

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah jenis penelitian eksperimental untuk melakukan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dari ekstrak daun kecombrang (*Etlintera elatior*) menggunakan metode difusi sumuran.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Stikes Panti Waluya Malang untuk pengujian antibakteri, Laboratorium Kimia Terpadu Stikes Panti Waluya Malang untuk melakukan pembuatan simplisia.

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan April - juni 2025.

3.3 Sampel Penelitian

3.3.2 Daun Kecombrang (*Etlintera elatior*)

Sampel Daun Kecombrang (*Etlintera elatior*) pada penelitian ini diambil dari Kota Batu Jawa Timur. Kriteria inklusi dari daun kecombrang dengan ciri khas warnanya hijau mengilap bagian pangkalnya berbentuk bulat dan menyerupai jantung, bagian tepinya bergelombang dan pada bagian ujung daunnya meruncing pendek. Pada bagian ujung daun terdapat bintik-bintik halus dan rapat. Memiliki tulang daun yang menyirip. Kriteria eksklusi daun kecombrang berwarna kuning, berlubang dan terdapat hama atau kotoran bekas hama.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam Penelitian ini yaitu:

- | | | |
|-----------------------|----------------------|--------------------------|
| a. Timbangan Analitik | i. Tabung Reaksi | r. Spuit 1 ml |
| b. Corong Kaca | j. Cawan Petri | s. Gelas piala |
| c. Oven | k. Bunsen | t. Jangka Sorong |
| d. <i>LAF</i> | l. Pipet | u. <i>colony counter</i> |
| e. Erlenmeyer | m. <i>Incubator</i> | v. Spatula |
| f. Labu ukur | n. Mikropipet | w. <i>Aluminium foil</i> |
| g. Gelas ukur | o. Rak tabung reaksi | x. Kertas payung |
| h. Wadah Maserasi | p. Cok borer | |
| i. Autoklaf | q. Ose bulat | |

3.4.2 Bahan

- Serbuk daun kecombrang (*Etilingera elatior*)
- Etanol 70%
- Kultur murni bakteri *Staphylococcus epidermidis*
- Nutrien Agar (NA)
- Serbuk Clindamycin
- Aquadest* steril
- NaCL 0,9%

3.5 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
Variabel Bebas: Daun Kecombrang <i>(Etilingera elatior)</i> Ekstrak daun Kecombrang <i>(Etilingera elatior)</i> Konsentrasi 25%, 50%, 75%	Daun Kecombrang <i>(Etilingera elatior)</i> adalah bagian dari tanaman kecombrang yang berwarna hijau mengkilap dengan ujung daun terdapat bintik- bintik halus dan rapat serta memiliki tulang daun yang menyirip. Ekstrak merupakan sebuah sediaan kental dari simplisia nabati yang sudah di ekstrak menggunakan metode maserasi dalam pelarut etanol 70%, kemudian yang akan dipekatkan menggunakan <i>waterbath</i> hingga diperoleh ekstrak kental.	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Warna Hijau mengkilap ➤ memiliki tulang daun menyirip ➤ terdapat bintik halus dan rapat Menggunakan rumus : $N1 \times V1 = N2 \times V2$ Yang dimana N1 yaitu konsentrasi awalnya dan N2 konsentrasi	Daun berwarna hijau mengkilap tidak berwarna kuning serta memiliki tulang daun menyirip dan ada bintik- bintik halus dan rapat Ektrak dari daun tanaman kecombrang konsentrasi 25%, 50% dan 75% dengan kontrol positif dari antibiotik clindamycin dan kontrol negatif <i>Aquadest</i>	Ordinal

		akhir. Sementar a V1 yaitu volume awalnya dan V2 volume akhir.		
--	--	--	--	--

<p>Variabel Terikat:</p> <p>Diameter Zona Hambat pada pertumbuhan bakteri <i>Staphylococcus epidermidis</i></p>	<p>Zona hambat merupakan daerah yang bening terdapat pada sekitar cakram yang menandakan tidak adanya pertumbuhan bakteri <i>Staphylococcus epidermidis</i> yang disebabkan karena adanya pengaruh dari ekstrak yang akan diuji. yang diukur menggunakan satuan mm dan Clindamycin sebagai kontrol positif.</p>	<p>Diukur diameter terluar dari zona bening pada sekitaran sumuran</p>	<p>Dengan melihat milimeter (mm) yang palingterkecil hingga sangat kuat</p>	<p>Ordinal</p>
--	---	--	---	----------------

