

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental laboratorik *in vitro* dengan menggunakan metode dilusi tabung.

4.2 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):

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

p = perlakuan (konsentrasi 5 level)

n = jumlah sampel

15 = nilai konstanta

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

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Dalam penelitian ini, yang merupakan variabel bebas adalah ekstrak etanol daun cengkeh dengan konsentrasi 0.8%, 1%, 1.2%, 1.4%, dan 1.6%. Variasi pemberian konsentrasi yang akan dilakukan dalam eksperimen didapatkan terlebih dahulu dengan penelitian pendahuluan.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah

- a. Pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* yang diobservasi dengan melihat tingkat kekeruhan pada media *Brain Heart Infusion Broth* sebagai parameter untuk menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM)
- b. Jumlah koloni *Streptococcus pyogenes* yang tumbuh pada media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) yang merupakan parameter untuk menentukan Kadar Bunuh Minimal (KBM) dari ekstrak etanol daun cengkeh.

4.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan November 2013 - Januari 2014.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Untuk Pembuatan Ekstrak Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum*)

- a. Daun cengkeh kering
- b. Blender
- c. Timbangan analis
- d. Labu Erlenmeyer
- e. Etanol 96%
- f. *Rotary vaccum evaporator*
- g. Gelas ukur
- h. Tabung pendingin
- i. Pemanas *aquades*

4.5.2 Untuk Identifikasi Bakteri *Streptococcus pyogenes*

- a. Isolat bakteri
- b. Bahan-bahan pengecatan gram (Kristal Violet, Lugol, Alkohol, dan Safranin)
- c. Bahan tes katalase (larutan H₂O₂ 3%)
- d. BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*)
- e. BAP (*Blood Agar Plate*)
- f. Cakram Basitrasin
- g. *Object glass*, minyak emersi, ose, mikroskop

4.5.3 Untuk Dilusi Tabung

- a. Tabung reaksi dengan label konsentrasi
- b. Tabung reaksi untuk kontrol bakteri dan ekstrak

- c. Pipet steril
- d. Inkubator
- e. Hasil ekstraksi
- f. Perbenihan cair bakteri dengan kepadatan 10^6 CFU/ml
- g. *Aquades*
- h. Vortex

4.5.4 Untuk Streaking Plate

- a. BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*)
- b. Ose
- c. *Burner*
- d. Vortex

4.5.5 Untuk Pembuatan Bahan Cair Bakteri dengan Kepadatan 10^6 CFU/ml

- a. Tabung reaksi
- b. MH Broth (*Mueller Hinton Broth*)
- c. Pipet steril
- d. Larutan NaCl (Natrium Klorida)
- e. Vortex
- f. Spektrofotometer

4.6 Definisi Operasional

- a. Ekstrak etanol daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) dibuat dari 1 kg daun cengkeh yang tua. Daun ini diperoleh di Materia Medica, Batu dan diekstrak dengan pelarut etanol 96%.

- b. Isolat *Streptococcus pyogenes* adalah isolat yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- c. KHM adalah kadar hambat minimum, yaitu konsentrasi antimikroba ekstrak etanol daun cengkeh terendah yang mampu menghambat bakteri *Streptococcus pyogenes*, ditandai dengan hasil biakan tampak jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba), setelah diinkubasikan 18-24 jam dengan larutan kontrol (Dzen *dkk*, 2003).
- d. Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi antimikroba ekstrak etanol daun cengkeh terendah yang mampu membunuh bakteri *Streptococcus pyogenes*, ditandai dengan tidak tumbuhnya koloni mikroba pada BHIP (Dzen *dkk*, 2003).
- e. *Original Inoculum* (OI) adalah inokulum bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml yang diinokulasikan pada media agar padat sebelum inkubasi. OI digunakan untuk mencari KBM setelah diinokulasikan 18-24 jam yang dibandingkan dengan bahan kontrol negatif. KBM ditentukan dari tidak adanya jumlah koloni yang tumbuh pada BHIA atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% jumlah koloni di OI.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Daun Cengkeh

