

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah desain penelitian eksperimental dengan menggunakan metode *tube dilution test* untuk mengetahui efektifitas antibakteri berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava*) terhadap *Lactobacillus acidophilus* secara *in vitro*.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah bakteri *Lactobacillus acidophilus*, diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah dikultur.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini ada dua, yaitu variabel bebas dan variabel tergantung.

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava*) dengan konsentrasi yang berbeda, yaitu 0%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, dan 3,5%.

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan jumlah koloni bakteri *Lactobacillus acidophilus*.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dari bulan September 2014 sampai Oktober 2014.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan untuk Ekstraksi Etanol Daun Jambu Biji (*Psidium guajava*).

- a. Gelas ukur atau *beaker glass*
- b. Timbangan ukur atau neraca analitik
- c. Pisau
- d. Alat penggerus (*blender*)
- e. 200 g daun jambu biji (*Psidium guajava*)
- f. 1 set alat evaporasi
- g. Klem statik
- h. Selang plastik
- i. Kertas saring
- j. *Waterbath*
- k. *Waterpump*
- l. Aquades
- m. Etanol 96%
- n. *Oven*
- o. Vakum
- p. *Freezer*

4.5.2 Alat dan Bahan untuk Identifikasi Bakteri *Lactobacillus acidophilus*

- a. Isolat bakteri *Lactobacillus acidophilus*
- b. Bahan pewarnaan Gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin)
- c. Minyak emersi
- d. Aquades
- e. Ose
- f. Mikroskop
- g. Api spiritus
- h. *Object glass*
- i. Kertas penghisap
- j. Kapas

4.5.3 Alat dan Bahan untuk Tes Katalase

- a. *Object glass*
- b. Pipet
- c. Isolat bakteri *Lactobacillus acidophilus*
- d. Larutan H₂O₂ 3%

4.5.4 Alat dan Bahan untuk Uji Dilusi Tabung

- a. Tabung reaksi
- b. Mikropipet steril
- c. Inkubator
- d. Ose
- e. Ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava*)
- f. Isolat bakteri *Lactobacillus acidophilus*
- g. Aquades steril

- h. NaCl
- i. Rak tabung reaksi
- j. Spidol
- k. Kertas label
- l. *Vortex*
- m. *Colony counter*
- n. *Brain Heart Infusion Broth (BHIB)*
- o. *Brain Heart Infusion Agar (BHIA)*
- p. *Anaerobic jar*
- q. *Spektrofotometer*

4.6 Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava*) adalah daun yang masih muda dari jambu biji berdaging merah, yang didapatkan dari Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Timur UPT Materia Medika Batu, Malang yang kemudian dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 60°C. Setelah proses pengeringan selesai, daun jambu biji kering dihaluskan dengan menggunakan *blender* dan diekstraksi dengan pelarut etanol.
2. *Lactobacillus acidophilus* adalah bakteri kariogenik yang dapat memfermentasi karbohidrat dan menghasilkan asam laktat, sehingga pH plak akan menurun sampai dibawah 5 (Samaranayake, 2006). Bakteri *Lactobacillus acidophilus* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3. Kadar Hambat Minimal adalah konsentrasi minimal bahan coba yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi 24 jam

dan tidak tumbuh koloni bakteri yang diketahui dengan cara mengamati kekeruhan pada media perbenihan dengan menggunakan metode dilusi.

4. Kadar Bunuh Minimal adalah konsentrasi minimal bahan coba yang dapat membunuh bakteri sebesar 99% atau 100% pada media agar.

4.7 Estimasi Jumlah Pengulangan

Dalam penelitian ini banyaknya pengulangan yang dilakukan ditentukan berdasarkan perhitungan rumus, maka didapatkan pengulangan (Solimun, 2001):

$$p(n-1) \geq 15$$

$$8(n-1) \geq 15$$

$$8n - 8 \geq 15$$

$$8n \geq 23 \rightarrow n \geq 2,875 \approx 3$$

Keterangan:

p = jumlah perlakuan (8, yaitu 7 konsentrasi dan 1 kontrol kuman)

n = jumlah pengulangan

Jadi pada penelitian ini masing-masing perlakuan dilakukan 3 kali pengulangan.

