

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen (Nazir, 2003: 63), dimana terdapat adanya perlakuan untuk memanipulasi objek penelitian dan diperlukan kontrol sebagai pembanding.

B. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain rancangan acak lengkap. Desain ini dijadikan pilihan dalam penelitian ini karena penelitian dilakukan dalam skala laboratorium jadi kondisi lingkungan dianggap homogen. Selain itu, bertujuan untuk mengetahui kemungkinan adanya hubungan sebab akibat antar variabel dalam penelitian. Terdapat enam perlakuan yang diberikan pada *P. aeruginosa* dalam pengujian antibakteri dengan menggunakan metode difusi agar yakni konsentrasi ekstrak 0,0 mg/mL (kontrol negatif), 12,5 mg/mL, 25 mg/mL, 37,5 mg/mL, 50 mg/mL, dan *tetracycline* 30 mg/mL (kontrol positif). Variabel bebas dari penelitian ini yaitu konsentrasi ekstrak, sedangkan variabel terikatnya yaitu diameter zona hambat. Banyaknya pengulangan atau replikasi didapat dengan menggunakan pengulangan yang diperoleh dari Gomez (1995).

$$T(r-1) \geq 20$$

$$6(r-1) \geq 20$$

$$6r-6 \geq 20$$

$$r \geq \frac{26}{6}$$

$$r \geq 4,33$$

keterangan :

T = Jumlah perlakuan

r = Jumlah replikasi

Berdasarkan perhitungan di atas, maka jumlah pengulangan yang dilakukan digenapkan menjadi 4 pengulangan.

Konsentrasi yang digunakan untuk pengujian MIC antara ekstrak daun dan kulit buah manggis berbeda. Konsentrasi ekstrak daun yang digunakan yaitu 50 mg/mL, 100 mg/mL, 200 mg/mL, dan 300 mg/mL. Untuk kulit buah konsentrasi ekstrak yang digunakan yaitu 400 mg/mL, 500 mg/mL, 600 mg/mL, dan 700 mg/mL. Pada pengujian MIC tidak dilakukan pengulangan. Penentuan konsentrasi ekstrak yang digunakan pada metode difusi agar dan pengujian nilai MIC berdasarkan uji pendahuluan.

C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah tanaman manggis yang terdapat pada perkebunan manggis di kampung Sakidah, desa Neglasari, Kecamatan Jatiwaras, Sukaraja, Kabupaten Tasikmalaya, Jawa Barat. Sedangkan untuk sampelnya adalah daun dan kulit buah manggis yang digunakan dalam penelitian yang

berasal dari populasi pohon manggis dari perkebunan manggis di kampung Sakidah, desa Neglasari, Kecamatan Jatiwaras, Sukaraja, Kabupaten Tasikmalaya, Jawa Barat.

D. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan April hingga Oktober 2008, di Laboratorium Mikrobiologi dan Fisiologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

E. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan selama penelitian tercantum dalam Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Daftar Alat Penelitian

No	Nama alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Cawan Petri	Normax Diameter 12 cm	50 buah
2.	<i>Becker glass</i>	Pyrex 600 mL; 1000 mL	4 buah
3.	Pinset	Logam	4 buah
4.	Inkubator	Gallenkamp	1
5.	Cakram kertas	Steril, diameter 6 mm	100 buah
6.	Corong	Gelas	1 buah
7.	Transfer box	PT.25.221.03.019 BM	1 buah
8.	Labu Erlenmeyer	pyrex	3 buah
9.	Lemari pendingin	-	1 buah
10.	Tabung reaksi	Pyrex 13 x 150 mm	50 buah
11.	<i>Autoclave</i>	HL36AE	1 buah
12.	<i>Waterbath shaker incubator</i>	EYELA NTS-1300	1 buah
13.	Jarum inokulasi	Logam	2 buah
14.	Kain kasa dan kapas	-	secukupnya
15.	Lampu spirtus	-	1 buah
16.	<i>Rotary Evaporator</i>	EYELA N-N series	1 buah
17.	Plastik anti panas	-	1 bungkus
18.	Kertas pembungkus	-	Secukupnya
19.	Oven	-	1 buah
20.	Kertas saring	-	Secukupnya
21.	Makropipet dan tips	5 mL, 10 mL SIBATA	1 buah
22.	Mikropipet dan tips	100-1000 μ L; 20-200 μ L SOCOREX CALIBRA 822	1 buah
23.	<i>Colony counter</i>	SIBATA	1 buah
24.	<i>Hot Plate</i>	RCH-3	1 buah
25.	<i>Spectrophotometer</i>	MILTON ROY Spectronic 20D	1 buah
26.	<i>Cuvete</i>	Pyrex	2 buah
27.	<i>Vortex mixer</i>	SIBATA TTM-1	1 buah
28.	Camera digital	Olympus	1 buah
29.	Timbangan analitik	HF-300	1 buah
30.	pH meter	UCHIDA KT-1A	1 buah
31.	Gelas arloji	-	2 buah
32.	Blender	National	1 buah
33.	Kertas tisu	-	2 gulung
34.	Spatula	Logam	2 buah
35.	Jangka sorong	Caliper	1 buah

