BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 JENIS PENELITIAN

Pada penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dengan uji laboratorium menggunakan metode dilusi untuk melihat aktivitas antibakteri ekstrak etanol buah kapulaga jawa (*Amomum Compactum*) dan buah kapulaga sabrang (*Elettaria cardamomum*) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

3.2 WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan bulan Maret sampai dengan Mei 2024 di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Farmakognosi & Fitokimia (FARFIT) Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

3.3 ALAT DAN BAHAN

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu neraca analitik, nampan, oven, waterbath, toples maserasi, rotary evaporator, bak, gelas ukur 100 ml, corong, grinder, batang pengaduk, kertas saring, erlenmeyer 250 ml, cawan porselen, autoklaf, inkubator, Laminar Air Flow (LAF), rak tabung reaksi, tabung reaksi, hotplate, vortex, cawan petri, beaker glass 250 ml, botol semprot, bunsen, pemantik api, gelas arloji, pipet ukur 10 ml, bola hisap, stirrer, timbangan digital, chiller/lemari pendingin, mikropipet, blue tip.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu buah kapulaga jawa, buah kapulaga sabrang, etanol 95%, bakteri *Escherichia coli*, media MHA, media TSB, media NA, media NB, akuades, alkohol 70%, kapsul amoxicillin, NaCl, larutan Mc Farland, aluminium foil, kertas label, kapas.

3.4 VARIABEL PENELITIAN

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas terkait penelitian ini adalah konsentrasi sampel ekstrak etanol buah kapulaga jawa dan kapulaga sabrang dalam tujuh pengenceran yaitu: 40%; 20%; 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,256% b/v.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat terkait penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

3.5 DEFINISI OPERASIONAL VARIABEL

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Metode	Alat Ukur	Skala
Buah Kapulaga Jawa dan Kapulaga Sabrang	Kemampuan buah kapulaga jawa dan buah kapulaga sabrang dalam menghambat dan membunuh pertumbuhan bakteri	Ekstraksi	Rotary evaporator	Rasio
Pertumbuhan bakteri *E coli*	Jika tidak terdapat pertumbuhan bakteri pada pengujian KHM bisa dilanjutkan pada pengujian KBM	KHM dan KBM	Indra penglihatan	Nominal

3.6 PROSEDUR PENELITIAN

3.6.1. Sterilisasi alat dan media

Pada penelitian ini dilakukan dua metode sterilisasi yaitu sterilisasi basah dan sterilisasi kering. Alat yang digunakan untuk mensterilkan media adalah autoklaf. Cara mensterilkan media dengan menggunakan autoklaf adalah sebagai berikut. Disiapkan autoklaf. Dituangkan air kedalam alat autoklaf hingga volume

sesuai dengan indikator petunjuk pada wadah. Media yang akan disterilisasi ditata di dalam wadah autoklaf. Penutupan autoklaf dilakukan dengan menyambung lubang baut dan mengencangkannya secara bersamaan. Alat dinyalakan dengan mencolokan kabel pada stop kontak. Selanjutnya diatur suhunya 121 ^{o}C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Ditunggu selama 2 menit sampai uap keluar (bunyi mendesis) dan ditutup klep pengaman. Jika sudah tercapai, colokan dicabut dari stop kontak dan ditunggu hingga tekanan turun menjadi 0,05 atm. Lalu klep pengaman dibuka untuk mengurangi panas. Dikeluarkan media yang sudah disterilisasi. Sedangkan untuk sterilisasi alat dapat menggunakan sterilisasi kering, alat yang dapat disterilisasi menggunakan metode kering adalah alat gelas yang tahan dengan panas seperti beaker glass, erlenmeyer, batang pengaduk, dan pipet volume. Sebelum disterilisasi, alat terlebih dahulu dibungkus menggunakan aluminium foil. Lalu dimasukkan kedalam oven dengan suhu 170 ^{o}C selama 1 jam.

