BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah desain penelitian *true experimental post control design only* untuk mengetahui efektifitas antibakteri berbagai konsentrasi ekstrak etanol batang serai *(Cymbopogon Citratus)* terhadap *Lactobacillus acidophilus* dengan menggunakan metode difusi sumuran.

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 ekstrak etanol batang serai *(Cymbopogon Citratus)* dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 0% (kontrol negatif) dan 100% (kontrol positif) . Namun perlu dilakukan penelitian pendahuluan untuk menentukan konsentrasi yang tepat ekstrak etanol batang serai pada penelitian sesungguhnya.

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah zona inhibisi bakteri *Lactobacillus acidophilus.*

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang bulan Juli 2015.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan untuk Ekstraksi etanol Batang Serai *(Cymbopogon Citratus)* .

a. Gelas ukur atau *beaker glass*
b. Timbangan ukur atau neraca analitik
c. Pisau
d. Alat penggerus *(blender*)
e. 200 g Batang Serai *(Cymbopogon Citratus)*
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, Kertas penghisap
d. Aquades
e. Ose lurus, ose lengkung
f. Mikroskop
g. Lampu spiritus
h. Tabung reaksi
i. Nutrient Broth

4.5.3 Alat dan Bahan untuk Tes Katalase

a. *Object glass*
b. Pipet
c. Isolat bakteri *Lactobacillus acidophilus*
d. Larutan H_2O_2 3%

4.5.4 Alat dan Bahan untuk Uji Difusi Sumuran

a. Tabung reaksi
b. Mikropipet steril
c. Inkubator
d. Ose
e. ekstrak bunga cengkeh
f. Isolat bakteri *Lactobacillus acidophilus*
g. Aquades steril
h. Larutan standart Mc Farland 0,5
i. Spidol
j. Kertas label
k. Vortex

l. *MRS-A (Mannitol Rogossa and Sharpe-Agar)*

m. *MRS-B (Mannitol Rogossa and Sharpe-Broth)*

4.6 Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol batang serai *(Cymbopogon citratus)* adalah batang serai yang didapatkan dari Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Timur UPT Materia Medika Batu, Malang yang kemudian dikeringkan dengan menggunakan *oven* pada suhu 60^{o}C. Setelah proses pengeringan selesai, kemudian batang serai dihaluskan dengan menggunakan *blender* dan diekstraksi dengan pelarut etanol menggunakan teknik maserasi.
2. Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 0% (kontrol negatif) dan 100% (kontrol positif) . Hal ini didasarkan pada penelitian sebelumnya dimana konsentrasi 20% ekstrak serai mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen Gram-positif *S. aureus* (Nyarko, 2012). Namun perlu dilakukan penelitian pendahuluan untuk menentukan konsentrasi yang tepat ekstrak etanol batang serai pada penelitian sesungguhnya.
3. *Lactobacillus acidophilus* merupakan bakteri Gram positif yang tidak berspora dengan selnya berbentuk bacillus (batang) dan bersifat fakultatif anaerob . Dan merupakan bakteri kariogenik yang dapat memfermentasi karbohidrat dan menghasilkan asam laktat, sehingga pH plak akan menurun sampai dibawah 5.
4. Zona inhibisi adalah zona yang terbentuk disekitar lubang sumuran dan menunjukkan bahwa bahan antimikroba dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Semakin lebar zona inhibisi, semakin rentan bakteri tersebut terhadap ekstrak etanol batang serai *(Cymbopogon citratus)*

4.7 Estimasi Jumlah Pengulangan

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

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

Keterangan:

p = jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan

Dalam penelitian ini digunakan 6 macam perlakuan dengan konsentrasi yang berbeda, maka :

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

$$6 (n -1) \geq 15$$

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 21 \rightarrow n \geq 3,5 \approx 4$$

Jadi jumlah pengulangan yang harus dilakukan untuk mendapatkan jumlah sampel yang dapat dipercaya adalah sebanyak 4 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 batang serai *(Cymbopogon Citratus)* yang dilakukan terhadap batang serai dengan teknik maserasi menggunakan pelarut etanol 96% yang bertujuan untuk mendapatkan bahan aktif yang bersifat polar (Cowan, 1999). Metanol merupakan pelarut yang lebih polar dibandingkan etanol dan isopropil alkohol (Jos *et al,* 2011).

Etanol juga mempunyai titik didih yang rendah dan cenderung aman, tidak beracun dan tidak berbahaya. Pelarut etanol memiliki dua sisi yang terdiri dari

gugus -OH yang bersifat polar dan gugus CH2CH3 yang bersifat non polar, sifat non polar inilah yang membuat etanol mampu mengekstrak kandungan minyak atsiri (Aziz dkk, 2014). Etanol digunakan sebagai pelarut karena lebih selektif, bakteri sulit tumbuh dalam etanol diatas 20%, tidak beracun, netral dan absorbsinya baik (Widayati, 2008). Metode ekstraksi dipilih dibandingkan metode lainnya karena diharapkan kandungan bahan aktif yang diinginkan tidak banyak berkurang.