4.8 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data

Prosedur penelitian terdiri dari prosedur penelitian pendahuluan dan prosedur penelitian sesungguhnya, yaitu berupa prosedur proses pembuatan ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava*), pemeriksaan mikroskopik, tes katalase, persiapan suspensi uji *Lactobacillus acidophilus*, dan uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava*) terhadap *Lactobacillus acidophilus*.

4.8.1 Prosedur Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji (*Psidium guajava*)

1. Proses ekstraksi

- a. Daun jambu biji segar yang akan digunakan dipilih terlebih dahulu dilanjutkan pencucian di bawah air mengalir.
- b. Daun jambu biji yang telah bersih dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 60°C.
- c. Setelah kering daun jambu biji diblender sehingga didapatkan serbuk halus daun jambu biji, kemudian ditimbang menggunakan neraca analitik dan diambil 200 gram.
- d. Daun jambu biji kering kemudian dimasukkan dalam tabung erlenmeyer.
- e. Kemudian ditambahkan ± 900 ml etanol.
- f. Tutup tabung erlenmeyer dengan rapat lalu kocok perlahan-lahan. Pengocokan dilakukan 1-2 kali sehari.
- g. Tabung erlenmeyer disimpan pada suhu kamar selama 24 jam.
- h. Setelah 24 jam, dicampur kemudian disaring dengan kertas filter hingga diperoleh cairan berwarna hijau kecoklatan yang bebas dari partikel kasar sehingga diperoleh larutan ekstrak daun jambu biji dengan konsentrasi 100%.

2. Proses Evaporasi

- a. *Evaporator* dipasang pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan 30-40° terhadap meja percobaan.
- b. Hasil rendaman etanol dipindahkan ke labu pemisah ekstraksi.

- c. Labu pemisah ekstraksi dihubungkan pada bagian bawah *evaporator*, pendingin spiral dihubungkan pada bagian atas *evaporator*, lalu penampung etanol dihubungkan pada bagian atas *evaporator*, pendingin spiral dihubungkan dengan vakum dengan selang plastik; pendingin spiral dihubungkan dengan *waterpump* dengan selang plastik.
- d. *Waterpump* ditempatkan dalam bak yang berisi aquades, *waterpump* dihubungkan dengan sumber listrik sehingga aquades akan mengalir memenuhi pendingin spiral (ditunggu hingga air mengalir dengan merata).
- e. Satu set alat evaporasi diletakkan sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam aquades pada *waterbath*.
- f. Vakum dan *waterbath* dihubungkan dengan sumber listrik dan suhu pada *waterbath* diatur sekitar 80°C (sesuai dengan titik didih etanol).
- g. Biarkan sirkulasi berjalan sehingga hasil evaporasi tersisa dalam labu pemisah ekstraksi selama $\pm 2-3$ jam.
- h. Dilanjutkan dengan pemanasan dalam *oven* dengan suhu 50-60°C selama 5 jam.
- i. Hasil akhir inilah yang akan digunakan dalam percobaan yaitu ekstrak daun jambu biji dengan konsentrasi 100% yang telah dipisahkan dengan pelarut etanol.

4.8.2 Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

1. Gelas objek dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak dan dibiarkan dingin.
2. Satu ose aquades steril diteteskan pada gelas objek ditambah sedikit biakan bakteri yang diambil menggunakan ose, selanjutnya

disuspensikan dengan aquades pada gelas objek dan diratakan. Untuk sediaan cair tidak perlu disuspensikan dengan aquades.

3. Sediaan dikeringkan di udara, kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api.
4. Sediaan pada gelas objek ditetesi dengan kristal violet selama 1 menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
5. Sediaan ditetesi dengan lugol selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
6. Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
7. Sediaan ditetesi safranin selama 30 detik. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
8. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap.
9. Sediaan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 1.000x.
10. Hasil positif : *Lactobacillus acidophilus* tercat ungu (Gram positif).