4.7.1.1 Proses Ekstraksi

Cuci bersih 1 kg daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) yang akan dikeringkan kemudian potong kecil-kecil lalu dioven dengan suhu 80° C atau dikeringkan dengan cara diangin-anginkan sampai kering. Setelah kering akan didapatkan daun cengkeh yang berkurang beratnya menjadi sekitar 300 – 450

gram. Haluskan daun tersebut dengan blender sehingga bentuknya menyerupai bubuk, kemudian timbang dan ambil bubuk daun cengkeh tersebut sebanyak 100 gr. Masukkan 100 gr bubuk daun cengkeh tersebut ke dalam labu Erlenmeyer ukuran 1 liter lalu rendam dengan etanol 96% sampai volume 900 ml. Kocok sampai benar-benar tercampur, kurang lebih 30 menit dan diamkan satu malam sampai mengendap. Setelah satu malam, ambil lapisan atas campuran etanol 96% dengan zat aktif yang sudah terambil dan lanjutkan pada proses evaporasi.

4.7.1.2 Proses Evaporasi

Evaporator set dipasang pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan 30-40° terhadap meja dengan susunan dari bawah ke atas alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotary evaporator* dan tabung pendingin. Lalu tabung pendingin dihubungkan dengan pompa sirkulasi air dingin yang terhubung dengan bak penampung air dingin dengan melalui pipa plastik. Tabung pendingin juga terhubung dengan pompa vakum dan penampung hasil penguapan.

Hasil ekstraksi dimasukkan dalam labu penampung lalu *rotary evaporator*, alat pompa sirkulasi air dingin dan alat pompa vakum dinyalakan. Pemanas *aquades* juga dinyalakan sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi mendidih dengan suhu 80° C (sesuai titik didih etanol 96%) dan etanol 96% mulai menguap.

Hasil penguapan etanol 96% dikondensasikan menuju labu penampung etanol 96% sehingga tidak tercampur hasil evaporasi dan uap lain tersedot pompa vakum.

Proses evaporasi dilakukan hingga volume hasil ekstraksi berkurang dan menjadi kental. Setelah kental evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil. Hasil evaporasi ditampung dalam cawan penguap kemudian di oven selama 2 jam pada suhu 80° C untuk menguapkan pelarut yang tersisa sehingga didapatkan hasil ekstraksi 100%.

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 dan 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.

4.7.2.1 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 air.

- d. Sediaan dituangi dengan lugol selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- e. Sediaan dituangi dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- f. Sediaan dituangi dengan safranin selama 30 detik. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.

4.7.2.2 Tes Katalase

Tes katalase merupakan tes untuk mendeteksi adanya kaseinase, yaitu enzim yang dapat menghidrolisis protein susu kasein. Bakteri yang menggunakan kasein akan muncul sebagai koloni yang dikelilingi oleh *clear zone*. Tes ini digunakan untuk membedakan *Streptococcus* dari *Staphylococcus*.

1. Mengambil sebagian perbenihan cair pada tabung
2. Menetesi dengan 1 ml larutan H₂O₂ 3%
3. Bila gelembung tidak muncul, maka koloni bakteri dalam tabung reaksi bersifat katalase negatif (bakteri *Streptococcus*)

4.7.2.3 Tes Cakram Basitrasin

Media *Blood Agar Plate* yang sebelumnya telah diinokulasikan bakteri ditempli cakram basitrasin. Koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* yang bersifat β -hemolitik akan menghasilkan zona inhibisi di sekitar cakram. Tes cakram basitrasin membedakan *Streptococcus pyogenes* dengan grup *Streptococcus* lainnya.

4.7.3 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri Dengan Kepadatan 10⁶ bakteri/ml

Suspensi bakteri pada MH Broth dispektrofotometri dengan $\lambda=625$ sehingga diketahui *Optical Density* (OD) yang setara dengan 10⁸ bakteri/ml.

