

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan desain penelitian eksperimental laboratorik dengan metode tes dilusi tabung untuk mengetahui efektifitas antimikroba ekstrak bunga cengkeh (*Eugenia aromaticum*) terhadap *Lactobacillus acidophilus* secara in-vitro.

Metode ini meliputi 2 tahap, yaitu tahap pengujian bahan di media cair dengan tujuan untuk mencari seberapa besar Kadar Hambat Minimum (KHM), kemudian dilanjutkan dengan tahap penggoresan/striking pada media agar BHI yang ditujukan untuk menentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak bunga cengkeh.

4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah bakteri *Lactobacillus acidophilus* yang digunakan diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta. Sedangkan bunga cengkeh dibeli langsung dari perkebunan cengkeh di Malang selatan, tepatnya di daerah Sumber Pucung, Kabupaten Malang, Jawa Timur.

Banyaknya pengulangan yang diperlukan untuk penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus (Solimun, 2001):

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

Keterangan :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

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

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Jadi jumlah pengulangan yang harus dilakukan untuk mendapatkan jumlah sampel yang dapat dipercaya adalah sebanyak empat kali pengulangan.

4.3. Variabel Penelitian

Pada penelitian ini digunakan 3 variabel, yaitu variabel bebas, variabel terikat, dan variabel terkendali:

- Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak bunga *Eugenia aromaticum* dengan konsentrasi 0,8%; 1%; 1,2%; 1,4%; dan 1,6% yang ditentukan setelah dilakukan penelitian pendahuluan.
- Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah pertumbuhan bakteri *Lactobacillus acidophilus*.
- Variabel terkendali pada penelitian ini adalah media pertumbuhan bakteri, cara ekstraksi bahan, jenis cengkeh, jenis bakteri, suhu, alat, dan bahan.

4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan April 2013.

4.5. Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan untuk pengukuran pada penelitian ini antara lain tabung Erlenmeyer, timbangan ukur, gelas ukur, pelubang sumuran, freezer, mortar dan pastle, spektrofotometer, ose, plate agar, mikroskop, api spiritus, object glass, tabung reaksi, pipet pengencer (*ependorf*), incubator, pipet steril, rak tabung reaksi, vortex, dan *colony counter*.

Beberapa bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain isolat bakteri *Lactobacillus acidophilus*, ekstrak bunga cengkeh, bahan pengecatan gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), H₂O₂ 3%, *microbact* 12B, minyak emersi, aquadest, methanol 96%, BHI (*brain heart infusion*) broth, kertas label, kertas saring, media agar BHI (*brain heart infusion*), media agar Muller-Hinton, kertas penghisap, tabung reaksi.

4.6. Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional menjelaskan tentang subjek yang terdapat dalam penelitian yaitu:

- A. Bunga cengkeh adalah bunga kering yang beraroma dan berasal dari suku *Myrtaceae* (Aksan, 2008). Bunga ini diketahui banyak mengandung senyawa antimikroba yaitu eugenol (Ayoola *et al*, 2008).
- B. *Lactobacillus acidophilus* adalah bakteri gram-positif, tidak berspora, fakultatif anaerob, terkadang mikroaerofilik, sedikit tumbuh di udara tapi bagus pada keadaan di bawah tekanan oksigen rendah. Koloni pada media agar biasanya 2-7 mm, cembung, dan tanpa pigmen (Holtj & Kreig, 1994).

- C. Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi terendah dari antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme tertentu (Andrews, 2001).
- D. Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi terendah dari antibakteri yang dapat membunuh mikroorganisme tertentu (Andrews, 2001).

4.7. Metode Kerja

Tahapan metode kerja pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Pengambilan sampel bunga cengkeh/*Euginia aromaticum*.
- b. Pengambilan sampel bakteri *Lactobacillus acidophilus*.
- c. Pembuatan ekstrak bunga cengkeh 100%. Bunga cengkeh yang telah kering ditimbang sebanyak 1 kg, kemudian diblender sehingga menjadi serbuk (simplicia). Serbuk dimasukkan ke dalam botol tertutup berwarna gelap agar terlindung dari sinar matahari dan direndam (dimaserasi) dengan methanol 1,5 liter. Pemeraserasian dilakukan pada suhu kamar, selama \pm 3 hari dan pengadukan dilakukan setiap hari. Setelah 3 hari pemaserasian, maserat kemudian disaring, filtrat dipisahkan dan ampasnya direndam kembali dengan methanol yang baru, maserasi dilakukan \pm 5 kali hingga diperoleh maserat yang terakhir berwarna jernih. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu tidak lebih dari 50°C dan diuapkan *in vacuo* sehingga terpisah pelarut methanol dengan ekstrak bunga cengkeh.
- d. Pengenceran konsentrasi dilakukan dengan melakukan pengenceran awal dari konsentrasi 100% menjadi 10% dengan cara mengambil 0,1 ml ekstrak 100% ditambah 0,9 ml aquades. Hal ini dilakukan untuk mempermudah pengenceran

ekstrak sesuai konsentrasi yang digunakan untuk penelitian serta mengurangi tingkat kesalahan yang terjadi karena rentang yang sangat kecil. Selanjutnya ekstrak dengan konsentrasi 10% tersebut kemudian diencerkan lagi (0,8%; 1%; 1,2%; 1,4%; dan 1,6%) dengan cara:

