

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Negeri Medan, yang berlokasi di Jalan Willem Iskandar, Pasar V Medan Estate, Kecamatan Percut Sei Tuan, Kabupaten Deli Serdang. Kegiatan penelitian berlangsung selama periode Oktober 2023 hingga April 2024.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi Penelitian

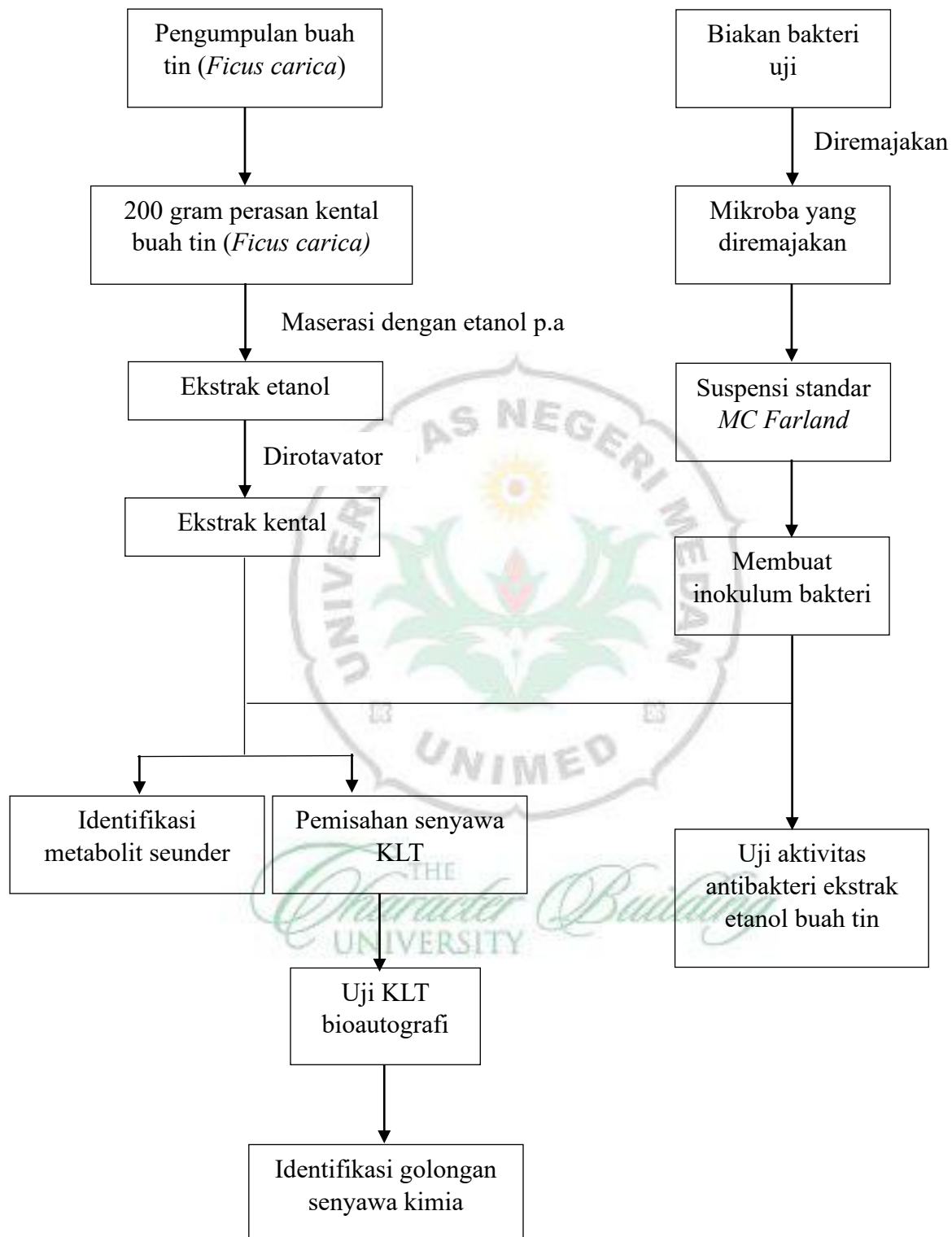
Populasi merujuk pada objek yang diteliti dalam penelitian. Populasi yang diambil adalah ekstrak etanol buah tin (*Ficus carica* L.) yang diperoleh dari Jl. Dwi Kora, Gang. Keluarga Baru, Kec. Medan Helvetia, Kota Medan, Sumatera Utara.

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan terdiri dari bakteri *Staphylococcus aureus* MRSA dan *Klebsiella pneumoniae* ESBL, yang diperoleh melalui proses pengenceran dari isolat masing-masing bakteri tersebut.

