

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimen dengan melakukan uji aktivitas antibakteri yang terkandung dalam ekstrak jamur tiram merah muda (*Pleurotus flabellatus*) terhadap bakteri *Streptococcus pneumonia* yang diukur diameter zona hambatnya pada konsentrasi 1000mg/ml.

3.1.1. Desain penelitian

Desain yang digunakan adalah *control group post test only design*. Pada media MHA diberi suspensi bakteri *Streptococcus pneumonia* secara merata, di buat dua sumuran dan tiap sumuran diisi ekstrak jamur tiram merah (*Pleurotus flabellatus*) muda dengan konsentrasi 1000mg/ml. Sedangkan satu sumur digunakan sebagai kontrol antibiotik penisilin sensitif *Streptococcus pneumonia* dengan konsentrasi 10µl. Diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C dan ukur diameter zona hambat yang terjadi pada masing-masing sumuran.

3.2. Tempat Penelitian

Pelaksanaan ekstraksi metode maserasi di Laboratorium Kimia Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan UNIMUS. Uji antibakteri ekstrak dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan UNIMUS.

3.3. Variabel penelitian

Variabel dalam penelitian ini yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas yaitu ekstrak metanol *P.flabellatus*, variabel terikat yaitu aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus pneumonia*.

3.4. Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Skala
1.	Ekstrak metanol <i>P.flabellatus</i>	Hasil maserasi <i>P. flabellatus</i> pelarut methanol dengan cara mengeringkan tubuh buah, lalu di haluskan, menimbang serbuk dan merendam dengan pelarut methanol dengan perbandingan 1:1 (dilakukan selama 3 hari dan penggantian pelarut sehari sekali), lalu uapkan, hingga menjadi pasta ekstrak murni, setelah itu dilakukan pengenceran menggunakan DMSO.	Interval
2.	Aktivitas antibakteri <i>Streptococcus pneumonia</i>	Aktivitas antibakteri ekstrak metanol <i>P.flabellatus</i> terhadap bakteri <i>Streptococcus pneumonia</i> yang di ukur diameter zona hambatnya	Rasio

3.5. Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan untuk ekstraksi, adalah alat-alat gelas, timbangan analitik (Sartorius), *waterbath*, oven (Mommert), oven kipas (Shimadzu), *freezer* (Electrolux), *magnetic stirrer* (Nouva II), kompor listrik. Alat yang digunakan untuk uji antibakteri adalah cawan petri, inkubator, mikropipet (Gilson), *cork borer* (5 mm) dan lemari es (Sharp).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah jamur tiram merah-muda (*P. flabellatus*). Bahan yang digunakan untuk ekstraksi adalah metanol, dan bahan yang digunakan untuk kultur bakteri adalah media BAP dan uji antibakteri adalah media MHA (*Muler Hilton Agar*) (OXOID), BHI (*Brain Heart Infusion*) (OXOID), standar McFarland (BaCl₂ 1% dan H₂SO₄ 1%), NaCl fisiologis dan DMSO sebagai pengenceran.

3.6. Prosedur penelitian

3.6.1. Sterilisasi alat

Alat-alat yang digunakan dicuci terlebih dahulu kemudian di sterilkan, untuk alat-alat gelas di tutup dengan kapas steril dan di bungkus menggunakan kertas. Untuk cawan petri di bungkus menggunakan kertas lalu di masukan ke dalam autoclave pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.6.2. Persiapan media uji

MHA (Muller Hilton Agar)

Bahan yang digunakan untuk membuat media MHA yaitu bubuk media MHA, dan Aquadest. Cara membuatnya yaitu timbang 38 gram media, tambahkan 1 liter aquadest. Panaskan sampai mendidih untuk melarutkan media. Sterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Media yang telah steril di dinginkan hingga mencapai 45°C-50°C. Simpan pada suhu 2-8°C

3.6.3. Ekstraksi Jamur Tiram

Jamur *P. flabellatus* diperoleh dari CV. VOLVA Yogyakarta Indonesia. Ekstraksi zat-zat aktif dari *P. flabellatus* pada bagian tubuh buah jamur menggunakan metode maserasi. Maserasi merupakan cara ekstraksi yang paling sederhana. Proses ini didasarkan pada proses pemindahan massa komponen zat padat ke dalam pelarut methanol dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka, kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut. Maserasi ini dilakukan dengan mengeringkan tubuh buah *P. Flabellatus* dengan cara di jemur dibawah sinar matahari, setelah kering di haluskan menumbuk tubuh buah *P. flabellatus* lalu merendam dalam metanol (CH₃OH), di lakukan selama tiga hari dengan mengganti methanol setiap hari pada suhu ruang

dan terlindung dari cahaya, selama perendaman di lakukan pengocokan berulang-ulang, Upaya ini menjamin keseimbangan konsentrasi bahan ekstraksi yang lebih cepat didalam cairan. Selama proses maserasi dilakukan pengadukan dan penggantian cairan penyari setiap hari. Semakin besar perbandingan simplisia terhadap cairan pengestraksi, akan semakin banyak hasil yang diperoleh (Voigh, 1994).