- Ekstrak cengkeh 1,6% dibuat dengan cara mengambil 0,16 ml ekstrak 10% ditambah 0,84 ml aquadest.
- Ekstrak cengkeh 1,4% dibuat dengan cara mengambil 0,14 ml ekstrak 10% ditambah 0,86 ml aquadest.
- Ekstrak cengkeh 1,2% dibuat dengan cara mengambil 0,12 ml ekstrak 10% ditambah 0,88 ml aquadest.
- Ekstrak cengkeh 1% dibuat dengan cara mengambil 0,1 ml ekstrak 10% ditambah 0,9 ml aquadest.
- Ekstrak cengkeh 0,8% dibuat dengan cara mengambil 0,08 ml ekstrak 10% ditambah 0,92 ml aquadest.
- Kontrol Positif (KP) merupakan biakan *Lactobacillus acidophilus*
- Kontrol Negatif (KN) merupakan 2 ml ekstrak cengkeh dengan konsentrasi 100%.

e. Identifikasi bakteri dengan pewarnaan gram dengan cara:

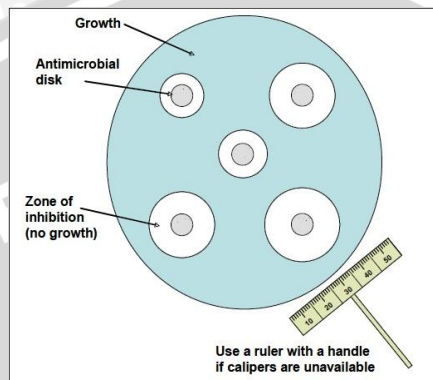
- Dibuat suspensi air suling dan koloni bakteri pada *object glass* dan dikeringkan udara
- Sesudah kering difiksasi di atas api bunsen
- Sediaan dituangi kristal violet selama 1 menit
- Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air

- Sediaan dituangi lugol selama 1 menit
 - Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air
 - Sediaan dituangi alkohol 96% selama 5-10 detik
 - Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air
 - Sediaan dituangi safranin selama 0,5 menit
 - Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air
 - Dikeringkan dengan kertas penghisap
 - Diamati dengan mikroskop pembesaran 100-400x dengan intensitas sinar rendah
- f. Tes Katalase. Untuk membedakan antara bakteri *Staphylococcus* dan *Lactobacillus acidophilus* dilakukan uji katalase, yaitu dengan menambahkan larutan H₂O₂ 3% pada perbenihan cair. *Staphylococcus* akan memberikan hasil positif yang ditunjukkan dengan munculnya gelembung udara. Langkah uji katalase sebagai berikut :
- Dibuat suspensi bakteri pada gelas obyek :
 - 1 tetes larutan aquadest steril
 - Ditambahkan 1 koloni bakteri
 - Ditetesi dengan 1 tetes H₂O₂ 3% dan diamati timbulnya gelembung – gelembung udara pada media perbenihan
- g. *Lactobacillus acidophilus* yang telah diidentifikasi dibiakkan pada medium cair dengan menggunakan BHI *broth* selama 1 x 24 jam pada suhu 37^oC
- h. Penyetaraan bakteri menggunakan spektrofotometer. Ambil 5 koloni (d ≥ 1mm) dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,85% steril. Kemudian

diukur Optical Density (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada $\lambda = 625 \text{ nm}$. Dari hasil yang diperoleh dibuat perbenihan cair bakteri yang mengandung 1×10^6 hingga 5×10^6 CFU/ml dengan rumus $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$. Untuk mendapatkan perbenihan cair bakteri yang mengandung 1×10^6 CFU/ml dilakukan dengan cara mengambil 1 ml (dari tabung yang mengandung 10^7 CFU/ml) untuk dicampur dengan 9 ml NaCl 0,85% steril. Maka akan didapatkan perbenihan cair bakteri dengan konsentrasi 1×10^6 CFU/ml (Murray *et al.*, 1999).