4.8.3 Tes Katalase

1. Sediakan pembedihan cair bakteri pada gelas obyek.
2. Kemudian sediaan tersebut ditetesi larutan H₂O₂ 3%.
3. Perhatikan ada tidaknya gelembung udara yang terjadi.
4. Hasil untuk *Lactobacillus acidophilus* adalah tes katalase negatif.

4.8.4 Persiapan Suspensi Uji Bakteri *Lactobacillus acidophilus*

1. Dipersiapkan bakteri *Lactobacillus acidophilus* dari media BHIB yang telah diuji konfirmasi.
2. Ambil 5 koloni ($d \geq 1\text{mm}$) dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,85% steril. Kemudian diukur *Optical Density* (OD) atau

kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada $\lambda_{\text{maks}} = 650 \text{ nm}$. Dari hasil yang diperoleh dibuat suspensi sel yang mengandung 1×10^8 hingga 5×10^8 CFU/ml dengan rumus $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$ (Murray *et al.*, 1999).

3. Untuk mendapatkan suspensi sel yang mengandung $0,5 \times 10^6$ hingga $2,5 \times 10^6$ CFU/ml dilakukan dengan cara mengambil 1 ml (dari tabung yang mengandung 10^8 CFU/ml) untuk dicampur dengan 9 ml NaCl 0,85% steril. Maka akan didapatkan suspensi sel dengan konsentrasi 10^7 CFU/ml. Proses dilanjutkan sekali lagi hingga mencapai konsentrasi suspensi bakteri yang digunakan untuk tes, yaitu $0,5 \times 10^6$ hingga $2,5 \times 10^6$ CFU/ml (Murray *et al.*, 1999).

4.8.5 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava*) terhadap *Lactobacillus acidophilus*

Rangkaian uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava*) adalah sebagai berikut:

1. Disediakan 8 tabung steril, 7 tabung sebagai uji antibakteri dan 1 tabung sebagai kontrol kuman (kontrol negatif).
2. Pertama dibuat konsentrasi indukan ekstrak daun jambu biji 10% dengan cara mencampur 100% ekstrak daun jambu biji dengan aquades. Penambahan aquades disesuaikan dengan berapa volume konsentrasi indukan yang dibuat, dihitung dengan menggunakan rumus $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$. Baru kemudian membuat berbagai macam konsentrasi ekstrak antara lain 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, dan 3,5% dari konsentrasi indukan 10%. Konsentrasi indukan dibuat untuk memudahkan membuat ekstrak dengan konsentrasi kecil dan bisa disimpan untuk stok penelitian berikutnya.

3. Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan konsentrasi $0,5 \times 10^6$ hingga $2,5 \times 10^6$ CFU/ml.
4. Perbenihan cair bakteri dimasukkan pada semua tabung konsentrasi di atas, masing-masing sebanyak 1 ml. Sehingga konsentrasi akhir ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava*) adalah :

Tabung 1 : 0% (kontrol negatif)

