolat pasien dari rumah sakit secara difusi cakram disk dianalisis dengan menggunakan uji statistik. Uji statistik yang digunakan adalah *Analisis of Varians (ANOVA) one way*. Analisa data dengan statistik dilakukan untuk mengetahui beda nyata atau tidak diameter hambat dan derajat kekeruhan dari bakteri *Staphylococcus aureus* kultur Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta dan kultur isolat pasien dari rumah sakit.

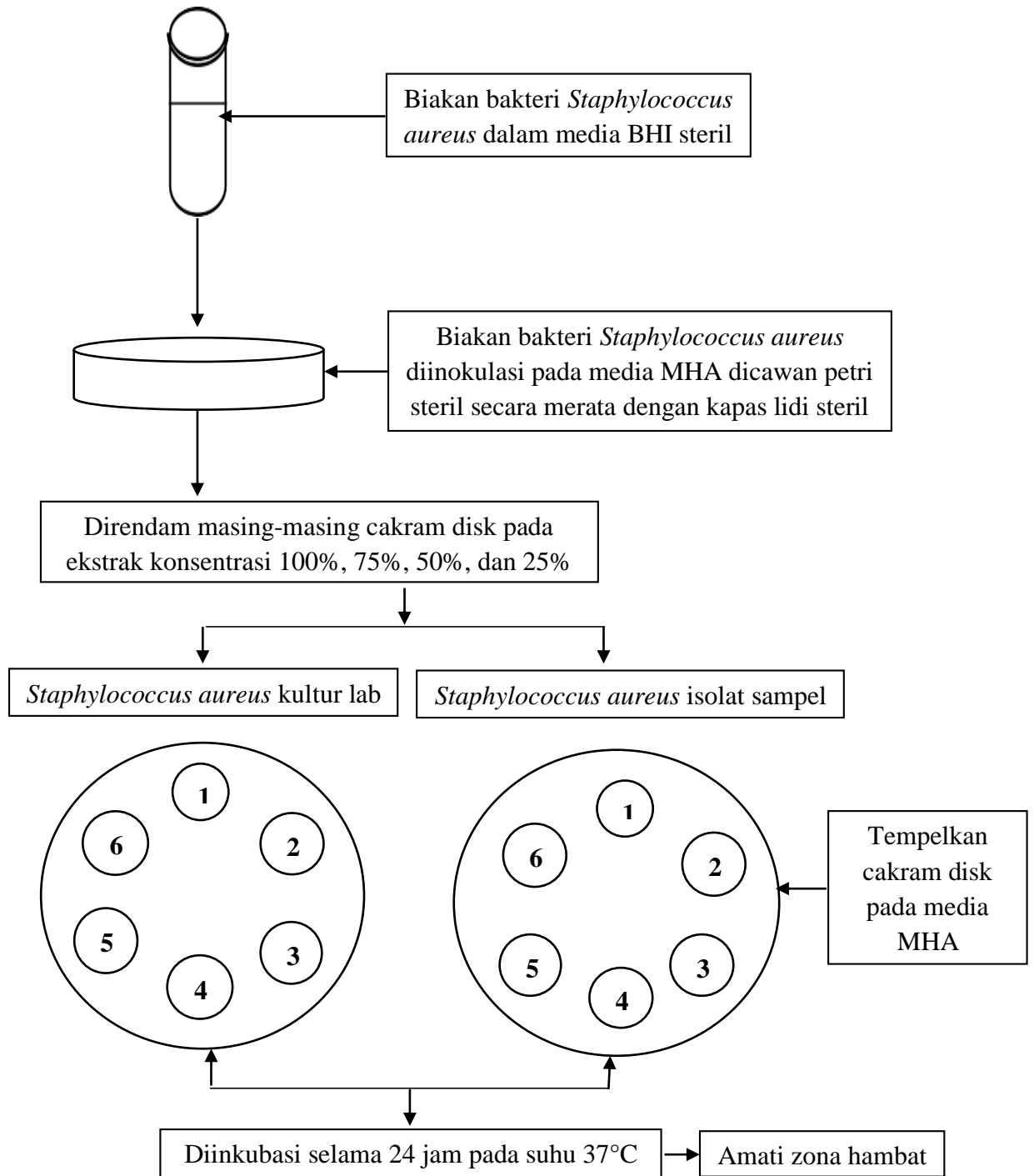
## H. Skema Jalannya Penelitian



**Gambar 1.** Skema Pembuatan Ekstrak



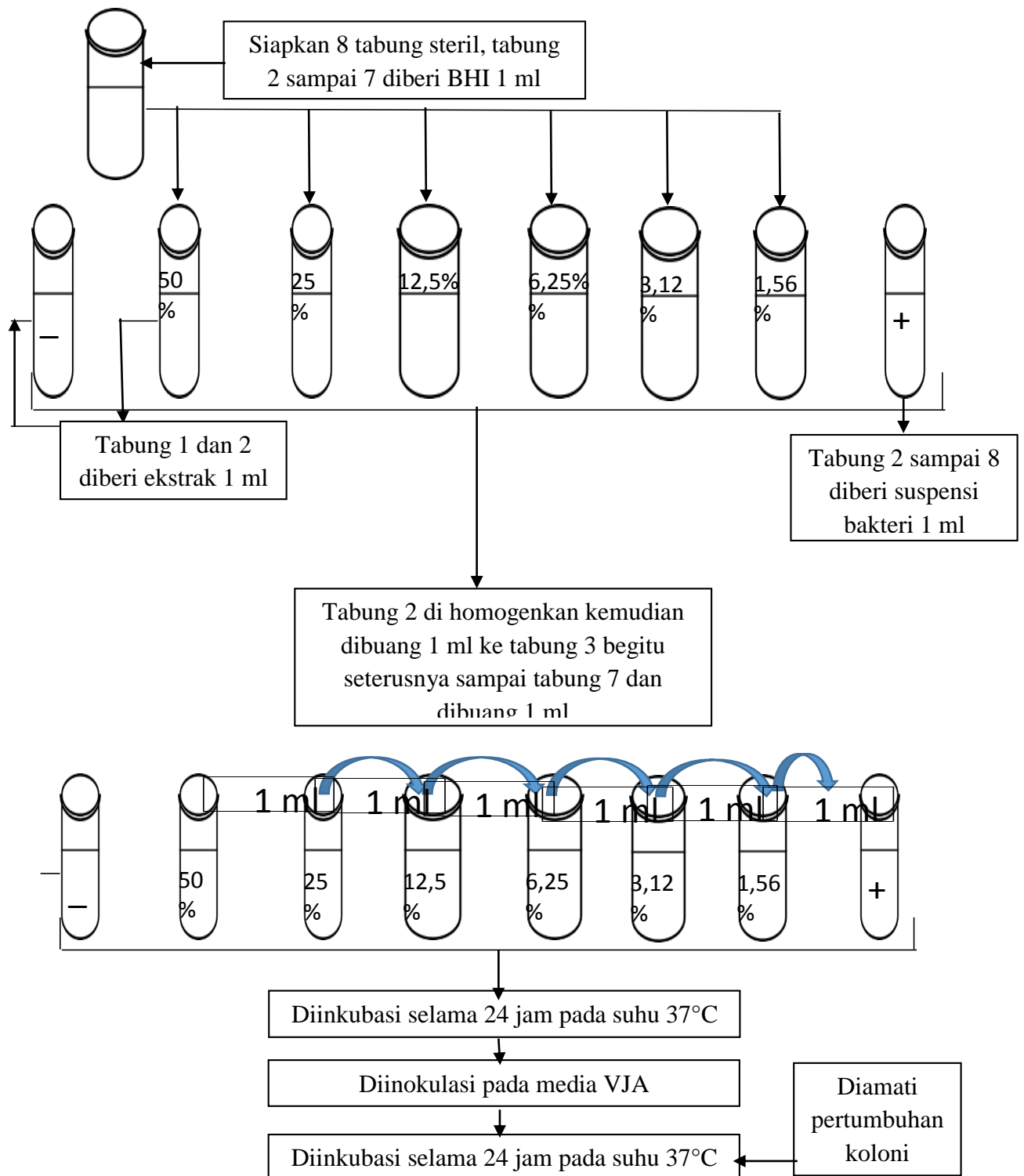
**Gambar 2.** Skema Pembuatan Suspensi Bakteri



Keterangan :

(1) Kontrol positif antibiotik Ciprofloxacin, (2) konsentrasi 100%, (3) konsentrasi 75%, (4) konsentrasi 50%, (5) konsentrasi 25%, (6) kontrol negatif DMSO 2%.

**Gambar 3.** Skema Uji Difusi



**Gambar 4.** Skema Uji Dilusi