3.3 Desain dan Variabel Penelitian

Penelitian dilakukan menggunakan metode deskriptif kualitatif yang dilaksanakan melalui dua tahap percobaan di laboratorium. Tahap pertama dilakukan untuk mengetahui pengaruh dari jenis pelarut yang dipakai terhadap aktivitas antibakteri ekstrak buah *Ficus carica*. Tahap kedua dilakukan uji nilai KHM dan KBM untuk menghambat dan membunuh bakteri uji dari masing-masing jenis pelarut.



Gambar 3.1 Desain Penelitian

3.4 Defenisi Operasional

3.4.1 Daya Antibakteri

Daya antibakteri merupakan kemampuan suatu ekstrak untuk menghambat maupun membunuh pertumbuhan bakteri. Efektivitas antibakteri ditunjukkan oleh semakin sedikitnya jumlah koloni bakteri yang tumbuh, menunjukkan adanya hambatan terhadap pertumbuhan suatu bakteri.

3.4.2 Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

KHM merupakan konsentrasi minimal masing-masing ekstrak buah tin (*Ficus carica* L.) yang dilakukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Multi Drug Resistant* (MDR) setelah diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C .

3.4.3 Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)

KBM merupakan kadar minimal dari masing-masing ekstrak buah tin (*Ficus carica* L.) yang dilakukan untuk membunuh pertumbuhan bakteri *Multi Drug Resistant* (MDR) setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.5 Instrumen Penelitian

3.5.1 Alat

Peralatan yang digunakan yaitu kain flanel, kertas saring, autoklaf, cawan petri, bunsen, kertas label, pipet tetes, pipet ukur, tabung reaksi, beaker glass, batang pengaduk, neraca analitik, labu Erlenmeyer, rak tabung, pipet ukur, vortex, inkubator, rak tabung, jangka sorong digital, kertas cakram, aluminium foil, jarum ose, cotton swab, botol sampel, plat KLT, gelas ukur, plastik wrap, LAF (*Laminar Air Flow*), toples kaca.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan yaitu biakan bakteri *Klebsiella pneumoniae* ESBL, *Staphylococcus aureus* MRSA, ekstrak buah tin (*Ficus carica*), media

MHA, etil asetat, metanol, media NB, etanol PA, aquades, alkohol 70%, kloramfenikol 250 mg, spiritus.

3.6 Teknik Pengumpulan Data

Metode pengumpulan data dilakukan melalui observasi langsung terhadap objek penelitian, yaitu zona bening yang muncul pada media. Munculnya zona bening tersebut digunakan sebagai indikator aktivitas antibakteri dari ekstrak buah tin terhadap *Stahylococcus aureus* MRSA dan *Klebsiella pneumoniae* ESBL. Mengukur zona bening dilakukan dengan menggunakan jangka sorong yang terdapat disekitar kertas cakram.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Preparasi dan Pembuatan Ekstrak Buah Tin

Buah tin (*Ficus carica*) dalam penelitian yaitu buah yang segar dan tidak busuk. Buah tin yang telah dikumpulkan di cuci dengan air yang mengalir hingga bersih. Pengambilan sampel dilakukan secara random sampling, karena pemilihan sampel dilakukan tanpa mempertimbangkan karakteristik seperti bentuk, ukuran, maupun usia (Hidayat, 2017).

Pada penelitian yang dilakukan untuk memperoleh ekstrak buah tin menggunakan metode perasan. Metode perasan dilakukan dengan cara buah tin di blender. Ekstraksi buah tin dilakukan dengan metode maserasi. Maserasi dilakukan sebanyak 2 kali. Sebanyak 2.5 kg buah tin yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam toples kaca, lalu direndam menggunakan 2.5 liter pelarut etanol p.a dengan perbandingan pelarut 1:1 (b/v). Proses ekstraksi pertama, 5 hari dan diaduk 24 jam sekali. Ekstrak disaring dengan kertas saring untuk memisahkan dari ampas. Maserasi ke-dua dilakukan dengan perbandingan 1 : 0,5, dilakukan sebanyak dua kali. Semua hasil ekstrak kemudian dicampurkan dan dipisahkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga menghasilkan ekstrak kental. Pemilihan etanol sebagai pelarut karena etanol merupakan pelarut organik yang sering digunakan untuk proses ekstraksi. Beberapa alasan penggunaan etanol

yang sangat luas antara lain karena etanol relatif tidak toksik dibandingkan dengan aseton dan metanol.