3.6.2 Pembuat Ekstrak Buah Kapulaga

Sebanyak 100 gram buah kapulaga jawa dan buah kapulaga sabrang dicuci bersih, kemudian ditiriskan dan dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 100 ^{o}C selama 2 jam. Setelah itu, dihaluskan menggunakan grinder hingga menjadi serbuk. Selanjutnya proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, dengan cara serbuk buah kapulaga jawa direndam etanol 95% dengan perbandingan pelarut (1:5) dan sesekali diaduk. Pada hari pertama ditambahkan 250 ml pelarut etanol 95%, pada hari kedua dan ketiga masing-masing ditambahkan 125 ml etanol 95%. Sedangkan pada serbuk buah kapulaga sabrang juga memakai perbandingan pelarut (1:5) dengan penambahan pelarut pada hari pertama 125 ml pelarut etanol 95%, pada hari kedua ditambahkan 62 ml pelarut etanol 95%, dan pada hari ketiga ditambahkan 63 ml pelarut etanol 95%. Setelah itu dilakukan penyaringan hingga mendapatkan filtrat dan ampas, Kemudian filtrat dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 45 ^{o}C dengan 40 rpm, setelah pelarut berkurang dipekatkan lagi menggunakan waterbath (Afrinal et al., 2016).

3.6.3 Pembuatan media MHA

Sebanyak 3,8 gram MHA (*Mueller Hinton*) ditimbang dengan neraca analitik dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer, lalu ditambahkan akuades sebanyak 100 ml.

Kemudian dipanaskan diatas hotplate sampai mendidih untuk melarutkan media dan diaduk menggunakan magnetic stirrer sampai semua bahan terlarut dengan sempurna. Selanjutnya disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121 ^{o}C selama 15 menit. Ditunggu sebentar sampai suhu hangat kuku-kuku, lalu dituangkan ke dalam cawan petri steril dan simpan pada suhu 2-8 ^{o}C (Hudaya et al., 2014) .

3.6.4 Pembuatan media TSB

Sebanyak 3 gram TSB (*Tryptic Soy Broth*) ditimbang dengan neraca analitik dan dimasukkan ke dalam beaker glass 250 ml kemudian ditambahkan akuades 100 ml. Kemudian dipanaskan diatas hotplate hingga mendidih untuk melarutkan media dan diaduk menggunakan magnetic stirrer. Selanjutnya disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121 ^{o}C selama 15 menit. Tunggu sebentar sampai suhu hangat kuku-kuku, lalu dituangkan ke dalam tabung reaksi sekitar 5 ml (Hudaya et al., 2014).

3.6.5 Pembuatan media NA

Sebanyak 2,3 gram NA (*Nutrient Agar)* ditimbang dengan neraca analitik dan dimasukkan ke dalam beaker glass 250 ml kemudian ditambahkan akuades 100 ml. Lalu dipanaskan diatas hotplate hingga mendidih dan diaduk menggunakan magnetic stirrer. Selanjutnya media disterilkan dengan autoklaf dengan suhu 121^{o}C selama 15 menit. Ditunggu sebentar sampai suhu hangat kuku-kuku, lalu dituangkan ke dalam cawan petri sekitar 15 ml (Hudaya et al., 2014).

3.6.6 Pembuatan media NB

Sebanyak 0,8 gram NB (*Nutrien Broth)* ditimbang dengan neraca analitik dan dimasukkan ke dalam beaker glass 250 ml kemudian ditambahkan akuades 100 ml. Lalu dipanaskan diatas hotplate hingga mendidih dan diaduk menggunakan magnetic stirrer. Selanjutnya media disterilkan dengan autoklaf dengan suhu 121^{o}C selama 15 menit. Tunggu sebentar sampai suhu hangat kuku-kuku, lalu tuangkan ke dalam tabung reaksi sekitar 5 ml (Hudaya et al., 2014).