3.5.2 Identifikasi Variabel

Pada penelitian ini terdapat dua bagian variabel yaitu variabel bebas dan variabel terikat.

a. Variabel Bebas

Variabel bebas yang masuk pada penelitian ini yaitu ekstrak etanol daun tanaman kecombrang (*Etlingera elatior*) dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%,

b. Variabel Terikat

Variabel terikat yang masuk dalam penelitian ini yaitu diameter zona hambat pada pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis*.

3.6 Cara Kerja

3.6.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan Sampel daun kecombrang (*Etlingera elatior*), diperoleh di Kota Batu Jawa Timur. Sampel yang diambil dengan kondisi daun berwarna hijau mengkilap dan masih bersih, tidak berwarna kuning dan tidak ada jamur yang tumbuh.

3.6.2 Pembuatan serbuk simplisia

Sampel daun kecombrang yang telah disiapkan, kemudian dipindahkan ke wadah lalu dicuci hingga benar-benar bersih dan kemudian sampel dikeringkan di oven pada suhu 60-80 derajat celsius hingga tidak ada terdapat sisa air. Kemudian simplisia yang sudah kering dibersihkan kembali dari kotoran yang menempel setelah itu didiamkan hingga hangat dan masukkan ke plastik bersih dan tertutup dengan baik.

3.6.3 Pembuatan Ekstrak Daun Kecombrang (*Etilingera elatior*)

Sampel daun kecombrang ditimbang sebanyak 210 gram, kemudian dimasukkan ke dalam wadah maserasi, lalu ditambahkan dengan pelarut etanol 70% 2940 ml dengan rasio bahan serta pelarut sebesar 1:14. Kemudian wadah yang sudah dilakukan perendaman ditutup dan disimpan selama 24 jam tanpa adanya sinar matahari langsung, sembari di aduk sesekali setiap 3 jam. Kemudian disaring sampelnya untuk dipisahkan antara ampas daun kecombrang dan filtratnya menggunakan kertas saring, kemudian ampas diekstraksi lagi dengan pelarut etanol. Setelah diperoleh filtratnya kemudian dilanjutkan pada proses penguapan pada waterbath untuk mendapatkan ekstrak kental daun kecombrang (*Etilingera elatior*).

3.6.4 Sterilisasi alat

a. Sterilisasi basah

Sterilisasi alat dilakukan dengan mencuci dan mengeringkan alat yang akan digunakan dalam penelitian. Alat dibungkus dengan kertas payung dan plastik. Pastikan semua alat berada pada kondisi aman dan tidak ada keretakan. Selanjutnya alat distrerilkan pada autoklaf dan atur pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15-20 menit.

3.6.5 Pembuatan Media Nutrien Agar Miring

Nutrient Agar ditimbang sebanyak 0,42 g dan dilarutkan ke dalam 15 ml aquades NA Oxoid(28g/1000ml) menggunakan erlenmeyer. Selanjutnya dihomogenkan dengan hot plate hingga mendidih. Sebanyak 7 ml dituangkan pada 2 tabung reaksi steril dan kemudian ditutup dengan sumbatan kapas. Media tersebut disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, dan dibiarkan pada suhu ruangan selama \pm 30 menit hingga media memadat pada kemiringan \pm 30°. Media agar miring digunakan untuk peremajaan bakteri.

3.6.6 Peremajaan biakan bakteri

Peremajaan bakteri *Staphylococcus epidermidis* yang dilakukan menggunakan biakan murni, masing-masing diambil satu ose dengan menggunakan ose steril kemudian diinokulasikan dengan cara digoreskan pada agar miring nutrient agar dengan cara silang (*zig-zag*), selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C.

3.6.7 Pembuatan Larutan Bakteri

Bakteri uji yang telah diinokulasi dengan kawat steril diambil kemudian disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 9 ml larutan NaCl 0,9% hingga di peroleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan Mc. Farland 0,5. (Gansareng.,*et al* 2018).