Tabung 2 : 0,5%

Tabung 3 : 1%

Tabung 4 : 1,5%

Tabung 5 : 2%

Tabung 6 : 2,5%

Tabung 7 : 3%

Tabung 8 : 3,5%

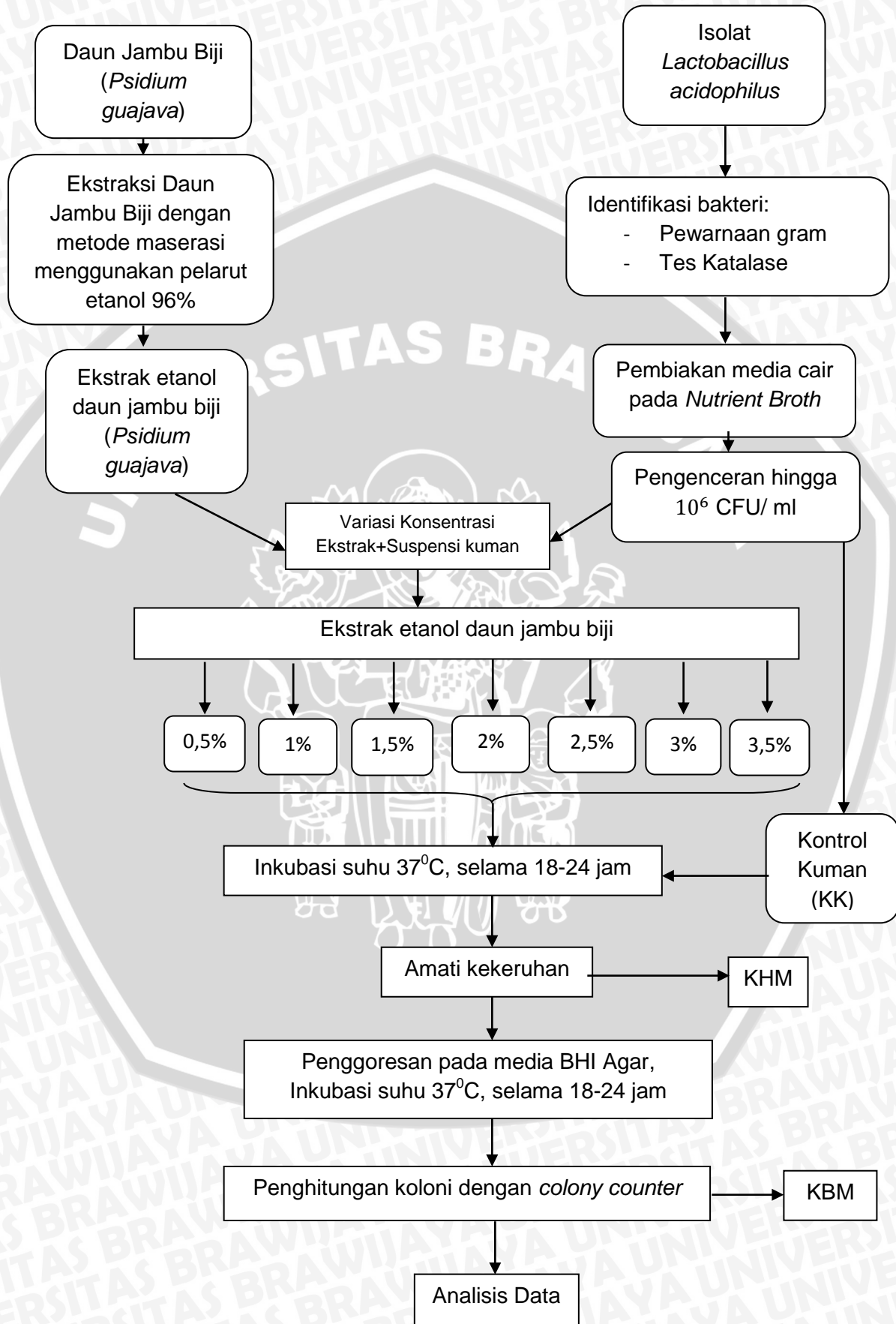
5. Masing-masing tabung di-vortex dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C .
6. Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. KHM didapatkan dengan cara melihat kejernihan tabung.
7. Kemudian dari masing-masing tabung dilusi diambil satu ose kemudian diinokulasikan pada media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA). Setelah itu, diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C .
8. Pada hari ketiga didapatkan data KBM dan dilakukan pengamatan kuantitatif pada masing-masing konsentrasi dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri dengan *colony counter*. KBM ditentukan dari tidak adanya jumlah koloni yang tumbuh pada BHIA.

