BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian true eksperimental post control design only secara in vitro. Menggunakan metode dilusi tabung untuk mengatahui Kadar Hambat Minimum (KHM), dilanjutkan penggoresan pada media Brain Heart Infusion Agar (BHIA) untuk mengetahui kadar bunuh minimum (KBM).

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada tanggal 18 September 2013 – 13 Februari 2014.

4.3 Sampel dan Besar Sampel

Sampel yang digunakan adalah isolat bakteri *Streptococcus pyogenes* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus berikut ini (Loekito, 1998):

p $(n-1) \ge 15$

 $5 (n-1) \ge 15$

 $5n-5 \ge 15$

 $5n \geq 20$

 $n \geq 4$

Keterangan:

p = perlakuan (konsentrasi 5 level)

n = jumlah sampel

15 = nilai konstanta

BRAWIJAYA

Jadi, untuk lima jenis perlakuan, diperlukan jumlah sampel atau ulangan paling sedikit 4 kali untuk masing-masing perlakuan.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah destilasi air bunga cengkeh yang terdiri dari 5 konsentrasi, yaitu konsentrasi I, II, III ,IV, dan V yang ditentukan sebagai konsentrasi eksplorasi pada penelitian pendahuluan. Rentang konsentrasi penelitian yang sebenarnya akan ditentukan setelah penelitian eksplorasi.

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* dengan melihat tingkat kekeruhan yang dihasilkan pada media cair untuk mencari KHM (kadar hambat minimum) dan jumlah koloni pada media padat sebagai parameter KBM (kadar bunuh minimum).

4.5 Definisi Operasional

- 4.5.1 Minyak atsiri diperoleh dari bunga cengkeh (*Syzgium aromaticum Linn*.) yang didestilasi dengan air. Bunga cengkeh diperoleh dan divalidasi di Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Timur UPT Materia Medica Batu.
- 4.5.2 Isolat *Streptococcus pyogenes* adalah isolat yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlannga Surabaya dan telah divalidasi dengan uji biokimia.
- 4.5.3 KHM adalah kadar hambat minimum, yaitu konsentrasi minyak atsiri bunga cengkeh terendah yang mampu menghambat bakteri Streptococcus pyogenes, ditandai dengan hasil biakan yang

- dibandingkan dengan tampak larutan kontrol jernih (tidak ada pertumbuhan bakteri), setelah diinkubasikan 18-24 jam.
- 4.5.4 Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi minyak atsiri bunga cengkeh terendah yang mampu membunuh bakteri Streptococcus pyogenes. KBM ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri atau kurang dari 0,1% Original Inoculum (OI) pada media Brain Heart Infusion Agar (BHIA) setelah dilakukan penggoresan sebanyak 1 ose.
- 4.5.5 Original Inoculum (OI) adalah inokulum bakteri dengan konsentrasi 10⁶ CFU/ml yang diinokulasikan pada media agar padat sebelum inkubasi. Digunakan untuk mencari KBM setelah diinokulasikan 18-24 jam yang dibandingkan dengan bahan kontrol negatif.

4.6 Alat dan Bahan

Untuk Ekstraksi Kuncup Bunga Cengkeh 4.6.1

- a. Kuncup bunga cengkeh kering
- Penggiling
- Alat destilasi Stahl
- Timbangan analis
- Gelas ukur
- Aquadest f.
- g. Na₂SO₄

Untuk Identifikasi Bakteri 4.6.2

a. Isolat bakteri

- b. Bahan-bahan pengecatan Gram (Kristal Violet, Lugol, Alkohol, dan Safranin)
- Brain Heart Infusion Agar (BHIA)
- d. Blood Agar Plate (BAP)
- Cakram Basitrasin
- Object glass, minyak emersi, ose, mikroskop