Kemudian dengan rumus pengenceran $N1.V1 = N2.V2$, kepadatan bakteri tersebut diencerkan 2 kali dengan NaCl menjadi 10^6 bakteri/ml (Murray et. al., 1999).

4.7.4 Pengujian Efek Antimikroba

- a. Disiapkan tujuh buah tabung reaksi. Lima tabung digunakan untuk uji antibakteri, satu tabung digunakan untuk kontrol bakteri, dan satu tabung digunakan untuk kontrol bahan.
- b. Pengisian ekstrak ke dalam serial tabung dilusi dan aquades steril pada masing-masing tabung sebanyak 1 ml. Diperoleh variasi konsentrasi dari penelitian pendahuluan yaitu 0,8%, 1%, 1,2%, 1,4%, 1,6%.
- c. Ke dalam masing-masing tabung ditambahkan perbenihan cair bakteri yang berisi 10^6 CFU/ml. Tabung yang berisi 0 ml ekstrak merupakan kontrol bakteri. Perbenihan cair bakteri dimasukkan pada semua tabung konsentrasi di atas, masing-masing sebanyak 1 ml.
- d. Tabung yang berisi kontrol bakteri digoreskan pada medium BHIA sebagai *original inoculum* kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- e. Masing-masing tabung di-vortex dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- f. Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. KHM didapatkan dengan cara melihat kejernihan tabung
- g. Perlakuan yang sama dilakukan pada *streaking plate* yang menggunakan medium agar padat (BHIA). Pada masing-masing tabung dilusi, diambil satu ose kemudian diinokulasikan pada BHIA. Disiapkan 6 buah cawan petri yang diberi medium BHIA. Bakteri diinokulasikan pada masing-

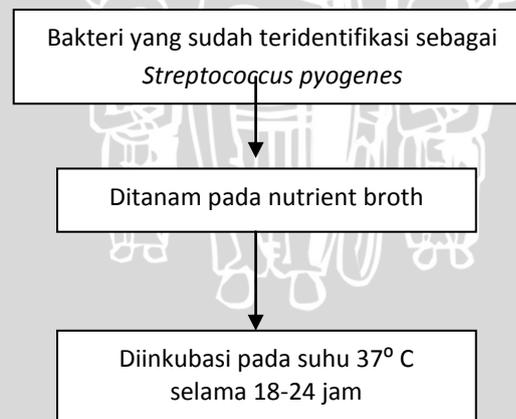
masing medium dengan menggoreskan satu ose pada masing-masing cawan petri. Kemudian diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37°C.

- h. 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 atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% jumlah koloni di OI.

4.7.5 Skema Alur Penelitian

Sebelum dilakukan pembuatan ekstrak bahan uji, dilakukan identifikasi dan pemurnian bakteri. Skema pembuatan ekstrak, preparasi bakteri uji, dan alur penelitian dijelaskan pada penjelasan berikut ini.