4.9 Analisis Data

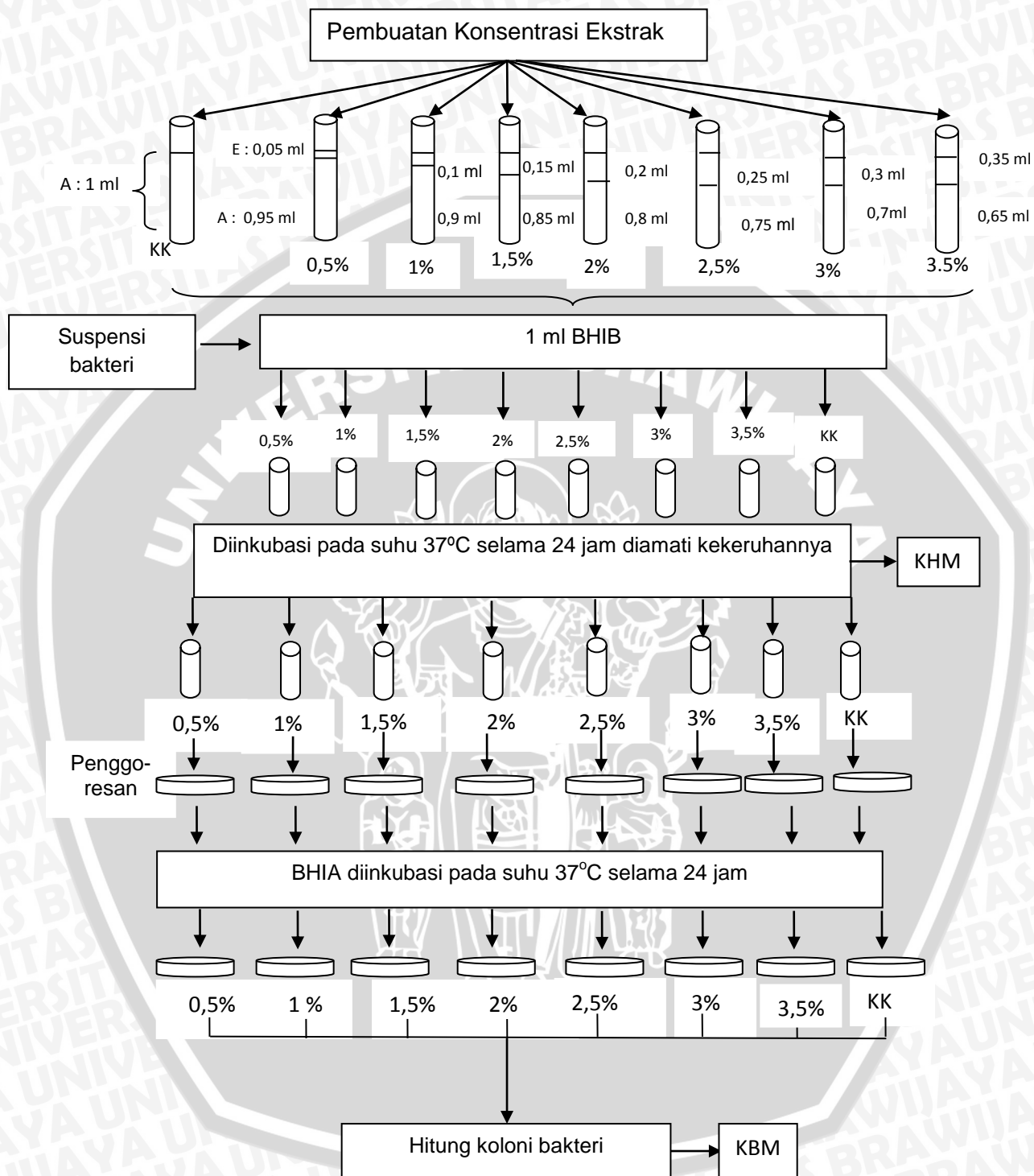
Analisis data yang digunakan adalah uji statistik parametrik yaitu uji *one way* ANOVA, uji korelasi Pearson, dan uji Regresi Linier. Uji statistik *one way* ANOVA dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava*) terhadap jumlah koloni bakteri *Lactobacillus acidophilus*. Sedangkan uji korelasi Pearson digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava*) terhadap jumlah koloni bakteri *Lactobacillus acidophilus* dan uji regresi linier digunakan untuk membuat model persamaan regresi.



4.10 Alur Penelitian Keseluruhan



4.11 Alur Operasional Penelitian



Keterangan: E : Ekstrak, A : Aquades