Untuk Dilusi Tabung 4.6.3

- Tabung reaksi dengan label konsentrasi
- RAWIUNA Tabung reaksi untuk kontrol bakteri dan ekstrak
- Pipet steril
- Inkubator
- e. Hasil ekstraksi
- Perbenihan cair bakteri dengan kepadatan 10⁶ CFU/ml
- g. Aquades
- h. Vortex

4.6.4 Untuk Streaking Plate

- BHIA
- Ose b.
- Bunsen C.
- Vortex

Untuk Pembuatan Bahan Cair Bakteri dengan Kepadatan 10⁶ CFU/ml 4.6.5

a. Tabung reaksi

- b. Muiller Hinton Broth (MH Broth)
- c. Pipet steril
- d. Larutan NaCl
- e. Vortex
- f. Spektrofotometer

4.7 Alur Operasional Penelitian

4.7.1 Pembuatan Bahan Uji

- a. Sejumlah bahan kuncup bunga cengkeh dicuci bersih, kemudian dijemur hingga benar-benar kering.
- b. Bunga cengkeh yang sudah kering kemudian digiling hingga menjadi serbuk.
- c. Sebanyak 50 g serbuk dimasukkan dalam labu destilasi dan ditambahkan aquadest sampai mencapai volume 500 ml.
- d. Selanjutnya alat destilasi Stahl dipasang dan buret diisi air hingga penuh, kemudian dipanaskan dengan penangas udara.
- e. Destilasi dilakukan selama 4 jam. Setelah 4 jam dibiarkan dingin dulu selama 15 menit. Minyak atsiri yang terpisah berada diatas lapisan air dikumpulkan.
- f. Tambah minyak dengan Na₂SO₄ anhidrat untuk pembebasannya dengan air, sehingga diperoleh minyak atsiri yang murni (Departemen Kesehatan RI, 1979).

4.7.2 Identifikasi Streptococcus pyogenes

Identifikasi *Streptococcus pyogenes* dilakukan dengan sejumlah tes yang terdiri atas pewarnaan Gram, tes hemolitik, dan tes cakram basitrasin.

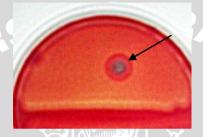
Pewarnaan Gram bertujuan untuk membedakan bakteri Gram positif atau negatif. Tes hemolitik bertujuan untuk menentukan sifat hemolisis dari bakteri. Pada *Streptococcus pyogenes* akan didapat bahwa sebagian plate tampak bening karena bersifat β-hemolitik. Tes cakram basitrasin membedakan *Streptococcus pyogenes* dengan grup *streptococcus* lainnya. Koloni *Streptococcus pyogenes* yang sangat kecil akan menghasilkan zona hambat di sekitar cakram basitrasin.

1. Pewarnaan Gram

- a. Object glass dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak. Biarkan menjadi dingin.
- b. Sediaan apusan bakteri Streptococcus pyogenes dibuat pada object glass dengan ketebalan yang cukup (tidak terlalu tebal, juga tidak terlalu tipis).
 Setelah mengering di udara, apusan difiksasi dengan cara dilewatkan di atas api bunsen sebanyak tiga kali.
- c. Sediaan dituangi dengan larutan kristal violet selama 1 menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan aquadest steril.
- d. Sediaan dituangi dengan lugol selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan aquadest steril.
- e. Sediaan dituangi dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan aquadest steril.
- Sediaan dituangi dengan safranin selama 30 detik. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan aquadest steril (Campbell, 2000).

2. Tes Cakram Basitrasin

Media *Blood Agar Plate* yang sebelumnya telah diinokulasikan bakteri ditempeli cakram basitrasin. Koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* yang bersifat β-hemolitik akan membentuk zona bening di sekeliling koloninya, tak ada sel darah merah yang masih utuh, zona tidak bertambah lebar setelah disimpan dalam peti es. (Campbell, 2000; Mukti, 2008)



Gambar 4.1 Tes Cakram Basitrasin pada *Streptococcus pyogenes* pada Media BAP. Nampak bahwa terjadi lisis pada darah (tanda panah) di sekitar koloni bakteri sehingga terdapat zona bening (Elliot, 2008).