a. Preparasi Bakteri Uji



b. Pembuatan Ekstrak

100 g bubuk daun cengkeh + 900 ml
etanol 96 %

Dikocok selama 30 menit dan
diamkan satu malam

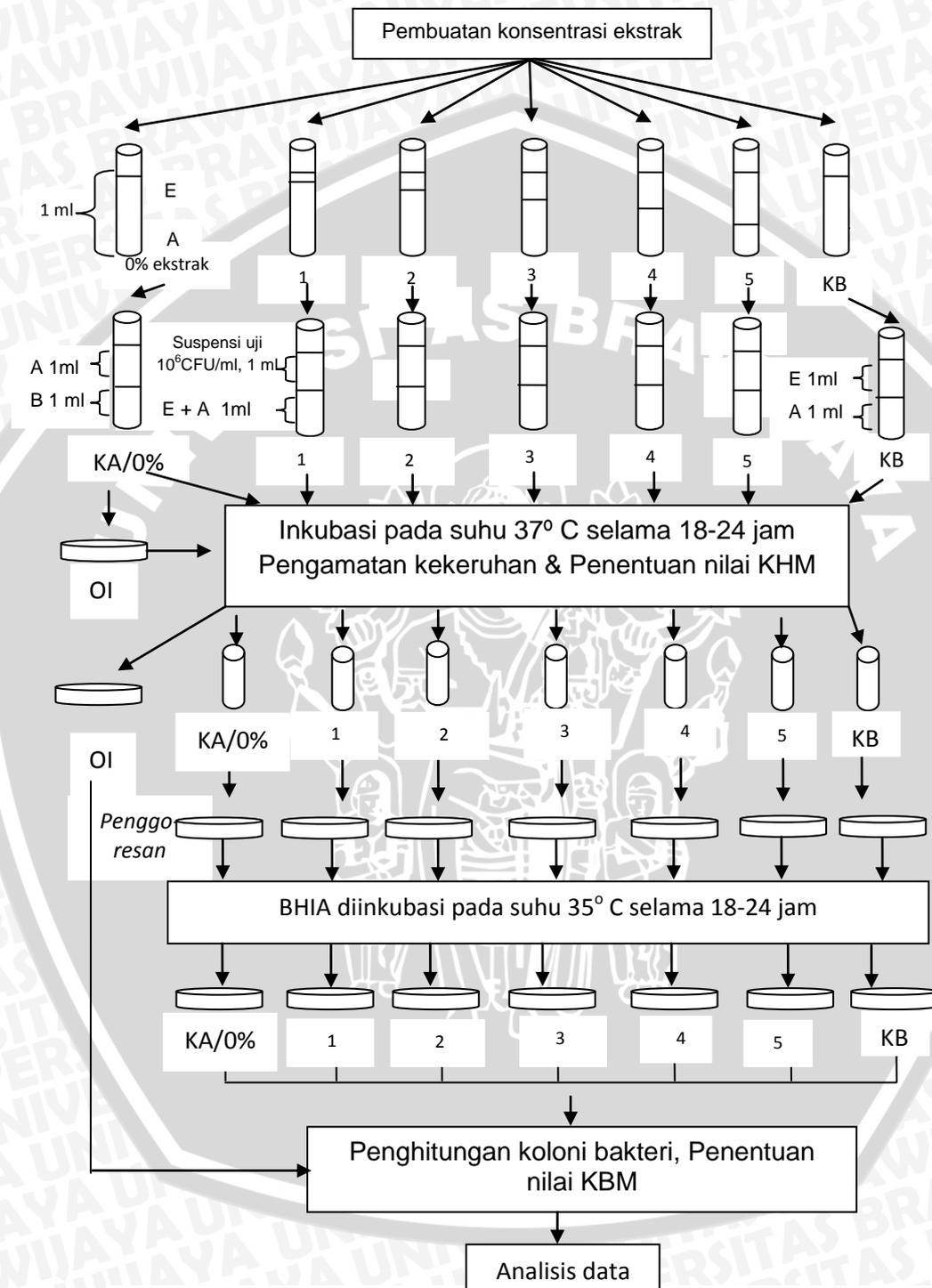
Ambil lapisan atas campuran etanol 96% dan
lanjutkan proses evaporasi

Hasil ekstraksi dimasukkan dalam labu penampung
sedangkan *rotary evaporator*, alat pompa sirkulasi
air dingin dan alat pompa vakum dinyalakan.

Hasil penyaringan diuapkan
menggunakan *vaccum evaporator* pada
suhu 80° C selama 2 jam

Didapatkan ekstrak dengan
konsentrasi 100%

c. Alur Eksperimen



Keterangan:

CFU: Colony Forming Unit

KA: Kontrol *S.pyogenes*

% : % volume per volume

A: Aquades steril

B: Bakteri uji

E: Ekstrak

Gambar 4.1 Kerangka Alur Penelitian

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 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. Uji statistik *one way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$) digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun cengkeh terhadap jumlah koloni *S.pyogenes*. Sedangkan uji korelasi-regresi digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol daun cengkeh terhadap pertumbuhan koloni *S.pyogenes*. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 16.0.