

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian terapan dengan menggunakan metode eksperimen karena terdapat perlakuan untuk memanipulasi objek penelitian dan diperlukan kontrol sebagai pembanding (Nazir, 1983).

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2009 – Juni 2011, di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

C. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL) karena dilakukan dalam skala laboratorium dan kondisi lingkungan dianggap homogen. Penelitian pendahuluan pada difusi agar menggunakan konsentrasi ekstrak 6.25 mg/ml, 12.5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml dan 100 mg/ml (Alhaj *et al.*, 2008). Berdasarkan uji pendahuluan, konsentrasi *N.sativa* yang akan digunakan untuk difusi agar adalah 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml dan 25 mg/ml. Sebagai kontrol positif digunakan antibiotik *tetracycline* 3 mg/ml (Salman *et al.*, 2002) dan kontrol negatif DMSO 10%. Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu konsentrasi ekstrak biji *N.sativa*, sedangkan variabel terikatnya yaitu diameter zona hambat

ekstrak terhadap pertumbuhan kedua bakteri. Pengulangan yang dilakukan sebanyak empat kali.

Pada pengujian ekstrak *N.sativa* untuk menentukan nilai MIC digunakan metode *broth macrodilution*. Konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam pengujian terhadap bakteri *P.aeruginosa* yaitu 12 mg/ml, 14 mg/ml, 16 mg/ml, 18 mg/ml, 20 mg/ml, 3 mg/ml *tetracycline* (kontrol positif) dan 10% DMSO (kontrol negatif). Sedangkan pada pengujian terhadap bakteri *S.aureus* digunakan konsentrasi ekstrak 10 mg/ml, 12 mg/ml, 14 mg/ml, 16 mg/ml, 18 mg/ml, 3 mg/ml *tetracycline* (kontrol positif) dan 10% DMSO (kontrol negatif).

D. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu seluruh biji tanaman *N.sativa*, dan sampelnya berupa biji *N.sativa* yang diuji aktivitas antimikrobanya di laboratorium.

E. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini seperti tercantum pada Tabel 3.1, sedangkan bahan-bahan yang digunakan terdapat pada Tabel 3.2 di bawah ini:

Tabel 3.1 Daftar Alat Penelitian

No	Nama Alat	Spesifikasi	Jumlah
1	Rotary evaporator	EYELA N-N series	1 buah
2	Cawan petri	-	80 buah
3	Blender	National	1 buah
4	Tabung reaksi	Pyrex	80 buah
5	Rak tabung	Kayu	5 buah

6	Becker glass	100 ml, 250 ml	4 buah
7	Erlenmeyer	250 ml, 500 ml	3 buah
8	Spatula	-	2 buah
9	Pinset	-	5 buah
10	Jangka sorong	Caliper	1 buah
11	Autoclave	HL36AE	1 buah
12	Lemari es	Sanyo	1 buah
13	Kertas cakram	Steril	100 lembar
14	Corong	-	1 buah
15	Waterbath shaker	EYELA NTS-1300	1 buah
16	Jarum inokulasi	-	2 buah
17	Kain kasa	Pembalut luka	Secukupnya
18	Lampu spirtus	-	3 buah
19	Plastik tahan panas	-	1 bungkus
20	Hot plate	RCH-3	1 buah
21	Kertas pembungkus	-	Secukupnya
22	Kapas	-	Secukupnya
23	Kertas saring	Whatman	Secukupnya
24	Makropipet	1 ml	1 buah
25	Tips	1 ml	1 box
26	Colony counter	SIBATA	1 buah
27	Spectrophotometer	-	1 buah
28	Tabung kuvet	Pyrex	3 buah
29	Korek api	-	2 buah
30	Timbangan analitik	HF-300	1 buah
31	pH-meter	Merck	Secukupnya
32	Kertas label	-	Secukupnya
33	Aluminium foil	-	1 rol
34	Kaca arloji	Berbahan gelas	5 buah
35	Ose	-	2 buah

Tabel 3.2 Daftar Bahan Penelitian

No	Nama Bahan	Spesifikasi	Jumlah
1.	<i>Nigella sativa</i>	Biji	500 gram
2.	Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	1 tabung
3.	Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25922	1 tabung

4.	Kaldu Nutrisi Agar	Steril	Secukupnya
5.	Nutrient Broth	Steril	Secukupnya
6.	Etanol 96%	-	3 liter
7.	<i>Tetracycline</i>	Generik 250 mg	3 mg/ml
8.	DMSO 10%	-	80 ml

F. Langkah Kerja

Pada penelitian ini terdapat tiga tahap prosedur kerja, yaitu tahap persiapan, tahap pelaksanaan dan tahap pengujian.