- i. Tes kemampuan bahan dengan metode difusi cakram. Sebelum dilakukan penelitian, perlu dilakukan penelitian pendahuluan untuk menguji kemampuan antibakteri bahan (bunga cengkeh) dengan metode difusi cakram seperti pada gambar 4.1. Berikut alur penelitian pendahuluan :
 - Dibuat ekstrak cengkeh dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5% dan 0%. Dimasukkan ke dalam 5 tabung berbeda. Konsentrasi yang digunakan pada penelitian pendahuluan ini lebih besar dari konsentrasi hasil eksplorasi karena penelitian pendahuluan ini hanya bertujuan untuk menguji kemampuan antibakteri tanpa menentukan KHM maupun KBMnya.
 - Pada plate Muller-Hinton, bakteri *Lactobacillus acidophilus* dikembangbiakkan dengan cara penggoresan
 - Bagi menjadi 5 buah daerah (sesuai konsentrasi yang akan dites).
 - Masukkan disc/cakram yang telah diberi ekstrak bunga cengkeh dengan konsentrasi yang akan dites pada setiap daerah dan tandai. Masukkan plate tersebut ke dalam incubator dan tunggu selama 18-24 jam pada suhu $36-37^\circ$

- Akan nampak area sekitar cakram yang bersih / tanpa koloni bakteri, yang disebut zona hambat.
- Hitung diameter zona hambat.



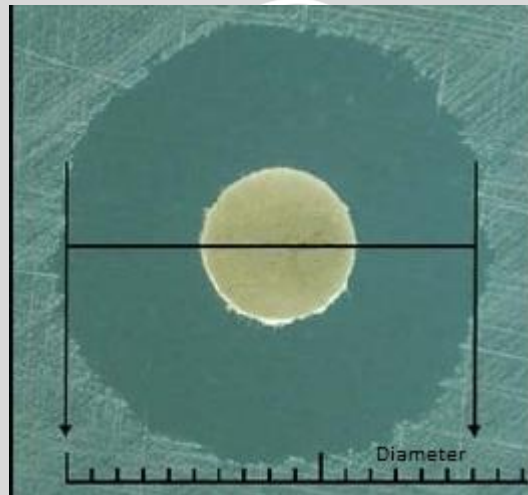
Gambar 4.1 Plate Metode Difusi Cakram (Centers for Disease Control and Prevention, 2011).

- j. Tes sensitivitas dengan metode difusi. Prosedur yang dilakukan yaitu siapkan tabung reaksi untuk koloni *Lactobacillus acidophilus* yang dibiakkan dalam BHI dan telah disetarakan kekeruhannya dengan spektrofotometer. Kemudian siapkan ekstrak dalam berbagai konsentrasi. Siapkan pula kontrol negatif (KN) dan kontrol positif (KP). Kemudian tambahkan *Lactobacillus acidophilus* pada masing-masing tabung konsentrasi ekstrak dan tabung kontrol positif. Inkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, lihat kekeruhan pada tabung. Dari kekeruhan ini didapatkan nilai KHM. Untuk memperoleh data KBM, dilakukan penanaman isi tabung sebanyak 0,1 mL (satu mata ose) pada media agar BHI. Kemudian diinkubasi dalam suasana anaerob selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, lihat *colony forming unit* yang terbentuk. Dari hasil tersebut, tentukan nilai KBM. KBM ditentukan dari tidak adanya jumlah

koloni yang tumbuh pada SDA atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% jumlah koloni di OI.

4.8. Cara mengukur zona hambat

Zona hambat yang dihasilkan dalam penelitian pendahuluan dengan metode difusi cakram dapat dihitung dengan menghitung panjang diameter dari zona hambat yang terbentuk menggunakan jangka sorong atau penggaris seperti pada gambar 4.2.



Gambar 4.2 Penghitungan Zona Hambat Pada Plate Metode Difusi

Cakram (Centers for Disease Control and Prevention, 2011).

4.9. Analisis Data

Setelah diperoleh hasil dari 4 kali pengulangan percobaan, kemudian data-data jumlah koloni yang tumbuh dianalisa dengan menggunakan uji statistik *One Way ANOVA*, dan uji statistik korelasi-regresi. Uji statistik *one way ANOVA* dilakukan dengan menggunakan derajat kepercayaan sebesar 95 % ($\alpha = 0,05$). Apabila didapatkan nilai signifikansi (α) kurang dari 0,05 maka hipotesis diterima dan

apabila didapatkan nilai signifikansi (α) lebih besar dari 0,05 maka hipotesis ditolak. Uji statistik ini digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan efek pemberian berbagai konsentrasi ekstrak bunga cengkeh terhadap jumlah koloni bakteri *Lactobacillus acidophilus* yang terbentuk. Sedangkan uji korelasi-regresi digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan konsentrasi ekstrak bunga cengkeh terhadap jumlah koloni bakteri *Lactobacillus acidophilus* dan mengetahui bagaimana sifat hubungan tersebut, apakah dengan peningkatan konsentrasi akan menjadi penurunan jumlah koloni, dan sebaliknya, atau tidak berhubungan. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 19.0.



4.10. Alur Penelitian