4.7.3 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri Dengan Kepadatan 10⁶ bakteri/ml

Suspensi bakteri pada *Muiller Hinton Broth* dispektrofotometri dengan λ=625 sehingga diketahui *Optical Density* (OD) yang setara dengan 10⁸ bakteri/ml. Kemudian dengan rumus pengenceran N1. V1 = N2.V2, kepadatan bakteri tersebut diencerkan 2X dengan larutan NaCl menjadi 10⁶ bakteri/ml.

4.7.4 Uji Efek Antibakteri

- a. Disiapkan 7 tabung steril, 5 tabung reaksi untuk setiap perlakuan, 1 tabung kontrol bakteri (KB), dan 1 tabung kontrol ekstrak (KE).
- b. Hal yang pertama dilakukan adalah mencari dosis dengan penelitian eksplorasi. Setiap tabung (tabung 1 sampai dengan tabung 5) diisi sediaan destilasi bunga cengkeh dengan konsentrasi I-V.
- c. Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan konsentrasi bakteri 10⁶
 bakteri/ml. Lalu tabung 1 sampai 5 serta kontrol bakteri (KB) masing-

- masing ditambahkan 1 ml suspensi *Streptocuccos pyogenes* dengan konsentrasi 10⁶ bakteri/ml
- d. Semua tabung diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37°C
- e. Hari kedua semua tabung dikeluarkan dari inkubator
- f. Diamati kekeruhan yang terjadi pada semua tabung dan tentukan KHM. Kekeruhan tabung dilihat dengan membandingkan dengan kontrol ekstrak dan menempelkan kertas putih dengan beberapa garis hitam dengan ketebalan yang berbeda pada belakang tabung. Jika seluruh garis terlihat, tabung berarti sudah jernih
- g. Dari tabung yang tidak menunjukkan kekeruhan, diambil bakteri sebanyak
 1 ose kemudian digoreskan pada BHIA, dan diinkubasikan selama 18-24
 jam dengan suhu 37°C
- h. Jumlah koloni pada BHIA dihitung dengan menggunakan colony counter dan tentukan KBM. KBM ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri atau pertumbuhan koloni bakteri kurang dari 0,1% original Inoculum (OI).

Gambar 4.2 Alur Penelitian. Keterangan dibaliknya (halaman 33)

Keterangan (lanjutan Gambar 4.2 halaman 32)

CFU : Colony Forming Unit

KB : Kontrol bakteri Streptococcus pyogenes

KE : Kontrol Ekstrak

OI : Original inoculum dengan kepadatan 10⁶ CFU/ml (penggoresan 1 ose)

K I, K II, K III, K IV, K V : Konsentrasi ke 1 sampai ke 5 yang akan ditentukan dengan penelitian

pendahuluan (V/V)

4.8 Pengumpulan Data

Data yang diperoleh berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif didapatkan dengan cara melihat tingkat kekeruhan. Data kuantitatif didapat dengan cara menghitung jumlah koloni Streptococcus pyogenes dengan menggunakan colony counter.

4.9 Analisis Data

Data kualitatif dan kuantitatif terlebih dahulu dilakukan uji distribusi dan homogenitas varian menggunakan tes Kolmogorov Smirnov. Apabila data terdistribusi normal, analisis data yang digunakan adalah uji statistik *one way* ANOVA dan uji statistik korelasi-regresi. Lalu dilakukan uji statistik *one way* ANOVA, dengan derajat kepercayaan 95 % (α = 0,05). Uji ini digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi destilasi bunga cengkeh terhadap jumlah koloni *S.pyogenes*. Sedangkan uji korelasi-regresi digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara konsentrasi destilasi air bunga cengkeh terhadap pertumbuhan koloni *S.pyogenes*. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for *Windows* versi 17.0.