

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental dengan menguji efek antibakteri infusa daun seruni berbagai konsentrasi terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Farmasi Poltekkes Kemenkes Medan, Jln. Airlangga No. 20 Medan. Waktu penelitian dilakukan selama 3 bulan.

C. Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel dilakukan secara *purposive sampling* yaitu pengambilan tanpa mempertimbangkan tempat tumbuh dan letak geografisnya. Sampel yang akan diuji dalam penelitian yaitu daun seruni (*Wedelia biflora* L) yang diambil di jalan Cik Di Tiro Medan.

D. Cara Pengumpulan Data

Data diambil dari hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

E. Alat dan Bahan

E.1 Alat

1. Aluminium foil
2. Autoclave
3. Batang pengaduk
4. Cawan petri
5. Cawan porselen
6. Erlenmeyer
7. Gelas ukur
8. Incubator
9. Jangka sorong
10. Kain flannel
11. Kapas
12. Kawat ose
13. Kertas perkamen

14. Labu tentukur
15. Lampu spiritus
16. Mikroskop
17. Objek glass
18. Oven
19. Panci
20. Paper disk
21. Penangas air
22. Pipet tetes
23. Pipet volume
24. Rak tabung reaksi
25. Spidol
26. Tali dan benang
27. Tabung reaksi
28. Thermometer
29. Timbangan analitik

E.2 Bahan

1. Alcohol 96%
2. Aquadest
3. BaCl₂
4. Bakteri *Staphylococcus aureus*
5. Daun seruni (*Wedelia biflora* L)
6. Fuchsin
7. H₂SO₄
8. Kristal violet
9. Lugol
10. Media Manitol Salt Agar (MSA)
11. Minyak imersi
12. Mueller Hinton Agar (MHA)
13. NaCl
14. Nutrient Agar (NA)

F. Pembuatan Infusa Daun Seruni

Penggunaan daun seruni dimasyarakat yaitu segenggam = 20 gram dalam 100 ml. Konsentrasi acuan = $20 \text{ g}/100 \text{ ml} \times 100\% = 20\%$.

Konsentrasi infusa daun seruni yang akan dibuat adalah 40%, 60% dan 80%. Timbang 80 gram daun seruni yang sudah dikeringkan, kemudian dimasukkan kedalam panci infus dan diberi aquadest sebanyak 100 ml, panaskan diatas penangas air sampai suhu 90°C selama 15 menit sesekali diaduk, serkai selagi panas dengan menggunakan kain flannel kemudian diperas. Jika jumlahnya tidak mencukupi tambahkan air panas secukupnya sampai didapatkan infusa 100 ml.

Selanjutnya untuk konsentrasi 60% dibuat sebagai berikut:

1. Untuk membuat 20 ml rebusan daun seruni 60%, dibuat dengan cara pengenceran dari rebusan daun seruni 80% yaitu:

$$V1 \cdot N1 = V2 \cdot N2$$

$$V1 \cdot 80\% = 20 \cdot 60\%$$

$$V1 = 15 \text{ ml}$$

Maka pipet 15 ml rebusan daun seruni 80%, tambahkan aquadest hingga 20 ml.

2. Untuk membuat 20 ml rebusan daun seruni 40%, dibuat dengan cara pengenceran dari rebusan daun seruni 80% yaitu:

$$V1 \cdot N1 = V2 \cdot N2$$

$$V1 \cdot 80\% = 20 \cdot 40\%$$

$$V1 = 10 \text{ ml}$$

Maka pipet 10 ml rebusan daun seruni 80%, tambahkan aquadest hingga 20 ml.

