

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

3.1.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium, dengan melakukan pengujian perbandingan aktivitas antibakteri ekstrak Meniran – Sambiloto dengan atau tanpa VCO pada *Staphylococcus aureus*.

3.1.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini berupa eksperimental murni (*True-Experimental Research*) dengan bentuk desain *Post-test Only Control Group*. Dimana dalam desain ini kelompok eksperimen dan kelompok kontrol tidak dipilih secara acak. Kelompok eksperimen disini adalah ekstrak Meniran-Sambiloto dengan dan tanpa VCO, sedangkan kelompok kontrol dibagi menjadi dua, yaitu kontrol positif (antibiotik Klindamisin) dan kontrol negatif (DMSO).

3.2 Definisi Operasional dan Variabel

3.2.1 Definisi Operasional

1. Ekstrak Meniran

Ekstrak Meniran merupakan ekstrak kental yang terbuat dari serbuk simplisia Meniran yang dimaserasi dalam pelarut etanol 96% untuk mendapatkan rendemen ekstrak.

2. Ekstrak Sambiloto

Ekstrak Sambiloto merupakan ekstrak kental yang terbuat dari serbuk simplisia Sambiloto yang dimaserasi dalam pelarut etanol 96% untuk mendapatkan rendemen ekstrak.

3. *Virgin Coconut Oil* (VCO)

Virgin Coconut Oil (VCO) merupakan salah satu produk olahan dari tanaman kelapa dengan salah satu kandungannya yaitu *Medium Chain Fatty Acid* (MCFA) yang berperan sebagai agen antivirus, antibakteri, dan antiprotozoa.

4. Maserasi

Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi konvensional. Maserasi dilakukan dengan cara memasukkan serbuk simplisia dalam pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:5 selama 3x24 jam, dilanjutkan remaserasi 3x24 jam dengan pelarut yang sama.

5. Antibakteri

Antibakteri merupakan zat yang mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri dan dapat membunuh bakteri patogen. Antibakteri dibedakan menjadi dua, yaitu menekan pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) dan membunuh bakteri (bakterisidal).

6. Bakteri *Staphylococcus aureus*

S. aureus merupakan bakteri gram positif berbentuk bulat dengan diameter 0,7–1,2 μm , berkelompok tidak teratur seperti buah anggur, tidak membentuk spora, fakultatif anaerob, dan tidak bergerak. Bakteri ini dapat tumbuh paling baik pada suhu 37°C.

7. Zona Hambat

Zona hambat merupakan daerah jernih yang terbentuk di sekitar sumur pada media pertumbuhan bakteri uji. Daerah jernih tersebut yang menunjukkan bahwa bakteri uji terhambat pertumbuhannya oleh senyawa antibakteri dalam sumur.

3.2.2 Variabel Penelitian

a. Variabel bebas (*independent*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak Meniran – Sambiloto dengan dan tanpa VCO.

b. Variabel terikat (*dependent*)

Variabel terikat dalam penelitian ini berupa diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*.

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian Perbandingan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Meniran – Sambiloto Dengan Atau Tanpa VCO Pada *Staphylococcus aureus* dilakukan pada

bulan Maret hingga Juli 2024 di Laboratorium Mikrobiologi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Panti Waluya Malang.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

- Autoklaf
- Inkubator
- Oven
- Waterbath
- Timbangan analitik
- Toples kaca
- Gelas ukur
- Batang pengaduk
- Corong kaca
- Tabung reaksi
- Rak tabung reaksi
- Hot plate
- Cawan penguap
- Bunsen
- Jarum ose bulat
- Cawan petri
- Mikropipet
- Blue tip

3.4.2 Bahan

- Serbuk simplisia Meniran
- Serbuk simplisia Sambiloto
- VCO
- Etanol 96%
- Bakteri *S. aureus*
- Klindamisin
- Media Nutrient Agar (NA)
- Media Nutrient Broth (NB)
- DMSO
- Aquades

3.5 Prosedur Kerja

3.5.1 Preparasi Sampel

Serbuk simplisia Meniran dan daun Sambiloto diperoleh dari UPT Laboratorium Materia Medica Batu. Serbuk kedua simplisia dibuat dari tanaman Meniran dan Sambiloto yang dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 60°C.

3.5.2 Ekstraksi Sampel

Ekstraksi sampel dilakukan menggunakan metode maserasi. Maserasi dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan antara serbuk simplisia dan etanol 96% adalah 1:5.

a. Meniran

Serbuk meniran sebanyak 100 gram dimasukkan dalam toples kaca, kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 500 ml.

b. Sambiloto

Serbuk sambiloto sebanyak 100 gram dimasukkan dalam toples kaca, kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 500 ml.