Penggantian larutan penyaring dilakukan sampai larutan jernih dengan asumsi sudah tidak ada senyawa aktif yang terkandung dalam serbuk kering. Larutan hasil maserast dikeringkan sampai semua pelarut menguap dan diperoleh ekstrak kental. Pengeringan ekstrak metanol dilakukan dengan bantuan kipas angin. Ekstrak yang diperoleh ditimbang, dimasukkan ke dalam flakon dan disimpan dalam kulkas. Hasil akhir poses maserasi adalah ampas dan ekstrak metanol.

3.6.4. Persiapan bakteri uji

Dilakukan uji identifikasi bakteri *Streptococcus pneumonia*. Bakteri Gram positif (*Streptococcus peumonia*) strain bakteri pathogen didapat dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Teknologi Laboratorium Medik, Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan UNIMUS. Diremajakan dengan menggunakan media BHI kemudian diinkubasi 37⁰C selama 24 jam.

3.6.5. Uji aktivitas antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak ini terhadap bakteri *Streptococcus pneumonia*. Langkah-langkah pengujian aktivitas ekstrak adalah sebagai berikut.

a) Uji pendahuluan aktivitas antibakteri

Pada sumuran satu diberi ekstrak jamur tiram merah muda dengan konsentrasi 1000 mg/mL yang diberi antibiotik kontrol positif yaitu penisilin. Apabila konsentrasi tertinggi tidak dapat

menghambat pertumbuhan bakteri maka dilakukan dengan menaikkan konsentrasi hingga di temukan konsentrasi sesuai yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

b) Uji Aktivitas Antibakteri

Aktivitas antimikroba ekstrak metanol tubuh buah *P. flabellatus* dievaluasi dengan menggunakan uji *agar well diffusion assay* (Perez et al., 1990). Dalam metode ini, 100 µl kultur 24 jam dari setiap organisme uji, setara dengan standar McFarland 0,5 diinokulasi pada *Muller Hilton Agar* (MHA) dengan ketebalan yang pasti 6 mm. Kemudian disebar kepermukaan agar-agar dengan bantuan penyebar kaca yang disterilkan. Setelah 30 menit inokulasi, sumur disiapkan dengan bantuan *cork borer* steril (diameter 5 mm).

Sumuran dibuat di setiap cawan dengan jarak 2 cm antar sumuran, dimana sumuran diisi dengan ekstrak *P. flabellatus* dengan konsentrasi 1000mg/ml, dengan cara diencerkan menggunakan DMSO. Sedangkan satu sumur digunakan sebagai kontrol antibiotik penisilin sensitif *Streptococcus pneumonia*.