3.6.8 Pembuatan larutan kontrol

a. Kontrol (+)

Pembuatan larutan kontrol positif dibuat dari sediaan antibiotik Clindamycin 3 % b/v. kapsul clindamycin dibuka kemudian ditimbang sebanyak 30 mg, kontrol positif diencerkan menggunakan *aquadest* 10 ml.

b. Kontrol (-)

Kontrol negatif dalam penelitian ini menggunakan *Aquadest* steril yang sudah disediakan sebanyak 100 ml.

3.6.8 Pembuatan larutan sampel uji

Dimulai dengan membuat perhitungan untuk konsentrasi 25%, 50% dan 75% b/v dengan cara ditimbang 2,5 g, 5 g dan 7,5 g ekstrak daun kecombrang (*Etlintera elatior Jack R.M Smith*) setelah itu masing- masing ekstrak dilarutkan dalam 10 mL larutan *aquadest* steril.

Pembuatan kadar ekstrak kecombrang 25%

Menggunakan Rumus : $V_1 = N_2 \times V_2 / N_1$

$$= 25\% \times 10 \text{ ml} / 100 \text{ ml}$$

$$= 2,5 \text{ g}$$

Dibutuhkan 2,5 g ekstrak Kecombrang dan menambahkan 10 ml

aquadest steril untuk mendapatkan 100 ml sediaan dengan kadar 25%.

Pembuatan kadar ekstrak kecombrang 50%

Menggunakan Rumus : $V_1 = N_2 \times V_2 / N_1$

$$= 50\% \times 10 \text{ ml} \times 100 \text{ ml}$$

$$= 5,0 \text{ g}$$

Dibutuhkan 5,0 g ekstrak Kecombrang dan menambahkan 10 ml *aquadest* steril untuk mendapatkan 100 ml sediaan dengan kadar 50%.

Pembuatan kadar ekstrak kecombrang 75%

Menggunakan Rumus : $V_1 = N_2 \times V_2 / N_1$

$$= 75\% \times 10 \text{ ml} / 100 \text{ ml}$$

$$= 7,5 \text{ g}$$

Dibutuhkan 7,5 g ekstrak kecombrang dan menambahkan 10 ml *aquadest* steril untuk mendapatkan 100 ml sediaan dengan kadar 75%.

3.6.9 Pembuatan media dasar dan pembedihan

Pembuatan media NA (Nutrien Agar) dilakukan dengan cara menimbang sebanyak 6,16 g. Kemudian dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer lalu dilarutkan dengan 220 ml aquades, Na Oxoid (28g/1000ml). Setelah itu media NA dihomogenkan di dalam labu erlenmeyer dan dipanaskan menggunakan hot plate selama ± 10 menit hingga NA larut. Media yang telah homogen disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C . Setelah itu media NA ditunggu hingga suhu $\pm 40-45^\circ\text{C}$.

3.6.10 Pembuatan Media Pengujian NA

Lapisan dasar dibuat dengan menuangkan masing-masing 15 ml NA ke dalam 3 cawan petri, Selanjutnya suspensi bakteri dicampurkan ke dalam media pembedihan NA lalu dibiarkan hingga memadat. Setelah memadat, pada permukaan lapisan dasar diberi label atau penandaan untuk masing-masing lubang sumuran

dengan tiap konsentrasi serta kontrol positif dan kontrol negatif. diletakkan 5 garis yang diatur sedemikian rupa jaraknya agar daerah pengamatan tidak saling bertumpu.