3.7.2 Pengenceran Ekstrak Buah Tin (*Ficus carica* L.)

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan variasi konsentrasi ekstrak, yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%. Penetapan konsentrasi ekstrak dilakukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

Keterangan :

V_1 : Volume konsentrasi awal ekstrak yang akan dicampurkan dengan pelarut

V_2 : Volume pengenceran yang digunakan

M_1 : Konsentrasi ekstrak asal yaitu ekstrak dengan konsentrasi 100%

M_2 : Konsentrasi yang akan dipakai

3.7.3 Pembuatan Larutan Uji

Konsentrasi ekstrak buah tin (*Ficus carica* L.), larutan stok konsentrasi 100% dibuat terlebih dahulu dengan menimbang ekstrak 10 gram diencerkan dengan larutan etanol p.a sebanyak 10 ml

- Konsentrasi 20%

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 100 = 5 \text{ ml} \cdot 20$$

$$V_1 = \frac{100}{100} = 1 \text{ ml (jumlah volume dari larutan induk dengan konsentrasi 100%}$$

diambil, kemudian diencerkan dengan etanol p.a hingga mencapai volume akhir 5 ml dalam tabung ukur.).

- Konsentrasi 40%

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 100 = 5 \text{ ml} \cdot 40$$

$$V_1 = \frac{200}{100} = 2 \text{ ml (jumlah volume dari larutan induk dengan konsentrasi 100%}$$

diambil, kemudian diencerkan dengan etanol p.a hingga mencapai volume akhir 5 ml dalam tabung ukur.).

- Konsentrasi 60%

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 100 = 5 \text{ ml} \cdot 60$$

$$V_1 = \frac{300}{100} = 3 \text{ ml (jumlah volume dari larutan induk dengan konsentrasi 100%}$$

diambil, kemudian diencerkan dengan etanol p.a hingga mencapai volume akhir 5 ml dalam tabung ukur).

- Konsentrasi 80%

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 100 = 5 \text{ ml} \cdot 80$$

$$V_1 = \frac{400}{100} = 4 \text{ ml (jumlah volume dari larutan induk dengan konsentrasi 100%}$$

diambil, kemudian diencerkan dengan etanol p.a hingga mencapai volume akhir 5 ml dalam tabung ukur).

3.7.4 Peremajaan Bakteri

Dua gram media Nutrient Agar (NA), larutkan dalam aquades 100 ml, dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Larutan tersebut dipanaskan di atas hotplate hingga tercampur sempurna larut dan homogen. Masukkan ke dalam tabung reaksi steril media yang sudah homogen, lalu disterilisasi memakai autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya, media dibiarkan pada suhu ruang hingga memadat dengan posisi miring. Saat proses penanaman bakteri, tabung didekatkan ke nyala bunsen, tutup dengan kapas, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, dilakukan dalam laminar airflow.

3.7.5 Pembuatan Inokulum Bakteri

Satu ose koloni *Staphylococcus aureus* MRSA disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 10 ml larutan NaCl 0,9%, dihomogenkan memakai vortex. Prosedur yang sama juga diterapkan pada bakteri uji *Klebsiella pneumoniae* ESBL.

3.7.6 Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri ini dilakukan dengan metode *Kirby-Bauer* atau metode difusi cakram. Metode difusi cakram merupakan metode yang efektif dan mudah untuk digunakan dalam menentukan aktivitas antibakteri suatu zat. Metode difusi menggunakan cakram dilakukan dengan cara kertas cakram sebagai media untuk menyerap bahan antimikroba dijenuhkan ke dalam bahan uji. Sebanyak 19 gram media MHA dilarutkan dalam 500 ml aquades, kemudian diaduk menggunakan magnetic stirrer dan dipanaskan hingga mendidih di atas hot plate. Setelah larut, media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C. Sebanyak 10 mL media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dimasukkan kedalam cawan petri dibiarkan hingga memadat, menggoreskan bakteri secara merata kedalam cawan petri yang sudah diisi media MHA menggunakan *cotton bud* yang sudah disterilkan, kertas cakram berdiameter 6 mm yang sudah direndam dengan ekstrak buah tin dengan variasi konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%, kontrol positif dan kontrol negatif, diletakkan pada media yang sudah digoreskan dengan bakteri. Dalam penelitian ini kontrol negatif yang dipakai merupakan pelarut yang digunakan pengencer ekstrak yaitu etanol, kontrol positif yang dipakai adalah kloramfenikol. Kemudian cawan petri diinkubasi selama 24 jam hingga terbentuk zona yang ditandai dengan munculnya bening di sekitar cakram. Uji aktivitas antibakteri dilakukan sebanyak empat kali ulangan. Zona yang terbentuk kemudian diukur menggunakan jangka sorong digital untuk menentukan aktivitas antibakteri ekstrak.

