

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan rancangan penelitian eksperimental laboratorik dengan metode *agar dilution test* dan difusi sumuran untuk mengetahui efektifitas antimikroba ekstrak biji kakao terhadap *Lactobacillus acidophilus* secara in-vitro.

4.2 Populasi dan Sample Penelitian

Sampel yang digunakan adalah bakteri *Lactobacillus acidophilus* yang digunakan diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta. Sedangkan biji Kakao dibeli dari kebun kakao yang berada di kota Blitar.

Dalam penelitian ini, banyaknya pengulangan ditentukan dengan menggunakan rumus estimasi besar pengulangan (Solimun, 2001) sebagai berikut :

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

Keterangan :

n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan/jumlah konsentrasi

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 Penentuan Variabel Penelitian

Pada penelitian ini digunakan 3 variabel, yaitu variabel terikat, variabel terikat, dan variabel kendali :

- Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak buah kakao dengan konsentrasi 2%, 4%, 6%, 8%, 10%. Konsentrasi tersebut didapatkan dari hasil penelitian pendahuluan yang dilakukan menggunakan metode dilusi tabung.
- Variabel terikat pada penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Lactobacillus acidophilus*.
- Variabel kendali dalam penelitian ini adalah media pertumbuhan bakteri, cara ekstraksi bahan, jenis kakao, jenis bakteri, bahan dari peralatan yang dipakai, serta suhu.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

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

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah 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 (*eppendorf*), inkubator, pipet steril, rak tabung reaksi, vortex.

Sedangkan, bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri *Lactobacillus acidophilus*, serbuk biji kakao, H₂O₂ 3%, *microbact* 12B, minyak emersi, aquadest, etanol 96%, BHI (*Brain Heart Infusion*) broth, kertas penghisap.

4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional menjelaskan tentang subjek yang terdapat dalam penelitian yaitu :

- a. Biji kakao adalah biji dari buah kakao yang berwarna coklat dan memiliki bau yang khas. Biji ini mengandung senyawa fenolik yang dapat dijadikan sebagai antimikroba
- b. Ekstraksi biji kakao menggunakan teknik ekstraksi maserasi dengan pelarut ethanol. Teknik ekstraksi ini hanya membutuhkan waktu ± 10 jam. Hasilnya paling baik dibandingkan pelarut yang lain
- c. *Lactobacillus acidophilus* adalah bakteri yang terdapat pada rongga mulut, penyebab karies. Terutama dapat ditemukan di karies akar.
- d. Zona hambat merupakan zona yang terbentuk pada cakram akibat interaksi antar bakteri dan zat antimikroba.

4.7 Prosedur Penelitian

Pembuatan ekstrak biji kakao dilakukan dengan cara:

- Biji kakao dihaluskan kemudian dijemur hingga menjadi bubuk kakao.
- 100 gram bubuk biji kakao dimasukkan dalam tabung Erlenmeyer, kemudian ditambahkan 150 ml etanol.

- Tutup tabung Erlenmeyer dengan rapat, lalu kocok perlahan-lahan. Pengocokan dilakukan 1-2 kali sehari.
- Simpan tabung Erlenmeyer dalam suhu ruangan selama tiga hari.
- Setelah tiga hari, campuran disaring dengan kertas filter hingga bebas dari partikel kasar.
- Diperoleh larutan ekstrak biji kakao dengan konsentrasi 100%.
- Hasil selanjutnya di evaporasi (untuk memisahkan pelarut etanol dengan ekstrak biji kakao dengan menggunakan bantuan alat *rotavapor*).

Ekstrak kakao yang sudah di rotavapor, dibagi menjadi berbagai konsentrasi:

- 10% = 0,1 ml ekstrak 100% ditambah 0,9 ml aquadest
- 8% = 0,08 ml ekstrak 100% ditambah 0,92 ml aquadest
- 6% = 0,06 ml ekstrak 100% ditambah 0,94 ml aquadest
- 4% = 0,04 ml ekstrak 100% ditambah 0,96 ml aquadest
- 2% = 0,02 ml ekstrak 100% ditambah 0,98 ml aquadest
- 0% = 1 ml aquadest. (sebagai Kontrol Bakteri)

Setelah itu dilakukan tes katalase pada bakteri untuk membedakan antara bakteri *Staphylococcus* dan *Lactobacillus acidophilus* dilakukan uji katalase, yaitu dengan menambahkan larutan H_2O_2 3% pada perbenihan cair. *Lactobacillus acidophilus* akan memberikan hasil positif yang ditunjukkan dengan tidak terbentuk gelembung udara. Kemudian dilakukan tes katalase dengan cara:

- 1 tetes larutan aquadest steril
- Ditambahkan 1 koloni bakteri
- Ditetesi dengan 1 tetes H_2O_2 3% dan diamati timbulnya gelembung – gelembung udara pada media perbenihan

Pembiakan Bakteri dengan BHI *broth* dilakukan dengan cara, *Lactobacillus acidophilus* yang telah diidentifikasi dibiakkan pada medium agar dengan menggunakan BHI *broth* selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C. Sesudah bakteri dibiakan, dilakukan tes kemampuan bahan dengan metode difusi sumuran dan tes sensitivitas dengan menggunakan metode dilusi agar.

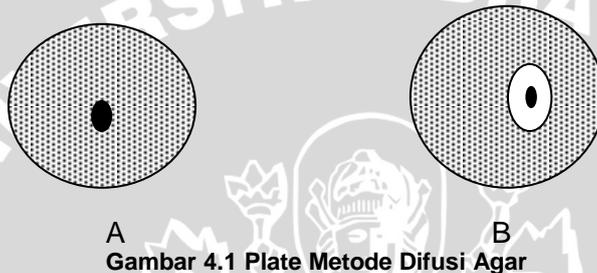
Sebelum dilakukan penelitian, perlu dilakukan penelitian pendahuluan untuk menguji kemampuan antibakteri bahan (biji kakao) dengan metode dilusi tabung, dengan cara:

1. Siapkan tabung reaksi untuk koloni *Lactobacillus acidophilus* yang dibiakkan dalam BHI dan telah disetarakan kekeruhannya dengan spektrofotometer.
2. Siapkan ekstrak dalam berbagai konsentrasi dan kontrol positif (KP). Kemudian tambahkan *Lactobacillus acidophilus* pada masing-masing tabung konsentrasi ekstrak dan tabung kontrol positif.
3. Inkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, lihat kekeruhan pada tabung. Dari kekeruhan ini didapatkan nilai KHM.
4. Untuk memperoleh data KBM, dilakukan penanaman isi tabung sebanyak 0,1 ml (satu mata ose) pada media agar BHI.
5. Kemudian diinkubasi dalam suasana anaerob selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, lihat *colony forming unit* yang terbentuk.

Setelah mengetahui konsentrasi yang paling efektif, dilanjutkan dengan tes sensitivitas menggunakan difusi sumuran, dengan cara:

1. Dibuat ekstrak biji kakao dengan konsentrasi 10%, 8%, 6%, 4%, dan 2%. Dimasukkan ke dalam 5 tabung berbeda
2. Pada plate BHI, biakkan bakteri *Lactobacillus acidophilus* dengan cara pencampuran bakteri di dalam agar.

3. Buat sumur (well) pada media plate BHI dengan diameter 6mm dengan jarak tertentu sebanyak 1 buah, diletakan ditengah plate.
4. Masukkan ekstrak kakao pada sumur.
5. Masukkan plate tersebut ke dalam inkubator dan tunggu selama 18-24 jam pada suhu 36-37°
6. Akan nampak area sekitar sumur yang bersih / tanpa koloni bakteri, yang disebut zona hambat
7. Hitung diameter zona hambat, seperti pada gambar 4.1