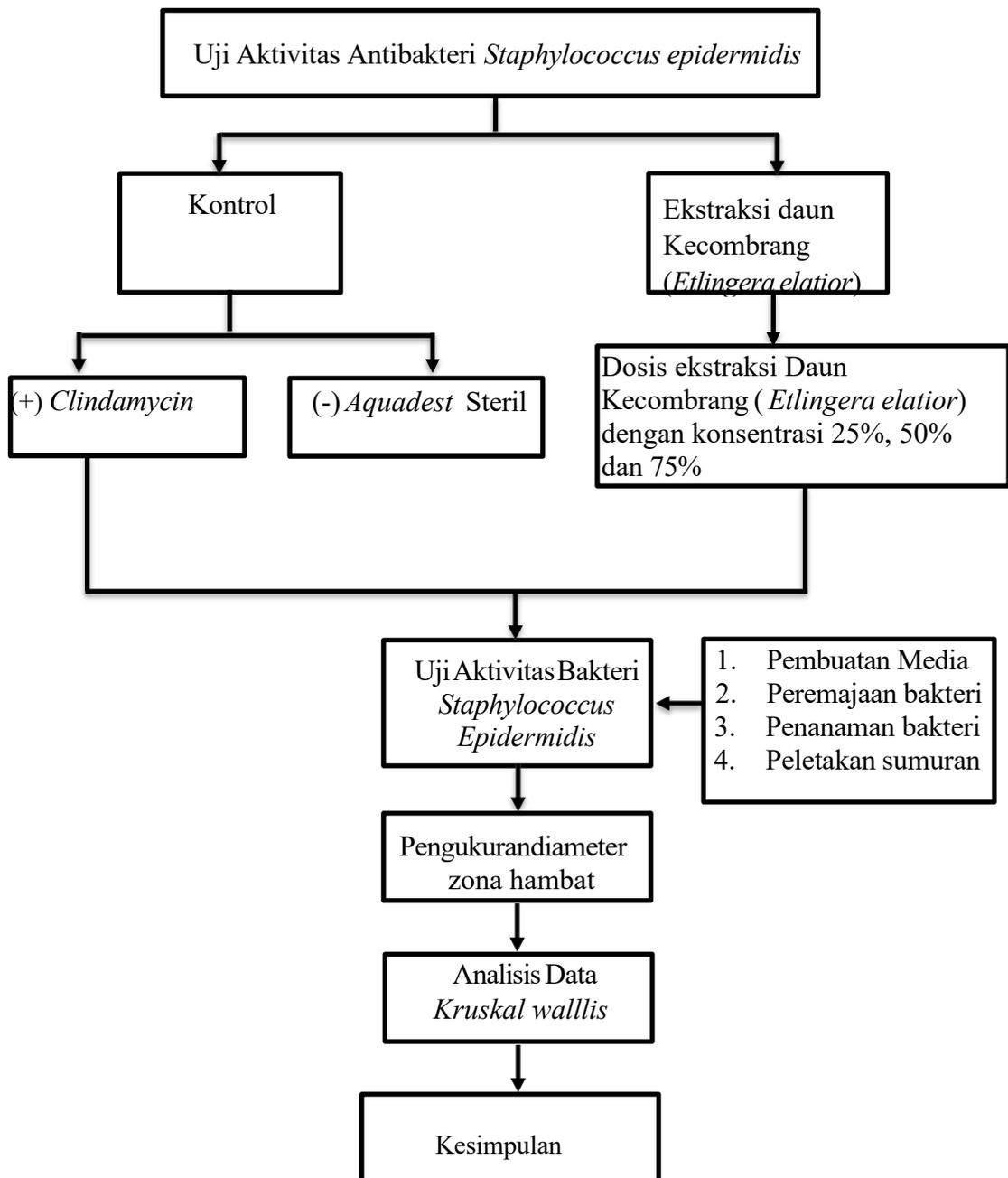
3.6.12 Pengujian aktivitas antibakteri

Media NA steril dioles dengan bakteri *Staphylococcus epidermidis* yang telah disuspensikan dengan swab (kapas steril). kemudian dibuat lubang sumuran dengan menggunakan *cork borer* dengan diameter lubang sumuran 6 mm. dilanjutkan dengan memasukan ekstrak daun kecombrang yang telah dibuat dengan variasi konsentrasi 25% 50% 75% kedalam medium natrium agar (NA) yang telah dibuat sumuran beserta kontrol positif dan negatifnya. perlakuan ini diulang sebanyak 3 kali. setelah itu 3 cawan petri yang sudah terisi dengan sampel dimasukan kedalam incubator untuk diinokulasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Lalu diamati pertumbuhan bakteri pada setiap perlakuan dan diukur diameter zona hambat menggunakan jangka sorong dengan satuan mm.

3.7 Analisa Data

Data hasil pengujian aktivitas ekstrak daun kecombrang terhadap diameter zona hambat pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis* di analisa secara statistik dengan menggunakan metode *Kruskal Wallis test*.

3.8 Kerangka Kerja



Gambar 3.1 Kerangka Kerja