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian tercantum dalam Tabel 3.2.

Tabel 3.2 Daftar Bahan Penelitian

No	Bahan	Jumlah
1.	<i>Nutrient Broth</i> (NB)	400 mL
2.	Kaldu Nutrisi Agar (KNA)	600 mL
3.	De-ion steril	Secukupnya
4.	<i>Ethanol</i> teknis 96 %	3 Liter
5.	Daun dan kulit buah manggis (<i>Garcinia mangostana</i>)	100 g
6.	Biakan murni <i>P. aeruginosa</i>	1 tabung
7.	Akuades	5 Liter
8.	NaCl	Secukupnya
9.	BaCl ₂	Secukupnya
10	H ₂ SO ₄	Secukupnya

F. Langkah-langkah Penelitian

Penelitian ini terbagi menjadi tiga tahapan yaitu, tahap persiapan, tahap pelaksanaan, dan tahap perlakuan.

1. Tahap Persiapan

Tahap persiapan meliputi pengumpulan bahan dan alat yang akan digunakan dalam penelitian. Untuk pengumpulan daun dan kulit buah yang akan digunakan dalam penelitian uji aktivitas antibakteri, sebelumnya dilakukan identifikasi terhadap tanaman dengan menggunakan kunci determinasi *Flora of Java* (Backer *et al.*, 1965: 387). Setelah diketahui bahwa tanaman tersebut sesuai dengan kunci determinasi, lalu dilakukan pemilihan bahan (daun dan kulit buah manggis) yang berada dalam keadaan baik untuk digunakan dalam penelitian.

2. Tahap Pelaksanaan

a. Pembuatan Medium Kultur Bakteri

Pembuatan medium KNA dan NB yang akan digunakan untuk pengkulturan bakteri *P. aeruginosa*. Sebelum disterilisasi medium diukur pHnya dengan pH meter, dan diatur sehingga medium memiliki pH 7. Pengaturan pH medium dapat dilakukan dengan penambahan HCl atau NaOH.

b. Sterilisasi

Cawan Petri, tabung reaksi, Erlenmeyer, Media agar, media *Nutrient Broth*, pinset, batang L, cakram kertas, tips yang akan digunakan untuk penelitian disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C, tekanan 1 atm. Alat gelas dan logam sebelumnya dicuci bersih, dikeringkan dan dibungkus dengan kertas dan plastik anti panas. Untuk alat-alat yang tidak tahan panas disterilisasi dengan cara disemprot dengan *ethanol* 70%.

c. Ekstraksi

Ekstraksi daun dan kulit buah manggis dilakukan dengan menggunakan metode modifikasi menurut Kosem *et al.*, (2007: 284). Daun dan kulit buah dibersihkan dengan air kran yang mengalir, kemudian masing-masing bagian dipotong-potong kecil lalu dikeringkan di tempat

yang teraungi pada suhu ruangan selama 5 hari, kemudian tumbuhan yang kering digerus sehingga menjadi bubuk.