3.6.7 Inokulasi bakteri *Escherichia coli*

Ose steril dicelupkan pada strain *Escherichia coli* lalu di celupkan pada media NB yang telah dibuat, selanjutnya di inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37 ^{o}C. Biakan dipindahkan pada media NA yang telah dibuat dengan cara mencelupkan ose steril kedalam media NB kemudian digores pada cawan petri yang sudah berisi media NA tersebut. Kemudian di inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37 ^{o}C. Dan dibuat suspensi (Hudaya et al., 2014).

3.6.8 Pembuatan suspensi bakteri

Pembuatan suspensi bakteri ini dilakukan dengan diambil 1 ose koloni bakteri *Escherichia coli* dari media agar yang berada pada cawan petri dengan menggunakan jarum ose yang sudah disterilkan sebelumnya. Kemudian diencerkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml NaCl, lalu dihomogenkan. Setelah itu, dibandingkan dengan larutan standar McFarland hingga kekeruhan larutan hampir sama dengan larutan standar Mc Farland. Jika larutan lebih keruh dibandingkan dengan Mc Farland ditambahkan NaCl lagi hingga hampir sama dengan Mc Farland. Jika sudah sama dengan Mc Farland diberi label pada tabung reaksi (Cahyarani, 2022).

3.6.9 Pembuatan kontrol positif

Pembuatan kontrol positif dilakukan kapsul amoxicillin dimasukkan ke dalam beaker glass 50 ml, kemudian dilarutkan dengan akuades steril sebanyak 5 ml. Lalu diambil 1 ml, dimasukkan kedalam beaker glass dan ditambahkan akuades steril sebanyak 10 ml (Cahyarani, 2022).

3.6.10 Pengenceran sampel

Menurut Saleh et al. (2013) menyatakan pengenceran ini dilakukan secara bertingkat dengan mengencerkan ekstrak 2 kali lipat. Sebanyak 2,5 ml dipipet dari masing-masing sampel ekstrak buah kapulaga jawa dan buah kapulaga sabrang secara aseptis kedalam tabung reaksi dan ditambahkan akuades steril sebanyak 2,5 ml. Kemudian di vortex agar larutan terlarut dengan homogen dan diberi label konsentrasi 40%. Selanjutnya dipipet larutan pada tabung reaksi konsentrasi 40% sebanyak 2,5 ml dan ditambahkan akuades steril sebanyak 2,5 ml untuk konsentrasi

20%, dikocok hingga homogen. Setelah itu dipipet 2,5 ml larutan pada tabung reaksi konsentrasi 20% dan ditambahkan akuades steril 2,5 ml untuk konsentrasi 10%, dikocok hingga homogen. Selanjutnya dipipet larutan pada tabung reaksi konsentrasi 10% sebanyak 2,5 ml dan ditambahkan akuades steril sebanyak 2,5 ml untuk konsentrasi 5%, dikocok hingga homogen. Setelah itu dipipet larutan pada tabung reaksi kosentrasi 5% dan ditambahkan akuades steril 2,5 ml untuk kosentrasi 2,5%, dikocok hingga homogen. Selanjutnya dipipet larutan pada tabung reaksi konsentrasi 2,5% sebanyak 2,5 ml dan ditambahkan akuades steril 2,5 ml untuk konsentrasi 1,25%, dikocok hingga homogen. Setelah itu dipipet larutan pada tabung reaksi konsentrasi 1,25% sebanyak 2,5 ml dan ditambahkan akuades steril 2,5 ml untuk konsentrasi 0,256%, dikocok hingga homogen.