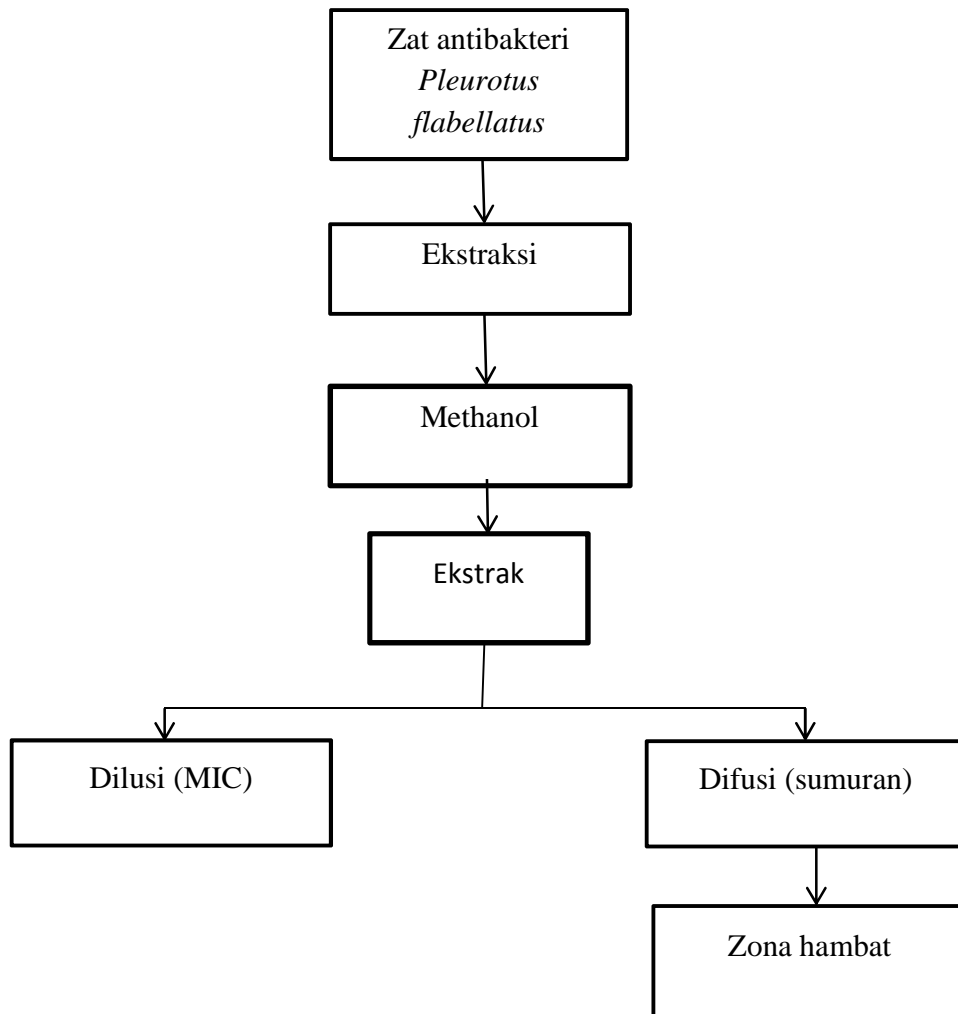
Semua cawan kemudian diinkubasi secara aerob pada suhu 37 °C selama 24 - 48 jam. Aktivitas antimikroba ekstrak ditentukan dengan mengukur diameter zona penghambatan dan membandingkannya dengan hasil penghambatan antibiotik penisilin sensitif *Streptococcus pneumonia*. Zona hambat diukur pada sudut silang dan diambil sebagai rata-rata tiga pengukuran independen. Aktivitas antibakteri diketahui dengan melihat zona hambatnya (Nehra et al, 2012).

a) *Minimum Inhibitory Concentration (MIC)*

MIC didefinisikan sebagai konsentrasi minimal ekstrak yang menyebabkan bakteri uji terhambat 100%. MIC ditentukan dengan menggunakan metode *agar well diffusion* (Okeke et al., 2001; Ubalua & Oti, 2008). Dalam metode ini, pengenceran yang berbeda dari Ekstrak (mulai dari 100 mg/mL - 0,05 mg/mL) disiapkan dengan volume yang dimasukkan dalam uji MIC 100 µl.

Cara kerja MIC pipet 100 μ l MHB duplo pada masing-masing well (12 *well*), Tambahkan 100 μ l ekstrak masukkan pada *well* 1, homogenkan. Konsentrasi ekstrak berubah menjadi 1000 mg/ml pada *well* 1 karena terjadi pengenceran dengan media MHB. Setelah *well* 1 homogen, dipipet 100 μ l dan pindahkan ke *well* 2, perlakukan yang sama dilakukan sampai *well* 12. 100 μ l dari *well* 12 dibuang. Tambahkan 100 μ l suspensi bakteri pada masing-masing *well*. Inkubasi pada suhu 37°C selama 12-24 jam. Setelah diinkubasi, siapkan media BAP, bagi menjadi 4 bagian tandai untuk masing-masing *well*. Panaskan ose dengan lampu spirtus. Ambil 1 mata ose dan gores pada bagian yang sudah di tandai sesuai *well*. Lakukan sampai *well* 12. Inkubasi hasil inokulasi pada suhu 37°C selama 12-24 jam. Amati pertumbuhan bakteri pada media BAP yang telah di gores.

3.7. Alur penelitian



Gambar 3. Alur Penelitian

Jenis penelitian yang akan dilakukan termasuk penelitian eksperimen yang bertujuan untuk mengetahui kadar ekstrak methanol yang memiliki daya hambat paling efektif terhadap 4 bakteri patogen. Rancangan penelitian eksperimen berupa rancangan faktorial dengan kombinasi antara kadar ekstrak (1000 mg/mL dengan interval jarak 50 mg/mL). Variabel terikat yang dilihat berupa Zona hambat yang diukur dengan menggunakan jangka sorong.

3.8. Teknik Pengumpulan dan Analisis Data

Pengumpulan data primer yang merupakan data yang diambil selama pemeriksaan di laboratorium yang meliputi data pengujian aktivitas antibakteri dan MIC ekstrak metanol jamur tiram merah-muda terhadap bakteri *Streptococcus pneumoniae*.