Maserasi dilakukan selama 3 hari berturut-turut dengan sesekali dilakukan pengadukan setiap harinya. Residu yang didapat kemudian diekstraksi kembali selama 3 hari dengan cara yang sama. Filtrat hasil maserasi dipekatkan dan dibuat menjadi ekstrak kental dengan diuapkan di atas *waterbath* pada suhu 50°C.

3.5.3 Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi Alat

Alat yang akan digunakan dicuci dan disterilisasi terlebih dahulu. Alat yang sudah dicuci dikeringkan terlebih dahulu menggunakan oven pada suhu 150°-170°C selama 10 menit. Alat disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya alat yang disterilisasi menggunakan autoklaf dikeringkan dengan oven pada suhu 70°C selama 30 menit.

b. Pembuatan Media NA

Media Nutrien Agar (NA) sebanyak 2,8 gram (Oxoid) dimasukkan dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan 100 ml aquadest dan dipanaskan di atas *hot plate* hingga terbentuk larutan jernih. Media NA perlu disterilisasi terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

c. Peremajaan Bakteri

Membuat media agar miring dengan menuangkan media NA sebanyak ± 5 ml ke dalam tabung reaksi, letakkan tabung reaksi dalam posisi miring dan biarkan memadat. Isolat bakteri diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan dengan pola zig-zag pada media agar miring, kemudian biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator.

d. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Membuat media NB dengan menimbang bahan sebanyak 0,8 gram dan dilarutkan dalam 100 ml aquadest, selanjutnya larutan media dimasukkan ke dalam tabung reaksi ± 10 ml dan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Inokula dari media agar miring diambil sebanyak 1 ose dan disuspensikan dalam media NB yang sudah disterilisasi. Biakan pada media NB diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator.

e. Pembuatan Larutan Sampel

Larutan sampel berupa ekstrak Meniran – Sambiloto dan ekstrak Meniran – Sambiloto dengan penambahan VCO.

1. Larutan ekstrak meniran dibuat dengan menimbang 100 mg ekstrak kental Meniran, kemudian dilarutkan dalam 10 ml DMSO.
2. Larutan ekstrak sambiloto dibuat dengan menimbang 100 mg ekstrak kental Sambiloto, kemudian dilarutkan dalam 10 ml DMSO.
3. Larutan VCO diukur sebanyak 10 ml, kemudian dilarutkan dalam 10 ml DMSO.

Formulasi larutan sampel dibuat sebagai berikut:

Tabel 3.1 Formula Sampel

Formula 1	Formula 2
Larutan Ekstrak Meniran 1 ml + Larutan Ekstrak Sambiloto 1 ml	Larutan Ekstrak Meniran 1 ml + Larutan Ekstrak Sambiloto 1 ml + Larutan VCO 1 ml

f. Pembuatan Larutan Kontrol

Larutan kontrol positif berupa larutan antibiotik Klindamisin (kapsul Klindamisin 300mg) dan larutan kontrol negatif berupa DMSO.

g. Pengujian

Suspensi bakteri uji dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan dalam cawan petri, kemudian media NA dituang sebanyak 15 ml ke dalam cawan petri. Homogenkan dengan menggoyangkan cawan petri secara perlahan, selanjutnya biarkan media memadat dan buat lubang sumuran sebanyak larutan sampel dan kontrol yang akan diujikan. Teteskan larutan sampel dan kontrol dalam lubang sumuran (1 lubang untuk 1 larutan), kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan sebanyak 4 kali replikasi.

h. Pengukuran Aktivitas Antibakteri

Pengukuran aktivitas antibakteri dilakukan dengan mengukur zona jernih atau *clear zone* yang merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap antibiotik atau bahan antibakteri lainnya. Aktivitas antibakteri dikatakan sangat kuat jika diameter zona hambatnya >20mm, kategori kuat antara 10-20 mm, kategori sedang antara 5-10 mm, dan lemah jika diameter zona hambatnya <5 mm (Emelda *et al.*, 2021). Pengukuran aktivitas antibakteri ini dilakukan menggunakan jangka sorong dan dinyatakan dalam satuan milimeter (mm).

$$\text{Zona hambat} = \frac{(D1 - D3) + (D2 - D1)}{2}$$

Keterangan: D1 = diameter vertikal

D2 = diameter horizontal

D3 = diameter sumur (± 5 mm) (Saputera *et al.*, 2019)

3.6 Analisa Data

Data hasil pengukuran aktivitas antibakteri ekstrak Meniran – Sambiloto dengan atau tanpa VCO dianalisa dengan menggunakan IBM SPSS *Statistics* 26.