Zona hambat diukur pada dua arah, yaitu diameter horizontal dan vertikal, menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter (mm).

$$\text{Diameter zona hambat: } \frac{(DV-DC) + (DH-DC)}{2}$$

Keterangan:

DV : Diameter vertikal

DH : Diameter horizontal

DC : Diameter cakram

3.7.7 Pemisahan Senyawa Dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pada tahap awal KLT, pemilihan fase gerak yang tepat dilakukan dengan menggunakan etil asetat : methanol : aquades. Pemisahan fraksi akan berlangsung ketika pelarut ditambahkan sebagai fase gerak, dengan tiga pelarut yang dipakai etil asetat, methanol dan aquades dengan perbandingan (7 : 2 : 1). Fase gerak kemudian dimasukkan kedalam chamber dan ditutup dengan rapat. Untuk pembuatan kromatogram, lempeng KLT dipotong dengan ukuran 8×2 cm, kemudian diberi tanda menggunakan pensil, masing-masing 0,5 cm dari bagian atas dan 1 cm dari bagian bawah.

Ekstrak buah tin ditotolkan menggunakan pipet kapiler pada lempeng KLT yang sudah dipotong, ditotolkan menggunakan pipet kapiler. Setelah dilakukan penotolan pada lempeng KLT dimasukkan kedalam chamber dan di elusi, setelah pelarut telah mencapai batas atas, lempeng KLT diangkat lalu dikeringkan, bercak yang timbul diamati menggunakan sinar UV dengan gelombang 366 nm, bercak yang terlihat dihitung nilai Rf (Hidayatul et al., 2017)

3.7.8 Pengujian KLT-Bioautografi

Media MHA yang telah memadat digoreskan dengan bakteri *Staphylococcus aureus* MRSA dan *Klebsiella pneumoniae* ESBL menggunakan cotton swab steril, media dibiarkan selama 10 menit untuk memungkinkan suspensi bakteri menyerap, lempeng KLT yang telah disemprot diletakkan dan sedikit ditekan, setelah 30 menit, pelat KLT diangkat, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, mengamati zona hambat yang terbentuk pada permukaan media.

3.7.9 Identifikasi Golongan Senyawa Antibakteri

Noda yang membentuk zona hambat disemprotkan menggunakan reagen untuk mengidentifikasi jenis senyawa yang menghambat tumbuhnya bakteri *Staphylococcus aureus* MRSA dan *Klebsiella pneumoniae* ESBL. Setelah disemprot pereaksi $AlCl_3$ akan membentuk senyawa golongan flavonoid yang ditandai dengan munculnya warna kuning atau jingga dan merah (Membalik et

al., 2020). Pereaksi semprot $FeCl_3$ akan menghasilkan senyawa golongan fenol, keberadaan senyawa fenol dalam larutan dapat terdeteksi melalui perubahan warna setelah penambahan pereaksi, yang ditandai dengan munculnya warna seperti hijau, biru, ungu, merah, hitam pekat.

3.7.10 Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dilakukan menggunakan metode dilusi cair Kirby dan Bauer yang telah dimodifikasi (Fatisa, 2013), dengan memanfaatkan media cair Nutrient Broth (NB). Pengukuran absorbansi dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis sebelum dan sesudah proses inkubasi. Sebanyak 4 ml media NB steril dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi, dan ditambah 0,5 ml ekstrak dengan masing-masing ekstrak 5 konsentrasi (20%, 40%, 60%, 80%, 100%).

Pengukuran absorbansi terhadap bakteri dilakukan memakai spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 480 nm. Selanjutnya, tabung inkubasi disimpan 24 jam pada suhu 37°C di dalam inkubator. Setelah masa inkubasi berakhir, dilakukan pengukuran ulang absorbansi untuk mengevaluasi pertumbuhan bakteri.

3.7.11 Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)

KBM merupakan tahap lanjutan dari uji KHM, yang dilakukan terhadap seluruh tabung pada uji KHM yang tidak menunjukkan kekeruhan. 0,2 ml dari suspensi pada konsentrasi diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml media Nutrient Broth (NB) steril. Tabung reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, dilakukan pengukuran absorbansi (OD) menggunakan spektrofotometer. Jika hasil pengukuran menunjukkan nilai OD = 0, berarti tidak terdapat kekeruhan, maka diperoleh konsentrasi KBM

3.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis secara deskriptif dan kuantitatif. Parameter yang digunakan untuk mengetahui potensi ekstrak buah tin (*Ficus carica* L.) dalam menghambat pertumbuhan bakteri adalah hasil uji difusi cakram berupa diameter daerah penghambatan (mm), uji KHM dan KBM menggunakan metode dilusi cair, dianalisis secara statistik. Sementara itu, pada tahap ketiga dianalisis nilai Rf serta ukuran zona hambat yang dihasilkan dari metode KLT-bioautografi.

Diameter zona hambat menurut penggolongan yang dilakukan oleh Davis dan Stout (1971) disitasi oleh Rastina dkk. (2015), menunjukkan bahwa kriteria daya antibakteri sebagai berikut:

Diameter zona hambat 5 mm atau kurang = kategori lemah

Diameter zona hambat 5-10 mm = kategori sedang

Diameter zona hambat 10-20 mm = kategori kuat

Diameter zona hambat 20 mm atau lebih = kategori sangat kuat.