1. Tahap Persiapan

a. Persiapan

Persiapan diawali dengan pengumpulan alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian. Biji *N.sativa* dikumpulkan dan dibersihkan. Selanjutnya kultur murni bakteri *P.aeruginosa* dan *S.aureus* yang berasal dari Laboratorium BioFarma Bandung disiapkan.

b. Pembuatan Medium Kultur Bakteri

Medium yang digunakan untuk pengkulturan bakteri *P.aeruginosa* dan *S.aureus* yaitu kaldu nutrisi agar dan kaldu nutrisi. Kedua medium diukur pH nya dengan menggunakan pH meter sehingga memiliki pH 7.

c. Sterilisasi Alat

Cawan Petri, erlenmeyer, tabung reaksi, pinset dan seluruh alat dan bahan (kecuali ekstrak biji jintan hitam) yang akan digunakan dalam penelitian dicuci hingga bersih, dikeringkan dan dibungkus dengan plastik tahan panas. Kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 20 menit pada tekanan 1 atm dan suhu 121°C. Alat-alat yang tidak tahan panas maka disterilisasi menggunakan alkohol 70%.

d. Pembuatan Ekstrak *N.sativa*

Ekstraksi biji *N.sativa* dilakukan dengan modifikasi metode Hannan, *et al.*, (2008). Sebanyak 250 gram biji dibersihkan dengan air mengalir dan dikeringkan dalam suhu ruang selama 1-3 hari. Biji yang telah kering tersebut digiling dengan menggunakan blender sampai halus hingga menjadi serbuk seperti tampak pada Gambar 3.1. Kemudian direndam di dalam etanol 96% dengan perbandingan antara pelarut : sampel = 1:3 selama 3 jam pada suhu ruang. Ekstrak kemudian disaring, dan residunya kembali direndam dalam etanol dengan perbandingan yang sama. Hasil filtrasi dimasukkan kedalam *rotary evaporator* untuk menguapkan etanolnya, maka diperoleh ekstrak etanol pekat. Selanjutnya ekstrak disimpan pada suhu dingin sampai digunakan kembali. Konsentrasi ekstrak dibuat dengan mengencerkannya dalam dimethyl sulfoxide (DMSO) 10% kemudian divortex supaya homogen.



Gambar 3.1 Serbuk Biji *N.sativa*
(Sumber: Koleksi Pribadi)

2. Tahap Pelaksanaan

a. Pembuatan Kurva Tumbuh *P.aeruginosa* dan *S.aureus*

Sebelum dilakukan pengukuran kekeruhan dengan spektrofotometer, mula-mula bakteri diaktivasi dulu dengan cara menginokulasi satu ose isolat bakteri ke dalam 10 ml medium NB, kemudian diinkubasi dalam *waterbath shaker* selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah 24 jam, kultur dipindahkan ke dalam 90 ml medium cair yang baru (total 100 ml). Ini merupakan biakan bakteri usia 0 jam. Kemudian sebanyak 5 ml biakan bakteri ini dimasukkan ke dalam kuvet untuk diukur absorbansinya dengan panjang gelombang (λ) 620 nm dan medium NB sebagai blanko. Sisa biakan bakteri di dalam Erlenmeyer diinkubasi lagi, dan setiap 2 jam diambil 5 ml untuk diukur absorbansinya hingga jam ke-12. Dari hasil pengukuran ini dibuat kurva dengan menggunakan program *Microsoft Excel* sehingga diketahui fase-fase pertumbuhan bakteri. Kurva tumbuh ini menunjukkan korelasi antara nilai absorbansi sebagai sumbu Y dengan selang waktu tertentu sebagai sumbu X yang menunjukkan umur biakan bakteri, sehingga dapat diketahui usia bakteri yang berada pada fase log.

b. Pembuatan Kurva Baku *P.aeruginosa* dan *S.aureus*

Kurva baku bakteri dibuat dengan menghitung koloni bakteri yang dikorelasikan dengan nilai absorbansi. Pertama-tama satu ose bakteri uji diinokulasi ke dalam 10 ml medium NB dan diaktivasi selama 24 jam dalam *waterbath shaker* pada suhu 37°C. Setelah itu kultur dipindahkan ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi 90 ml medium NB dan diaktivasi kembali hingga bakteri