4.8.1 Prosedur Pembuatan Ekstrak etanol Batang Serai *(Cymbopogon Citratus)* (Suprianto, 2008).

1. Proses ekstraksi
    a. Batang serai segar yang akan digunakan dipilih terlebih dahulu dilanjutkan pencucian di air mengalir.
    b. Batang serai yang telah bersih dikeringkan pada suhu 40-60°C.
    c. Setelah kering batang serai kering digiling menggunakan mesin penggiling sehingga didapatkan serbuk halus batang serai kemudian ditimbang menggunakan neraca analitik dan diambil 200 gram.
    d. Batang serai kering kemudian dimasukkan dalam tabung erlenmeyer.
    e. Kemudian ditambahkan ±900 ml etanol 96%.
    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, campur disaring dengan kertas filter hingga diperoleh larutan ekstrak batang serai dan ditampung dalam erlenmeyer glass.

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 ±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 batang serai dengan konsentrasi 100% yang telah dipisahkan dengan pelarut etanol.

4.8.2 Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

4.8.3 Prosedur pewarnaan gram berdasarkan Finegold dan Baron(1994)

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 400x.
10. Hasil positif : *Lactobacillus acidophilus* tercat ungu (Gram positif).

4.8.4 Tes Katalase

1. Sediakan pembenihan cair bakteri pada gelas obyek
2. Kemudian sediaan tersebut ditetesi larutan H_2O_2 3%
3. Perhatikan ada tidaknya gelembung udara yang terjadi
4. Hasil untuk *Lactobacillus acidophilus* adalah tes katalase negatif.

4.8.4 Persiapan Suspensi Uji *Lactobacillus acidophilus*

Dipersiapkan bakteri *Lactobacillus acidophilus* yang sudah diidentifikasi sebelumnya. Ambil 5 koloni dengan ose (d ≥ 1mm), kemudian dimasukkan kedalam 5 ml Nacl 0,85% steril. Kemudian diukur *Optical Density* (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada λ_{maks} = 650 nm. Dari nilai absorbansi dapat diperkirakan jumlah bakteri pada pembenihan cair dengan kalibrasi yang sudah diketahui yaitu absorbansi 0,1 ekuivalen dengan jumlah bakteri 10^8 CFU/ml (Murray *et al*, 1999). Misalnya didapatkan absorbansi 0,5 maka untuk mendapatkan suspensi dengan jumlah bakteri 10^8 CFU/ml sebanyak 10 ml dapat dihitung dengan rumus :

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$0,5 \times V_1 = 0,1 \times 10$$

$$V_1 = 1/0,5$$

$$V_1 = 2$$

N_1 sama dengan nilai absorbansi yang didapat sedangkan N_2 adalah absorbansi 0,1 yang ekuivalen dengan jumlah bakteri 10^8 CFU/ml. V adalah volume suspensi bakteri. Jadi, menurut perhitungan di atas, untuk mendapatkan suspensi dengan kepadatan 10^8 CFU/ml sebanyak 10 ml dibutuhkan 2 ml suspensi awal untuk dicampur dengan 8 ml *nutrient broth* sebagai pengencer.