3.6.11 Tahap pengujian

3.6.11.1 Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Pada tahap pengujian ini disiapkan 45 tabung dengan 3 replikasi, pada tabung pertama berisi media sebanyak 1 ml. Tabung kedua berisi 1 ml media dan suspensi bakteri sebanyak 0,1 ml (sebagai kontrol negatif). Tabung ketiga berisi 1 ml media dan larutan kapsul amoxicillin sebanyak 1 ml (sebagai kontrol positif). Tabung keempat berisi media sebanyak 1 ml, suspensi bakteri sebanyak 0,1 ml, dan larutan ekstrak buah kapulaga jawa dengan konsentrasi 0,625 %; 1,25 %; 2,5 %; 5 % ; 10 %; 20 %; 40% sebanyak 1 ml. Tabung kelima berisi media sebanyak 1 ml, suspensi bakteri sebanyak 0,1 ml, dan larutan ekstrak buah kapulaga sabrang dengan konsentrasi 0,625 %; 1,25 %; 2,5 %; 5 % ; 10 %; 20 %; 40% sebanyak 1 ml. Setelah itu di inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37 ^{o}C. Dan dilakukan pengamatan untuk melihat kekeruhan larutan media (Afrina et al., 2016).

3.6.11.2 Uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)

Dari semua tabung pengenceran secara bertahap dilihat kekeruhannya untuk dilanjutkan pengujian KBM. Pada pengujian KBM dilakukan dengan metode gores menggunakan ose steril. Dilakukan dengan cara ose steril dicelupkan kedalam tabung reaksi yang berwarna keruh dan digores pada media MHA (*Mueller Hinton*).

Kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37 ^{o}C. Dan dilakukan pengamatan untuk melihat koloni yang tumbuh (Afrina et al., 2016).

3.6.12 Destruksi alat kerja

Peralatan kaca yang telah digunakan untuk pengujian KHM dan KBM seperti cawan petri dan tabung reaksi hasil penumbuhan koloni dibungkus menggunakan aluminium foil. Autoklaf yang akan digunakan untuk destruksi diperiksa terlebih dahulu apakah air didalamnya sudah sampai tanda batas yang ditentukan. Selanjutnya autoklaf dinyalakan dengan mencolokan kabel pada stop kontak dan menekan tombol "ON" lalu diatur suhunya sampai menunjukkan panah pada angka 4 untuk mendidihkan air yang ada di dalam autoklaf selama 15 menit. Lalu alat kerja yang sudah dibungkus dimasukkan kedalam keranjang dan di masukkan ke dalam autoklaf kemudian ditutup dengan rapat dan benar. Setelah itu lubang udara ditutup dan suhu diatur sampai angka 8-9 atm. Proses destruksi dilakukan pada suhu 121°C selama 30 menit dalam tekanan 1 atm. Setelah proses destruksi selesai, semua alat dikeluarkan, dicuci bersih dan dikeringkan.

3.7 PENGOLAHAN, PENYAJIAN, DAN ANALISIS DATA

3.7.1 Pengolahan data

Data diolah dengan memberikan kode pada setiap sampel, dalam penelitian ini peneliti memberikan kode dengan menuliskan 2 huruf depan nama sampel diikuti dengan konsentrasi dan replikasi.

3.7.2 Penyajian data

Data akan disajikan dalam bentuk tabel yang menunjukkan ada atau tidaknya bakteri pada media TSB dan MHA kemudian dijabarkan dalam bentuk narasi, sehingga menggambarkan karakteristik dan tujuan penelitian.

Tabel 3.2 Pengujian Konsentrasi Hambat Minimum

sampel	pengenceran	Hasil pengulangan			KHM
		Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	
Ekstrak buah kapulaga jawa	40%				
	20%				
	10%				
	5%				
	2,5%				
	1,25%				
	0,256%				

Tabel 3.3 Pengujian Konsentrasi Bunuh Minimum

Sampel	Pengenceran	Hasil pengulangan		KBM
		Replikasi 1	Replikasi 2	
Eksrak buah kapulaga jawa	40%			
	20%			
	10%			
	5%			
	2,5%			
	1,25%			
	0,256%			

3.7.3 Analisis data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan koloni yang tumbuh pada media TSB dan MHA. Pada media MHA jika terdapat pertumbuhan koloni maka dinyatakan belum mampu membunuh bakteri. Data yang diperoleh dideskripsikan dalam bentuk tabel serta hasil kesimpulan yang diperoleh dari pengujian KHM dan KBM pada ekstrak buah Kapulaga Jawa dan Kapulaga sabrang.