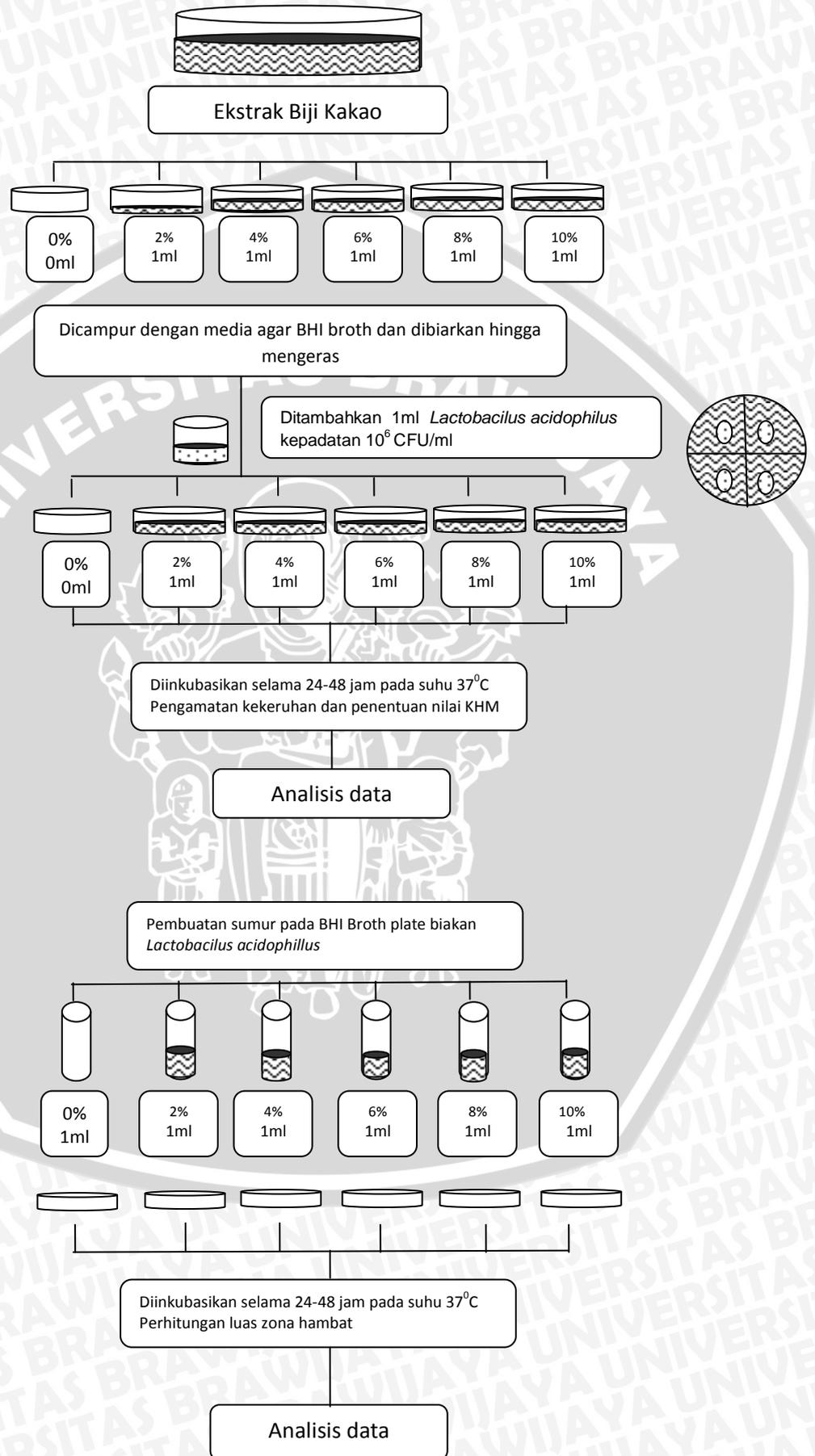
Gambar 4.1 Plate Metode Difusi Agar

A = Plate agar dengan sumur berisi ekstrak biji kakao dengan konsentrasi tertentu

B = Plate agar yang menunjukkan zona hambat

Prosedur yang dilakukan untuk tes sensitivitas dengan metode dilusi agar yaitu siapkan media biakan yang telah dicampur dengan ekstrak sesuai dengan konsentrasi yang diperlukan untuk koloni *Lactobacillus acidophilus* yang dibiakkan dalam BHI dan telah disetarakan kekeruhannya dengan spektrofotometer. Kemudian tunggu hingga agar menjadi padat. Siapkan pula kontrol positif (KP). Kemudian tambahkan *Lactobacillus acidophilus* pada masing-masing plate konsentrasi ekstrak dan plate kontrol positif. Inkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, lihat lapisan koloni bakteri yang terbentuk. Plate dengan konsentrasi terendah yang bersih dari bakteri merupakan KHM.

4.8. Alur Penelitian



4.9 Analisis Data

Setelah diperoleh hasil dari empat kali pengulangan percobaan, dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas, kemudian data-data diameter zona hambat dianalisis dengan menggunakan uji statistik *One Way ANOVA*, dan uji statistik korelasi-regresi. Uji statistik *one way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$) digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak biji kakao terhadap jumlah koloni bakteri *Lactobacillus acidophilus*. Sedangkan uji korelasi-regresi digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan konsentrasi ekstrak kakao terhadap jumlah koloni bakteri *Lactobacillus acidophilus* dan mengetahui bagaimana sifat hubungan tersebut, apakah dengan peningkatan konsentrasi akan menjadi penurunan diameter zona hambat, dan sebaliknya, atau tidak berhubungan. Kemudian, untuk hasil dilusi agar yang berdata ordinal, diuji menggunakan analisis non-parametrik *chi-square* dan uji korelasi Spearman. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 19.0.