

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Desain Penelitian**

Jenis penelitian ini yaitu penelitian eksperimental laboratorium, yang bertujuan untuk mengetahui ekstrak batang tanaman kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith) dapat bermanfaat sebagai antibakteri *Stapylococcus aureus* dan untuk mengetahui seberapa besar zona hambat yang digunakan sebagai antibakteri.

#### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

##### **3.2.1 Tempat Penelitian**

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Fitokimia Prodi S1 Farmasi STIKes Panti Waluya Malang.

##### **3.2.2 Waktu Penelitian**

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Maret 2025 sampai Juli 2025.

#### **3.3 Identifikasi Variabel**

##### **3.3.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas yang masuk pada penelitian ini yaitu ekstrak batang tanaman kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith) dengan konsentrasi 25%, 50% dan 75%, kontrol negatif yaitu *aquades* dan kontrol positif yaitu klindamisin 3%

##### **3.3.2 Variabel Terikat**

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

### 3.4 Definisi Operasional

**Tabel 3.1** Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
<p>Variabel bebas yang masuk pada penelitian ini yaitu ekstrak batang tanaman kecombran (<i>Etilingera elatior</i> (Jack) R.M. Smith) dengan konsentrasi 25%, 50% dan 75%.</p>	<p>Batang kecombrang adalah bagian dari tanaman kecombrang yang berupa struktur tegak, berbentuk silindris atau agak pipih, berwarna hijau atau kemerahan, dan berfungsi sebagai penyangga daun, bunga, serta organ reproduksi lainnya.</p> <p>Ekstraksi adalah pemisahan secara kimia dan fisika batang kecombrang dengan menggunakan pelarut etanol 70%. Kemudian ekstrak etanol dengan volume tertentu akan diencerkan dengan aquadest hingga konsentrasi menjadi 25%, 50% dan 75%</p>	<p>Menggunakan Persamaan:  <math>N1 \times V1 = N2 \times V2</math>  <math>N1 = \text{Konsentrasi awal}</math>  <math>N2 = \text{Konsentrasi akhir}</math>  <math>V1 = \text{Volume awal}</math>  <math>V2 = \text{Volume akhir}</math></p>	<p>Batang dewasa berusia 6-12 bulan, dengan panjang 20-30 cm, dan batang berbentuk gilig</p>	Ordinal

Variabel terikat yang masuk dalam penelitian ini yaitu diameter zona hambat pada pertumbuhan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .	Zona hambat adalah daerah jernih yang terbentuk di sekitar media pertumbuhan bakteri uji. Diameter terluar daerah bening di sekitar sumuran yang berisi ekstrak batang kecombrang yang menandakan tidak adanya pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i> .	Mengukur diameter terluar zona bening di sekitar sumuran.	Milimeter (mm) $\leq 5$ mm: Lemah 6-10 mm : Sedang 11-20 mm : Kuat $\geq 21$ mm : Sangat kuat	Ordinal
---	---	---	---	---------

### 3.5 Besar Sampel

Pada penelitian ini sampel yang diuji yaitu ekstrak batang tanaman kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith) dengan konsentrasi 25%, 50% dan 75%, kontrol positif yaitu antibiotik klindamisin 3% dan kontrol negatif yaitu *aquades* sebagai pembanding. Replikasi dilakukan 3 kali dengan total satu kali replikasi terdapat 1 cawan petri yang berisikan 5 macam percobaan.

### 3.6 Prosedur Penelitian

#### 3.6.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan penelitian ini adalah timbangan analitik, *rotary evaporator*, kertas saring, masker, toples, steril mikropipet, cawan petri, *handscoon*, *tissue*, inkubator, bunsen, oven, cawan porselen, *water bath*, gelas ukur, erlenmeyer, pisau, wadah, *wrapping*, *aluminium foil*, sendok, spatula dan *cork borer*,

### **3.6.2 Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang kecombrang, pelarut etanol 70%, nutrient borth (NB), nutrient agar (NA), kultur bakteri *Stapylococcus aureus*, klindamisin 3% dan *aquades*.

### **3.6.3 Pengambilan dan Pembuatan Simplisia**

#### **3.6.3.1 Pengambilan Sampel**

Sampel batang kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith) diperoleh dari toko belanja *online* Clemiraidn yang berasal dari Kedunggempol Mojosari Jawa Timur, karena di tempat itu terdapat banyak tanaman kecombrang dalam jumlah besar.

#### **3.6.3.2 Identifikasi Sampel**

Identifikasi batang kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith) dilakukan di Laboratorium Fakultas S1 Farmasi Stikes Panti Waluya Malang melakukan verifikasi untuk memastikan tidak terjadi kesalahan dalam pengambilan bahan utama yang digunakan dalam uji sensitivitas antibakteri.