mencapai fase logaritmik. Kemudian sebanyak 5 ml inokulum bakteri yang berada pada fase log tersebut diambil dan dihitung nilai absorbansinya dengan *spectrophotometer*, dan disiapkan tabung reaksi yang berisi sembilan ml aquades steril untuk dilakukan pengenceran mulai dari 10^1 sampai 10^8 . Untuk pengenceran 10^1 , sebanyak 1 ml biakan bakteri dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades steril. Pengenceran 10^2 diambil 1 ml dari tabung 10^1 dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml aquades. Begitu seterusnya hingga pengenceran 10^8 . Setelah dilakukan pengenceran, tabung berlabel 10^{-6} sampai 10^{-8} masing-masing diambil 1 ml biakan bakteri dan dihomogenkan dengan 9 ml medium KNA dalam cawan Petri kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Setelah diinkubasi dihitung jumlah koloni yang tumbuh dengan menggunakan *colony counter*. Hasil penghitungan jumlah bakteri dihubungkan dengan nilai absorbansi dan diperoleh sebuah kurva baku dengan menggunakan program SPSS 16 *for Windows* sehingga dapat diketahui usia bakteri yang terbaik untuk digunakan dalam pengujian (Cappuccino&Sherman, 1987).

3. Tahap Pengujian

a. Pengujian Ekstrak *N.sativa* Terhadap *P.aeruginosa* dan *S.aureus* Dengan Metode Difusi Agar

Pengujian antibakteri ekstrak *N.sativa* terhadap *P.aeruginosa* dan *S.aureus* dilakukan dengan metode difusi agar (Karuppusamy *et al.*, 2009). Inokulum bakteri yang digunakan berusia 4 jam pada *P.aeruginosa* dan 6 jam pada *S.aureus*. Penggunaan bakteri pada usia ini dikarenakan laju pertumbuhannya paling tinggi berdasarkan kurva baku. Sebanyak 1 ml inokulum bakteri dipipet kedalam cawan

Petri kemudian medium KNA sebanyak 9 ml dicairkan dan dituangkan kedalam cawan. Segera setelah penuangan, cawan Petri digerakkan di atas meja yaitu dengan gerakan membentuk angka delapan untuk menyebarkan sel-sel bakteri secara merata. Biarkan selama lima menit hingga permukaan agar kering sebelum meletakkan cakram. Kertas cakram direndam di dalam ekstrak yang berkonsentrasi 10 mg/ml; 15 mg/ml; 20 mg/ml dan 25 mg/ml. Sebagai kontrol positif digunakan *tetracycline* 3 mg/ml dan kontrol negatif DMSO 10%. Lama perendaman \pm 2 menit kemudian diletakan di permukaan agar secara aseptik. Cakram ditekan dengan lembut agar dapat kontak lebih baik dengan agar. Dalam satu cawan Petri terdapat tiga konsentrasi yang berbeda. Penggunaan antibiotik *tetracycline* karena memiliki spektrum aktivitas antimikroba yang luas. Antibiotik ini dapat menghambat dan membunuh bakteri baik dari golongan Gram-positif maupun Gram-negatif (Todar, 2008). Cawan Petri kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Aktivitas antibakteri ditentukan dengan mengukur diameter zona penghambatan sekitar pertumbuhan bakteri menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter \pm SD (Parekh&Chanda, 2006).

b. Pengujian Ekstrak *N.sativa* Terhadap *P.aeruginosa* dan *S.aureus* dengan MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)