Seratus gram bubuk dimaserasi selama seminggu sebanyak 3 kali dengan menggunakan 500 mL *ethanol* 96 % (modifikasi Voravuthikunchai, 2005: 511). Ekstrak dikumpulkan dan disaring dengan kertas saring. Filtrat dipisahkan melalui penguapan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 65 °C menjadi ekstrak pekat, dimana ekstrak tidak mengandung *ethanol*. Ekstrak disimpan pada suhu 4 °C sampai digunakan berikutnya, untuk mencegah terjadinya perubahan kimiawi.

d. Pembuatan Kurva Tumbuh

Pembuatan kurva tumbuh dilakukan untuk menentukan fase log, dimana pada fase tersebut bakteri diberi perlakuan. Kurva tumbuh dibuat dengan menggunakan metode *turbidity* (Cappucino *et al.*, 1983: 118), yaitu dengan mengukur kekeruhan biakan bakteri dalam medium NB setiap 2 jam mulai dari jam ke-0 hingga jam ke-24.

Sebelum dilakukan penentuan fase log, bakteri diaktivasi terlebih dahulu. Biakan bakteri dalam medium KNA diambil sebanyak 1 ose kemudian diinokulasikan ke dalam 10 mL medium NB dalam Erlenmeyer. Dan diinkubasi pada *waterbath shaker incubator* bersuhu 37 °C selama 24 jam. Setelah diaktivasi, biakan bakteri tersebut dicampurkan ke dalam 90 mL medium NB dalam Erlenmeyer. Lalu dihomogenkan selama 5 menit.

Sebagai blanko digunakan NB. Blanko digunakan untuk mengatur nilai transmitansi pada *spectrophotometer* dengan panjang gelombang 620 nm hingga bernilai 100 %. Setelah nilai transmitannya diatur, lalu biakan bakteri yang tadi telah dihomogenkan dimasukkan ke dalam tabung kuvet untuk diukur nilai absorbansinya. Sisa biakan bakteri dalam Erlenmeyer tetap diinkubasi dan setiap 2 jam sekali diambil sebanyak 5 mL untuk diukur nilai absorbansinya hingga jam ke-24.

Berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh disetiap 2 jam usia pertumbuhan bakteri, maka dapat dibuat sebuah kurva pertumbuhan bakteri yang menunjukkan hubungan usia bakteri dan nilai absorbansinya.

e. Pembuatan Kurva Baku

Kurva baku dibuat untuk mengetahui jumlah sel bakteri berdasarkan nilai absorbansi. Jumlah sel bakteri saat dilakukan pengujian dapat diketahui. Kurva baku dibuat dengan menghitung jumlah bakteri pada fase logaritmik, yaitu pada jam ke-0, 4, dan 6.

Pada awalnya dilakukan aktivasi terhadap bakteri, yaitu dengan cara mengambil satu ose biakan bakteri dan diinokulasikan ke dalam 10 mL medium NB, lalu diinkubasi pada *waterbath incubator shaker* dengan suhu 37 °C selama 24 jam. Setelah dilakukan aktivasi selama 24 jam, kemudian biakan bakteri tersebut dicampurkan dengan 90 mL NB. Kemudian pada usia bakteri yang berada pada fase logaritmik dilakukan pengukuran nilai absorbansi dengan *spectrophotometer* dengan panjang gelombang 620 nm

yang sebelumnya telah diatur dengan larutan blanko. Kemudian dilakukan pengenceran bakteri ke dalam aquades steril mulai dari pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-8} . Untuk pengenceran 10^{-1} , diambil 1 mL biakan bakteri kemudian dimasukkan ke dalam 9 mL aquades steril dan dihomogenkan dengan *vortex*. Untuk pengenceran 10^{-2} , diambil 1 mL biakan bakteri dalam tabung pengenceran 10^{-1} , kemudian ditambahkan ke dalam 9 mL aquades steril, begitu seterusnya hingga pengenceran 10^{-8} .

Setelah dilakukan pengenceran terhadap biakan bakteri, pada pengenceran 10^{-6} hingga 10^{-8} diambil 1 mL biakan bakteri dan dicampurkan dengan 9 mL medium KNA cair dalam cawan Petri dan dihomogenkan, dilakukan dua replikasi untuk tiap konsentrasi pengenceran. Medium yang berisi bakteri tersebut kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Setelah diinkubasi dilakukan penghitungan jumlah bakteri dengan *colony counter*. Perkiraan jumlah koloni bakteri dilakukan dengan cara pengalihan jumlah koloni yang terhitung dengan besarnya pengenceran. Berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh di setiap 2 jam usia pertumbuhan bakteri dalam fase log dan jumlah bakteri yang terhitung, maka dapat dibuat sebuah kurva baku bakteri yang menunjukkan hubungan nilai absorbansi dan jumlah bakteri.

