

## BAB II METODE PENELITIAN

### A. Waktu dan tempat penelitian

Pengambilan sampel jamur dilaksanakan di kawasan Taman Nasional Gunung Halimun Salak. Pembuatan ekstrak dilaksanakan di Laboratorium Kimia Universitas Nasional, uji antibakteri dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika Universitas Nasional, Jakarta. Waktu penelitian pada bulan Juli 2022 – Januari 2023.

### B. Instrumen penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain pisau, oven, blender, ayakan 100mesh, erlenmayer 2000ml, gelas ukur 500ml, *shaker*, corong, kertas saring, *rotary evaporator*, timbangan, tabung sentrifus, mikropipet, pipet tetes, autoklaf, kompor listrik, batang pengaduk, tabung reaksi, cawan petri, *core bore*, jarum ose, *Spectofotometry UV-VIS*, kuvet.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain, jamur *G. lucidum* dan *Ganoderma* sp., Aquadest, metanol 90% 16.400mL, *Natrium Agar*, *Muller Hinton Agar*, *Muller Hinton Broth*, NaCl 0,9%.

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah variabel dependen dan variabel independen. Variable dependen yaitu ekstrak jamur *G. lucidum* dan *Ganoderma* sp. sedangkan variable independen yaitu aktivitas antibakteri ekstrak jamur *G. lucidum* dan *Ganoderma* sp. terhadap bakteri *S. aureus*, *S. mutans*, *E.coli*, dan *P. aeruginosa*. Definisi Operasional Variabel (DOV) penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1. Definisi Operasional Variabel (DOV)**

No	Variabel	DOV	Sumber	Satuan
1	Jenis jamur	Serbuk kering jamur <i>G. lucidum</i> dan <i>Ganoderma</i> sp.	Taman Nasional Gunung Halimun Salak, Bogor	-
2	Konsentrasi ekstrak	Ekstrak metanol dari jamur <i>Ganoderma lucidum</i> dan <i>Ganoderma sp</i> menjadi 4 taraf konsentrasi yaitu 20%, 15%, 10%, dan 5%	Ekstrak methanol 90% jamur <i>Ganoderma lucidum</i> dan <i>Ganoderma sp</i>	%
3	Jenis bakteri uji	<i>S. aureus</i> , <i>S. mutans</i> , <i>E. coli</i> , dan <i>P.aeruginosa</i>	Biakan murnidari Laboratorium Mikrobiologidan Genetika UNAS	-
4	Aktivitas antibakteri	Pengukuran diameter zona hambat, Penentuan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)	Pengamatan langsung	mm dan %

**C. Cara kerja**

**1. Pengambilan sampel jamur makroskopis**

Jamur *G. lucidum* dan *Ganoderma* sp. diambil dari Taman Nasional Gunung Halimun Salak. Kedua sampel tersebut dibersihkan, dipotong kecil-kecil, lalu dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C hingga kering selama 2 hari.

**2. Pembuatan simplisia**

Potongan sampel jamur *G. lucidum* dan *Ganoderma* sp. yang sudah dikeringkan kemudian digiling menggunakan blender hingga halus dan diayak menggunakan

ayakan 100 mesh hingga menjadi serbuk. Sampel yang sudah menjadi serbuk dimasukkan ke dalam plastik dan disimpan dalam suhu ruang (25-27°C).

### 3. Sterilisasi alat dan bahan

Alat dan bahan yang digunakan seperti erlenmayer, tabung reaksi, cawan petri, corong, kertas saring, *core borer*, dan media uji disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 02 atm selama 15 menit.

### 4. Ekstraksi sampel

Serbuk jamur *G. lucidum* dan *Ganoderma* sp. diekstraksi menggunakan metode maserasi. Perbandingan yang digunakan adalah 1:5 dengan 150 g serbuk jamur yang dilarutkan dengan pelarut methanol 90% sebanyak 750 mL lalu dimasukkan ke dalam erlenmayer 2000 mL. Sampel dibiarkan selama 3x24 jam dengan proses pengadukan menggunakan *shaker* selama 24 jam setiap harinya. Setelah 3x24 jam maserat di saring menggunakan kertas saring hingga didapati ekstrak cair. Dilakukan pengulangan maserasi dilakukan dua kali untuk mendapatkan ekstrak yang lebih banyak. Ekstrak cair yang sudah didapat, dikentalkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan tekanan 190 mbar.

### 5. Pembuatan media pertumbuhan

#### a. Media *Nutrient Agar* (NA)

Serbuk NA ditimbang sebanyak 28 g kemudian dilarutkan dengan 1000 mL aquades didalam gelas beaker lalu dipanaskan menggunakan kompor listrik diaduk hingga mendidih dan homogen. Setelah homogen media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 02 atm selama 15 Menit.

#### b. Media *Mueller Hiton Agar* (MHA)

Serbuk MHA ditimbang sebanyak 38 g kemudian dilarutkan dengan 1000 mL aquades di dalam gelas beaker lalu dipanaskan menggunakan kompor listrik diaduk hingga mendidih dan homogen. Setelah homogen media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 02 atm selama 15 menit.

### **c. Media *Mueller Hiton Broth* (MHB)**

Serbuk MHB ditimbang sebanyak 21 g kemudian dilarutkan dengan 1000mL aquades di dalam gelas beaker lalu dipanaskan menggunakan kompor listrik diaduk hingga mendidih dan homogen. Setelah homogen media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 02 atm selama 15 menit.