#### **3.6.3.3 Proses Pembuatan Simplisia**

Batang Kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith) yang telah dikumpulkan dibersihkan dan dicuci dengan air mengalir hingga bersih. Kemudian batang ditimbang dalam keadaan basah, dipotong kecil-kecil (dirajang) dan dikeringkan dengan cara di oven pada suhu 80°C selama beberapa jam, setiap 1 jam sekali akan dilihat untuk mengontrol agar batang kecombrang tidak gosong. Setelah kering, batang ditimbang kembali untuk mendapatkan berat keringnya. Hasil akhirnya menghasilkan serbuk kasar batang kecombrang setelah itu disimpan di tempat kering yang terlindung dari sinar matahari (Wiyati *et al.*, 2024).

### **3.6.4 Pembuatan Ekstrak**

Proses pembuatan ekstrak batang kecombrang pada penelitian ini menggunakan metode maserasi. Serbuk kasar batang kecombrang ditimbang sebanyak 220 mg, dimasukkan dalam toples kaca. Dilarutkan dengan pelarut etanol 70% sebanyak 2200 ml. Perbandingan serbuk buah kecombrang dengan pelarut 1: 10 setiap 3 – 4 jam sekali akan dilakukan pengadukan, lalu dimaserasi selama 72

jam (3 hari) pada suhu kamar (20°C- 25°C). Larutan kemudian disaring menggunakan kain flanel, setelah filtrat didapatkan dilanjutkan dengan penguapan menggunakan *waterbath* dengan suhu 60°C (Elviana1 *et al.*, 2022).

### **3.6.5 Sterilisasi Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian disterilkan terlebih dahulu yang terdiri dari oven dengan suhu 170°C selama 1 jam. Pinset dan ose dengan cara dibakar secara langsung diatas api. Media pertumbuhan bakteri uji disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

### **3.6.6 Pembuatan Media Nutrient Agar (NA)**

Media nutrient Agar (NA Oxoid) ditimbang sebanyak 6,16 gram, selanjutnya dilarutkan dengan aquades sebanyak 220 ml (28 gram/ 1000 ml) dalam labu erlenmeyer selanjutnya di panaskan pada suhu 100°C sambil dihomogenkan dengan menggunakan *magnetic stirrer*, setelah itu di tuang dalam keadaan panas ke dalam tabung reaksi sebanyak 18 ml pertabung, selanjutnya disterilkan dengan cara di autoklaf pada suhu 121°C ± 15 menit, lalu setelah di autoklaf dan di rasa tabungnya cukup hangat maka NA siap untuk di gunakan untuk uji antibakteri (Zakaria *et al.*, 2018).

### **3.6.7 Peremajaan Bakteri *Staphylococcus aureus***

Ambil 1 ose bakteri ditanam di nutrient borth (NB) kemudian di inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C, besoknya dilanjutkan ke media nutrient agar (NA) lalu diinkubasi, besoknya dilanjutkan ke tabung reaksi dan diinkubasi kembali.

### **3.6.8 Larutan Bakteri Uji ( Larutan *Mc. Farland*)**

Bakteri uji yang telah diinokulasi dengan kawat steril diambil kemudian disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 2 ml larutan NaCl 0,9% hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan *Mc. Farland* 0,5 (Gabriella *et al.*,2022).

### **3.6.9 Pembuatan Media Pengujian**

Lapisan dasar dibuat dengan menuangkan 1 ml suspensi bakteri yang telah dibuat, kemudian dilanjutkan dengan menuangkan 18 ml NA dari tabung reaksi setelah itu dihomogenkan dengan cara menggerakkan searah angka 8, lakukan

gerakan ini secara perlahan dan kontinu untuk memastikan bakteri tersebar merata lalu media di diamkan hingga memadat, selanjutnya membuat lubang sumuran dengan menggunakan *cork borer* lakukan secara aseptik pada cawan petri yang berisikan media tadi, sehingga akhirnya terbentuklah sumur-sumur yang akan digunakan dalam uji antibakteri (Alouw *et al.*, 2022).

#### **3.6.10 Uji Aktivitas Antibakteri**

Pada lubang sumuran ditetesi kontrol positif klindamisin 3%, kontrol negatif *aquades* dan kelompok perlakuan ekstrak batang tanaman kecombrang dengan beberapa konsentrasi (25%, 50% dan 75%) masing-masing sebanyak 50  $\mu$ l. Cawan petri diinkubasi ke dalam inkubator selama 24 jam. Setelah 1x24 jam dilakukan pengamatan dan pengukuran diameter zona hambat dengan menggunakan mistar berskala. Diameter zona hambat dihitung dari tepi (*breakpoint*) ke tepi yang berseberangan melewati pusat lubang sumuran. Apabila tidak terdapat zona hambat disekitar lubang sumuran, maka dinyatakan diameter zona hambatnya adalah 0 mm (Alouw *et al.*, 2022).

#### **3.7 Analisis Data**

Data hasil pengujian batang kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith) dalam menghambat aktivitas bakteri *Stapylococcus aureus* dianalisis secara statistik dengan menggunakan metode *One way anova* (analisa varian satu arah) dengan program *Statistical Product Services Solution* (SPSS) versi 23 dengan taraf kepercayaan 95% atau  $\alpha = 0,05$ . Jika data yang diuji tidak homogen, maka dilakukan uji pembandingan dengan menggunakan uji *Kruskal- Wallis* (Alouw *et al.*, 2022).

### 3.8 Kerangka Kerja