G. Pembuatan Media

G.1 Pembuatan Media Manitol Salt agar (MSA)

Komposisi:

Lab. Lemco Powder	: 1,0 g
Pepton	: 10,0 g
Manitol	: 10,0 g
Sodium chloride	: 75,0 g
Phenol red	: 0,025 g
Agar	: 15,0 g

Jumlah media yang harus dicampurkan dalam 1 liter aquadest pada etiket adalah 111 g/l. Banyaknya MSA yang diperlukan untuk 50 ml adalah:

$$\frac{50 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times 111 \text{ g} = 5,55 \text{ g}$$

Pembuatan:

1. Timbang MSA sebanyak 5,55 g.
2. Masukkan ke dalam erlenmeyer, campurkan dengan aquadest sebanyak 50 ml.
3. Panaskan sampai mendidih sambil diaduk-aduk.
4. Angkat dan tutup erlenmeyer dengan kapas, lapisi dengan aluminium foil, kemudian ikat dengan benang.
5. Sterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
6. Setelah steril, angkat dari autoclaf dengan perlahan-lahan dan hati-hati.
7. Dinginkan sejenak, buka aluminium foil yang diikatkan pada erlenmeyer kemudian tuang kedalam cawan petri, biarkan media memadat.

G.2 Pembuatan Media Nutrient Agar (NA)

Komposisi:

Pepton from meat	: 5,0 g
Beat extract	: 3,0 g
Agar	: 12,0 g

Jumlah media yang harus dicampurkan dalam 1 liter air pada etiket adalah 20 g/l, banyaknya NA yang diperlukan 20 ml adalah:

$$\frac{20 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times 20 \text{ g} = 0,4 \text{ g}$$

Pembuatan:

1. Kalibrasi erlenmeyer sampai 20 ml.
2. Timbang NA sebanyak 0,4 g.
3. Masukkan kedalam erlenmeyer, campurkan dalam aquadest sampai 20 ml.
4. Panaskan sampai mendidih.
5. Angkat, lalu bagi beberapa tabung, tutup dengan kapas lapisi dengan aluminium foil kemudian ikat dengan benang.
6. Sterilkan dengan autoclaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
7. Setelah steril, angkat dari autoclaf dengan perlahan-lahan dan hati-hati.
8. Dinginkan, biarkan sampai media memadat dalam keadaan miring. Setelah itu lakukan penanaman bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggoreskan zig zag pada media.

G.3 Pembuatan Media Mueller Hilton Agar (MHA)

Komposisi:

Infusion from meat	: 2 g
Casein hydrolysate	: 17,5 g
Starch	: 1,5 g
Agar	: 13 g

Jumlah media yang harus dilarutkan dalam 1 liter air pada etiket adalah 34 g/l, banyaknya MHA yang diperlukan untuk 100 ml:

$$\frac{100 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times 34 \text{ g} = 3,4 \text{ g}$$

Pembuatan:

1. Timbang MHA sebanyak 3,4 g.
2. Masukkan ke dalam erlenmeyer, campurkan dengan aquadest sampai 100 ml.
3. Panaskan diatas hotplate sambil diaduk-aduk hingga mendidih, lalu angkat. Tutup erlenmeyer dengan kapas, lapisi dengan aluminium foil dan ikat dengan benang.
4. Sterilkan dalam autoclaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
5. Setelah steril, angkat dari autoclaf dengan perlahan-lahan dan hati-hati.

G.4 Pembuatan Larutan NaCl 0,9%

Komposisi:

Natrium klorida	: 0,9 g
Air suling ad	: 100 ml

Pembuatan: Timbang NaCl sebanyak 0,9 kemudian larutkan dengan air suling steril sebanyak 100 ml dalam labu ukur, kemudian sterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

G.5 Pembuatan Suspensi Standart Mc.Farland

Komposisi:

Larutan asam sulfat 1%	: 99,5 ml
Larutan barium klorida 1,175%	: 0,5 ml

Pembuatan:

Campurkan larutan Asam Sulfat 1% dan larutan Barium Klorida 1,175% ke dalam erlenmeyer dan kocok homogen. Apabila kekeruhan suspensi bakteri

uji sama dengan kekeruhan suspensi standart Mc.Farland, maka konsentrasi suspensi bakteri adalah 10^8 koloni/ml.