## **6. Persiapan uji antibakteri**

### **a. Peremajaan bakteri**

Biakan murni bakteri masing-masing diinokulasikan ke media miring NA secara aseptis. Suspensi bakteri uji yang sudah ditanamkan, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Shinta dan Hartono, 2017).

### **b. Pembuatan suspensi bakteri uji**

Biakan peremajaan sampel bakteri diambil 1 ose diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl 0,9% steril, lalu diukur tingkat kekeruhannya dengan membandingkan standar kekeruhan *Mc Farlan* 0,5 (Angelina *et al.*, 2015).

### **c. Pembuatan kontrol negatif dan positif**

Pengujian antibakteri diperlukan adanya kontrol positif dan negatif sebagai bentuk hasil nyata hasil perbandingan. Kontrol positif yang digunakan adalah *Chloramphenicol* sebesar 0.002 g yang dilarutkan dengan 2 mL aquades (Azizah *et al.*, 2020). Sedangkan untuk kontrol negatif yang digunakan adalah larutan metanol.

### **d. Pembuatan konsentrasi sampel**

Ekstrak jamur *G. lucidum* dan *Ganoderma* sp. dibuat konsentrasi yang berbeda untuk melihat perbandingan aktivitas bakteri yang dihasilkan. Konsentrasi yang dibuat sebesar 20%, 15%, 10%, dan 5% (g/v) dengan cara ekstrak ditimbang masing- masing sebesar 1 g; 0.75 g; 0.5 g; dan 0.25 g lalu dilarutkan dengan metanol hingga 5mL (Handrianto dan Hatidja, 2018).

## **7. Uji aktivitas antibakteri**

Ekstrak jamur yang sudah dibuat variasi konsentrasi diuji menggunakan dua metode, yaitu metode difusi sumur dan metode mikrodilusi untuk melihat nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).

### a. Uji aktivitas antibakteri dengan metode sumur

Uji aktivitas antimikroba dilakukan menggunakan empat konsentrasi berbeda, yaitu 20%, 15%, 10%, dan 5%. Media MHA setelah ditanam dengan bakteri uji, dilubangi menggunakan *core borer* yang berdiameter 6 mm. Sebanyak 25 µl ekstrak jamur dimasukkan dalam lubang tersebut. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Aktivitas antimikroba diukur diameter zona bening yang terbentuk (Shinta dan Hartono, 2017).

### b. Uji aktivitas antibakteri dengan metode mikrodilusi

#### 1) Penentuan nilai KHM

Penentuan nilai KHM dilakukan pada konsentrasi berbeda yaitu, 20%, 15%, 10%, dan 5%. Media yang digunakan pada metode ini adalah media MHB. Sebanyak 24 tabung reaksi diisi dengan 8 mL MHB, dan 100 µl bakteri uji. Pada tabung kontrol positif, ditambahkan dengan 100 µl larutan *Chloramphenicol* sedangkan pada tabung kontrol negatif ditambahkan dengan larutan 100 µl methanol. Sisa tabung lainnya ditambahkan dengan ekstrak sampel jamur yang berbeda-beda sebanyak 100 µl. Kemudian diperiksa nilai kejernihannya dengan cara membaca absorbansi sampel menggunakan *Spectofotometry UV-VIS* pada panjang gelombang 580 nm. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, setelah itu diamati kembali absorbansinya menggunakan *Spectofotometry UV-VIS*. Nilai absorbansi yang didapatkan dihitung menggunakan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{KHM} = \text{Optical Density setelah inkubasi} - \text{Optical Density sebelum inkubasi}$$

Konsentrasi dengan nilai *optical density* terendah diketahui sebagai nilai KHM yang ditandai dengan tidak adanya kekeruhan yang muncul setelah diinkubasi (Magdalena dan Kusnadi, 2015).

#### 2) Penentuan nilai KBM

Penentuan nilai KBM dapat dilihat dengan cara menanamkan sampel yang menunjukkan tidak adanya kekeruhan pada inkubasi penentuan nilai KHM. Tabung dengan konsentrasi yang terpilih ditanam kembali ke media MHA menggunakan

penggoresan jarum ose dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil penanaman yang tidak ditumbuhi oleh bakteri dapat dinyatakan sebagai nilai KBM (Wardani *et al.*, 2012).

#### **D. Analisis data**

Data yang diperoleh akan dianalisis menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RAL-F) dikarenakan untuk melihat adanya kemampuan dari masing-masing faktor pertama serta interaksi antara dua faktor (faktor pertama dan kedua). Rancangan penelitian yang dilakukan terdiri dari dua faktor dan tiga ulangan. Faktor pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak jamur *G. lucidum* dan *Ganoderma* sp., faktor kedua dalam penelitian ini adalah empat taraf konsentrasi berbeda dari masing-masing ekstrak yaitu 20%, 15%, 10%, dan 5%. Pengujian lainnya akan dilakukan secara deskriptif.

Data yang diperoleh dari uji antibakteri akan dianalisis menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan aplikasi *Statistical Program for Social Science* (SPSS), jika hasil yang didapatkan bermakna akan dilanjutkan dengan pengujian *Post Hock Tukey* untuk melihat pengaruh dari setiap perlakuan.