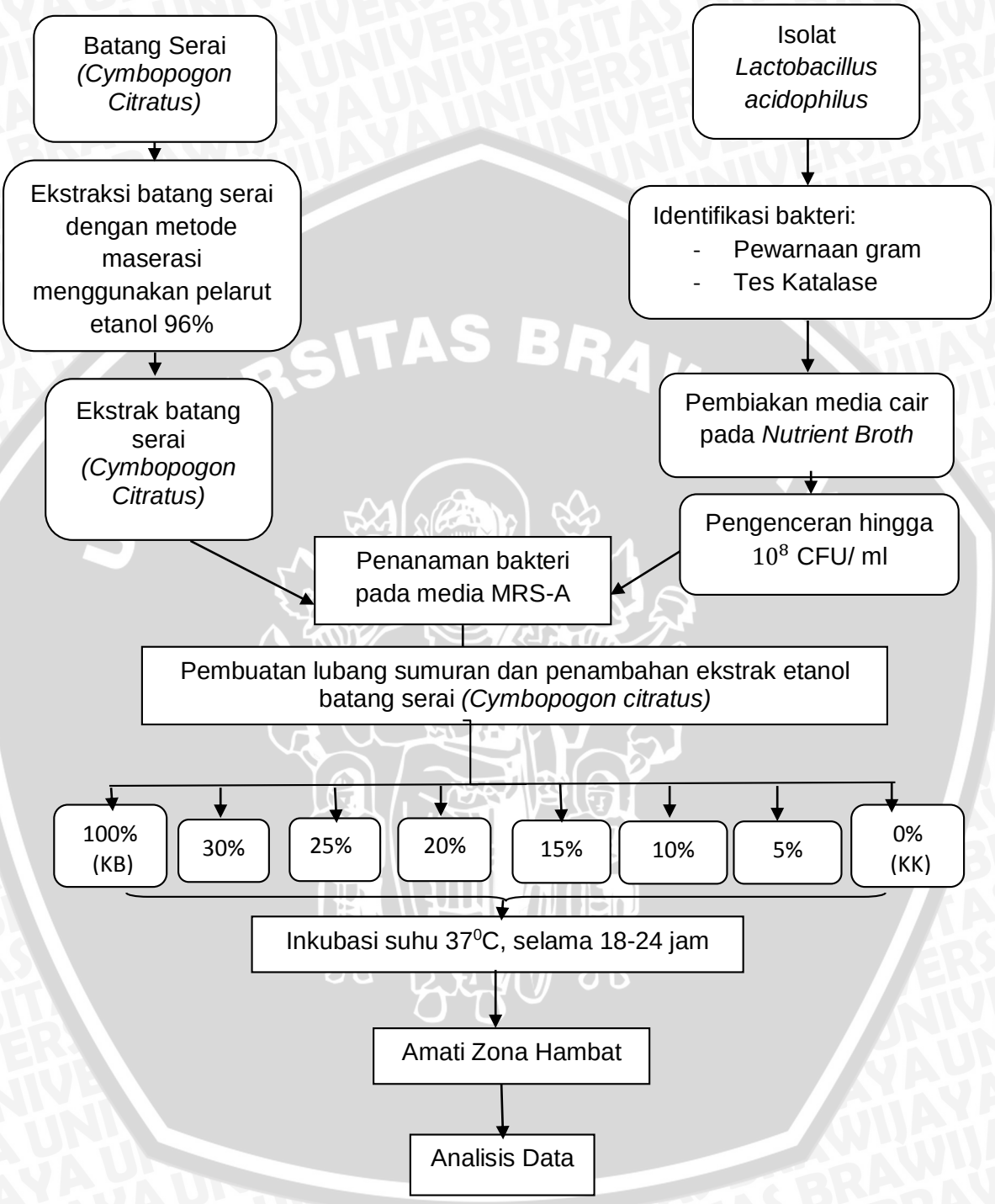
Setelah diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml sebanyak 10 ml, selanjutnya untuk mendapatkan suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml dilakukan dengan cara mengambil 1 ml dari suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml untuk dicampur dengan 9 ml NaCl 0,85% steril. Maka akan didapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^7 CFU/ml. Proses dilanjutkan sekali lagi dengan mengambil 1 ml dari suspensi 10^7 CFU/ml dicampur 9 ml NaCl 0,85% steril. Kini suspensi bakteri 10^6 CFU/ml siap digunakan untuk penelitian.

4.8.5 Uji Kepekaan Ekstrak etanol Batang Serai *(Cymbopogon Citratus)* terhadap *Lactobacillus acidophilus* (Ahmad *et al*)

Rangkaian uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol batang serai *(Cymbopogon citratus)*. adalah sebagai berikut:

1. Disediakan 8 *petridish*, pada masing-masing *petridish* dituangkan media MRS-A hangat sebanyak 15 ml, kemudian suspensi bakteri Lactobacillus acidophilus sebanyak 0,1 ml setara dengan 10^8 CFU/ml diinokulasi pada media tersebut dan diaduk sampai merata.
2. Setelah itu biarkan media memadat.
3. Pada setiap media MRS-A yang telah diinokulasi *Lactobacillus acidophilus* dibuat 4 lubang sumuran di daerah yang sebelumnya telah diberi label sesuai konsentrasi ekstrak etanol batang serai *(Cymbopogon citratus)*. yaitu 0% (kontrol negatif) , 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% dan 100% (kontrol positif) dengan diameter 5 mm.
4. Kemudian pada masing-masing lubang sumuran dimasukkan sebanyak 40 mikroliter ekstrak etanol batang serai *(Cymbopogon citratus)*.
5. Kemudian *petridish* diinkubasi pada suhu 37^0C selama 18-24 jam, kemudian diamati zona inhibisi yang terbentuk.

4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.11 Analisis Data

Data berdistribusi normal, analisis data yang digunakan adalah uji statistik parametrik yaitu *one way* ANOVA dan uji korelasi Pearson-regresi linier. Uji statistik *one way* ANOVA dengan derajat kepercayaan 95% (α = 0,05) digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak etanol batang serai *(Cymbopogon Citratus)* diameter zona hambat bakteri *Lactobacillus acidophilus*. Sedangkan uji korelasi Pearson digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol batang serai *(Cymbopogon Citratus)* terhadap diameter zona hambat bakteri *Lactobacillus acidophilus* dan uji regresi linier digunakan untuk membuat model persamaan regresi.