G.6 Pembiakan Bakteri

1. Ambil satu ose sampai dua ose suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*.
2. Kemudian tanam ke dalam media MSA dengan cara menggoreskan lalu tutup media.
3. Inkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 18 - 24 jam.
4. Amati pertumbuhan koloni pada media.
5. Hasil yang diperoleh adalah koloni berwarna kuning keemasan, lalu lakukan pengecatan gram.
6. Koloni spesifik *Staphylococcus aureus*, diambil satu ose lalu tanamkan dalam Nutrient Agar miring, inkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18 - 24 jam.

G.7 Pengecatan gram pada Bakteri *Staphylococcus aureus*

1. Ambil biakan bakteri berumur 18 - 24 jam yang berasal dari media MSA, letakkan pada objek glass yang telah diberi cairan (aquadest) terlebih dahulu dan lakukan fiksasi.
2. Tambahkan kristal violet, diamkan selama 5 menit kemudian bilas dengan aquadest.
3. Tambahkan larutan lugol, biarkan selama 45 - 60 detik. Bilas dengan alkohol 96%, diamkan selama 30 detik, bilas dengan aquadest.
4. Tambahkan larutan fuchsin diamkan selama 1 – 2 menit, bilas dengan aquadest lalu tiriskan kaca objek, serap air dengan kertas penyerap.
5. Amati hasil dibawah mikroskop dengan perbesaran 10×40 dan 10×100 dengan bantuan minyak imersi. Hasil pengamatan dibawah mikroskop adalah:
 - a. Bakteri berbentuk bulat, bergerombol tidak beraturan seperti buah anggur.
 - b. Warna ungu (bakteri gram positif).

G.8 Pengenceran Bakteri *Staphylococcus aureus*

1. Diambil 1 - 2 sengkelit dengan kawat ose steril stok kultur bakteri berumur 24 jam yang telah tumbuh pada media Nutrient Agar miring lalu disuspensikan dalam tabung yang berisi 1 ml larutan NaCl 0,9% kemudian tambahkan NaCl 0,9% sedikit demi sedikit sampai diperoleh

kekeruhan suspensi bakteri sama dengan kekeruhan standart Mc.Farland maka konsentrasi bakteri adalah 10^8 koloni/ml.

2. Kemudian lakukan pengenceran dengan memipet 0,1 ml biakan bakteri (10^8 koloni/ml) dimasukkan ke dalam tabung steril dan ditambahkan larutan NaCl 0,9% sebanyak 9,9 ml, kocok homogen maka diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^6 koloni/ml.

H. Prosedur Kerja Pengujian Antibakteri Infusa Daun Seruni terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*

1. Sterilkan semua alat dan bahan yang akan digunakan.
2. Pipet 0,1 ml suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^6 koloni/ml ke dalam 100 ml media MHA dengan suhu 45°C - 50°C lalu kocok sampai homogen, kemudian tuang sebanyak 15 ml ke dalam masing-masing cawan petri steril, lalu biarkan memadat.
3. Buat 5 tanda pada bagian bawah cawan petri sebagai tempat peletakan paper disk.
4. Rendam masing-masing paper disk kedalam infusa daun seruni yang telah dibuat dalam berbagai konsentrasi, larutan tetrasiklin HCl (kontrol positif) dan aquadest (kontrol negatif) selama 2 menit.
5. Angkat perlahan dengan menggunakan pinset, letakkan paper disk ke dalam cawan petri yang sudah berisi MHA dan suspensi bakteri secara aseptis sesuai dengan tanda yang telah dibuat terlebih dahulu.
6. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C .
7. Amati hasilnya dengan mengukur zona hambatan berupa daerah yang tampak jernih yang tidak ditumbuhi *Staphylococcus aureus*.
8. Catat hasilnya dalam satuan mm. Percobaan dilakukan secara triplo yaitu dilakukan untuk masing-masing konsentrasi infusa daun seruni, tetrasiklin HCl dan aquadest.