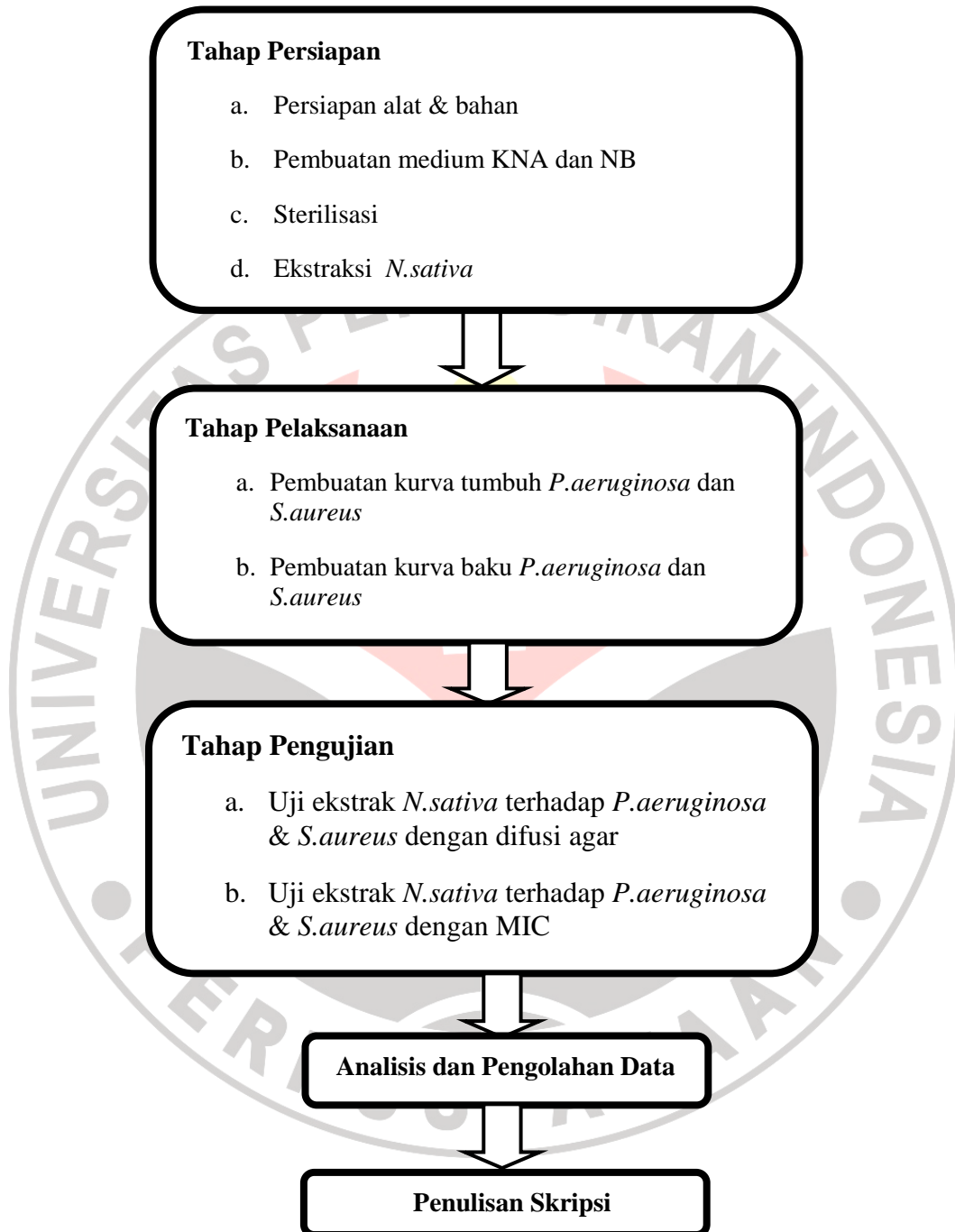
Penelitian dilanjutkan dengan menguji konsentrasi ekstrak untuk menentukan nilai MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*). Uji MIC dilakukan dengan metode *broth macrodilution* (Halawani, 2009). Konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam pengujian terhadap *P.aeruginosa* adalah 12 mg/ml; 14 mg/ml; 16 mg/ml; 18 mg/ml dan 20 mg/ml. Sedangkan untuk *S.aureus* konsentrasi

ekstraknya 10 mg/ml; 12 mg/ml; 14 mg/ml; 16 mg/ml dan 18 mg/ml. Kontrol positif *tetracycline* 3 mg/ml dan kontrol negatif DMSO 10% pada masing-masing bakteri. Pada pengujian dengan metode MIC, biakan bakteri diencerkan terlebih dulu ke dalam larutan ringer NaCl 0.85% (0.85 gram NaCl dalam 100 ml aquades steril), kemudian disamakan kekeruhannya dengan larutan standar 0.5 *Mc.Farland*. Larutan 0.5 *Mc.Farland* dibuat dengan mencampurkan 0.5 ml BaCl₂ 1% dan 99.5 ml H₂SO₄ 1%, dengan nilai absorbansi berkisar 0.08-0.1 pada panjang gelombang 620 nm. Setiap tabung reaksi berisi empat ml medium NB, kemudian 100 µl ekstrak ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dicampurkan hingga merata. Kemudian 900 µl inokulum bakteri yang telah disesuaikan dengan 0.5 *Mc.Farland* dimasukkan ke dalam tabung tersebut. Hal yang sama dilakukan juga untuk kontrol positif dan negatif. Semua tabung lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Nilai MIC ditetapkan sebagai konsentrasi terendah dari ekstrak, yang diperlihatkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri di dalam tabung setelah inkubasi.

G. Analisis Data

Semua data yang telah diperoleh dengan lengkap dari hasil pengukuran diameter zona hambat diolah menggunakan SPSS 16.0 *for Windows*. Terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan homogenitas pada masing-masing perlakuan. Selanjutnya digunakan uji *Kruskal-Wallis* dan *Mann-Whitney* untuk mengetahui perbandingan aktivitas ekstrak terhadap kedua bakteri.

H. Alur Penelitian



Gambar 3.2 Diagram Alur Penelitian