3. Tahap Perlakuan

a. Pengujian Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi Agar

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metoda difusi agar dengan teknik *Spread plate* secara aseptik. Medium KNA yang telah dicairkan dimasukkan ke dalam cawan Petri sebanyak 10 mL. Kemudian setelah beku ditambahkan 200 μ L inokulum berusia 4 jam dengan konsentrasi 10^9 cfu/mL. Inokulum diratakan di atas agar dengan menggunakan batang L. Kemudian cakram kertas yang akan digunakan direndam masing-masing kedalam ekstrak berbagai konsentrasi yang akan diujikan selama 2 menit. Cakram diambil dengan pinset dan dibiarkan beberapa saat agar tidak terlalu basah, kemudian cakram tersebut diletakkan di atas medium yang telah berisi bakteri. Satu cawan Petri terdiri dari 3 buah cakram kertas untuk konsentrasi ekstrak yang berbeda, dan 2 cakram masing-masing untuk konsentrasi kontrol positif dan negatif, hal ini dilakukan untuk menghindari terjadinya *overlap* (tumpang tindih) zona hambat. Selanjutnya medium tersebut diinkubasikan dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 24 jam. Setelah itu, dilihat dan diukur zona penghambatan yang dihasilkan berdasarkan diameter area bening di sekitar cakram kertas dengan menggunakan jangka sorong. Hasil percobaan ditentukan berdasarkan zona hambat yang dihasilkan dengan cara mengukur diameter area bening di sekitar kertas cakram dalam satuan milimeter (mm). Penentuan keefektifan ekstrak disesuaikan dengan kriteria zona hambat menurut Moriera *et al.*, (2005: 566).

b. Pengujian Nilai MIC

Untuk penentuan nilai MIC, tidak dilakukan proses aktivasi karena digunakan metode *0,5 McFarland standard* (Ferraro *et al.*, 2003 : 9). Biakan bakteri yang dipakai adalah biakan yang sebelumnya dibandingkan dengan larutan *0,5 McFarland standard* yang setara dengan 10^{6-8} cfu/mL (Rondón *et al.*, 2006: 34). Larutan *0,5 McFarland standard* dibuat dengan komposisi 0,5 mL BaCl₂ dan 99,5 mL H₂SO₄ 1 %. Kekeruhan larutan diatur hingga bernilai antara 0,08 hingga 0,10 pada *spectrophotometer* dengan panjang gelombang 620 nm.

Biakan bakteri dari KNA diambil kira-kira 1 ose lalu dihomogenkan ke dalam larutan ringers NaCl (0,9 g NaCl dalam 100 mL Akuades steril). Kemudian biakan dalam larutan tersebut dibandingkan dengan larutan *0,5 McFarland standard* sampai kekeruhannya sama.

Untuk proses MIC, dimasukkan 100 µL ekstrak kedalam 4 mL NB. Lalu dihomogenkan, kemudian setelah homogen dimasukkan 900 µL biakan bakteri yang telah memiliki kekeruhan sama dengan *0,5 McFarland standard*. Lalu biakan tersebut diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

Penentuan nilai MIC ditentukan dengan cara membandingkan biakan bakteri dan ekstrak yang telah diinkubasi selama 24 jam dengan biakan bakteri dan ekstrak berusia 0 jam secara kasat mata. Sebelum dibandingkan secara kasat mata, kultur berusia 24 jam dan 0 jam dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* terlebih dahulu. Nilai MIC

dari pengujiannya yaitu nilai konsentrasi terendah saat kekeruhan kultur berusia 24 jam sama dengan kultur berusia 0 jam.

G. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan program SPSS versi 12.0 *for windows*. Analisis data awal yang dilakukan yaitu uji Homogenitas dan uji Normalitas dengan menggunakan uji *Kolmogorov Smirnov*, kemudian dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis* untuk mengetahui apakah H_0 ditolak atau diterima. Uji Regresi untuk mengetahui pengaruh konsentrasi ekstrak terhadap diameter zona hambat bakteri. Untuk mengetahui ekstrak mana yang signifikan dalam menghambat pertumbuhan bakteri dilakukan uji *Mann Whitney*.