

BAB III

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental yaitu penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 2005).

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), karena percobaan dilakukan di laboratorium dengan kondisi yang homogen. Penelitian dilakukan dengan melihat aktivitas antibakteri dari ekstrak metanol daun *A. muricata* terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus*.

Sebelum melakukan uji aktivitas antibakteri, terlebih dahulu dibuat kurva tumbuh bakteri *S. aureus* untuk mengetahui waktu bakteri memiliki laju pertumbuhan tertinggi (fase logaritmik). Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode *disc-diffusion*. Parameter pada uji ini adalah inhibisi pertumbuhan bakteri dengan mengukur diameter daerah bening (zona hambat) di sekitar cakram (Cappuccino and Sherman, 2005). Konsentrasi ekstrak metanol daun *A. muricata* yang digunakan sebagai uji pendahuluan adalah 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, dan 25 mg/ml. Berdasarkan data tersebut, konsentrasi yang digunakan untuk *disc-diffusion* adalah 15 mg/ml, 30 mg/ml, 45 mg/ml, 60 mg/ml, dan 75 mg/ml. Kontrol positif menggunakan antibiotik *tetracycline* 30 µg/ml (Uwaezuoke and Aririatu, 2004) dan kontrol negatif DMSO 1% (Patel *et al.*,

2009). Adapun banyaknya pengulangan dalam penelitian didasari oleh rumus Gomez (1995), yaitu $(t)(r-1) \geq 20$, dimana (t) adalah banyaknya perlakuan dan (r) adalah banyaknya pengulangan yang dapat digunakan dalam penelitian eksperimental.

Berdasarkan rumus di atas, jika banyaknya perlakuan $(t)=7$, maka banyaknya pengulangan adalah

$$7(r-1) \geq 20$$

$$7r-7 \geq 20$$

$$7r \geq 27$$

$$r \geq \frac{27}{7}$$

$$r \geq 3,85 \text{ atau } r \approx 4$$

Dari perhitungan di atas maka penelitian dapat dilakukan dengan pengulangan sebanyak lebih dari 3,85 atau dibulatkan menjadi empat kali.

Parameter lain yang terdapat dalam penelitian ini yaitu nilai MIC (*Minimum inhibitory concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) dari ekstrak daun *A. muricata*.

B. Sampel Penelitian

Adapun sampel dalam penelitian ini adalah daun *A. muricata* pada pohon yang tumbuh di sekitar Jalan Baladewa, Bandung Barat. Daun yang digunakan merupakan daun dengan umur fisiologis pada urutan keempat atau kelima dari pucuk.

C. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret 2011 sampai Juni 2011 yang dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudi No. 229 Bandung.

D. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini tercantum pada Tabel 3.1 dan 3.2.

Tabel 3.1 Daftar Alat Penelitian

No.	Alat Laboratorium	Spesifikasi	Jumlah
1.	<i>Autoclave</i>	Hirayama HL 36 AE	1 buah
2.	<i>Spectrophotometer</i>	Milton Roy Spectronic 20D	1 buah
3.	<i>Waterbath Incubator Shaker</i>	EYELA NTT-1100	1 buah
4.	Incubator	Gallenkamp	1 buah
5.	Blender	National	1 buah
6.	<i>Colony counter</i>	SIBATA CL560	1 buah
7.	<i>Hotplate with Magnetic Stirrer</i>	EYELA RCH-3	1 buah
8.	<i>Vortex</i>	EYELA TTM-1	1 buah
9.	<i>Laminar air flow</i>	-	1 buah
10.	Lemari pendingin	Sanyo	1 buah
11.	Sentifuge	Hettich	1 buah
12.	Makropipet (1, 5 & 10 ml)	SIBATA	1 buah
13.	Mikropipet (200 μ l)	SIBATA	1 buah
14.	Timbangan analitik	AND HF-300	1 buah
15.	Cawan Petri	Normax	3 buah
16.	Cawan Petri	Normax	40 buah
17.	Tabung reaksi	Iwaki Pyrex	50 buah
18.	Labu Erlenmeyer (100 & 250 ml)	Schott Duran	2 buah
19.	<i>Beaker glass</i> (250, 500 & 1000 ml)	Iwaki Pyrex	1 buah
20.	Gelas ukur (10, 50 & 100 ml)	Iwaki Pyrex	1 buah

21.	Corong	-	1 buah
22.	Kaca arloji	-	4 buah
23.	Batang pengaduk	-	1 buah
24.	Tabung <i>cuvette</i>	-	3 buah
25.	Tongkat L	-	2 buah
26.	Jarum ose	-	2 buah
27.	Rak tabung	-	2 buah
28.	Pinset	-	2 buah
29.	Tips (200µl & 1 ml)	-	50 buah
30.	Tips (5 & 10 ml)	-	1 buah
31.	Botol kaca gelap	-	20 buah
32.	Botol kaca	-	2 buah
33.	Kertas cakram	Whatman No.1 (φ 6mm)	50 buah
34.	Tabung Eppendorf	-	4 buah

Tabel 3.2 Daftar Bahan Penelitian

No.	Nama Bahan	Spesifikasi	Jumlah
1.	Daun sirsak (<i>Annona muricata</i>)	-	-
2.	Biakan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	-
3.	Akuades	-	5 liter
4.	Metanol	Merck (P.A)	500 ml
5.	DMSO 1%	Merck (P.A)	1 ml
6.	<i>Tetracycline</i>	Kimia Farma	1 strip
7.	Spirtus	-	Secukupnya
8.	NaCl	Chemical	13.279 gram
9.	BaCl ₂	Chemical	0.005 gram
10.	H ₂ SO ₄	Merck (P.A)	1.5 ml
11.	Alkohol 70%	-	Secukupnya
12.	<i>Beef extract</i>	Difco	6.436 gram
13.	Pepton	Conda	24.455 gram
14.	<i>Nutrient Agar</i>	Conda	23 gram
15.	<i>Agar bacteriological</i>	Conda	12.652 gram

E. Langkah Kerja

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

1. Tahap Persiapan

Pada tahap ini dilakukan pengumpulan alat dan bahan seperti yang tertera pada Tabel 3.1 dan 3.2. Tumbuhan *Annona muricata* sebelumnya diidentifikasi menggunakan kunci determinasi *Flora of Java* (Backer and Bakhuizen, 1963).

2. Tahap Pelaksanaan

a. Pembuatan Medium Kultur Bakteri

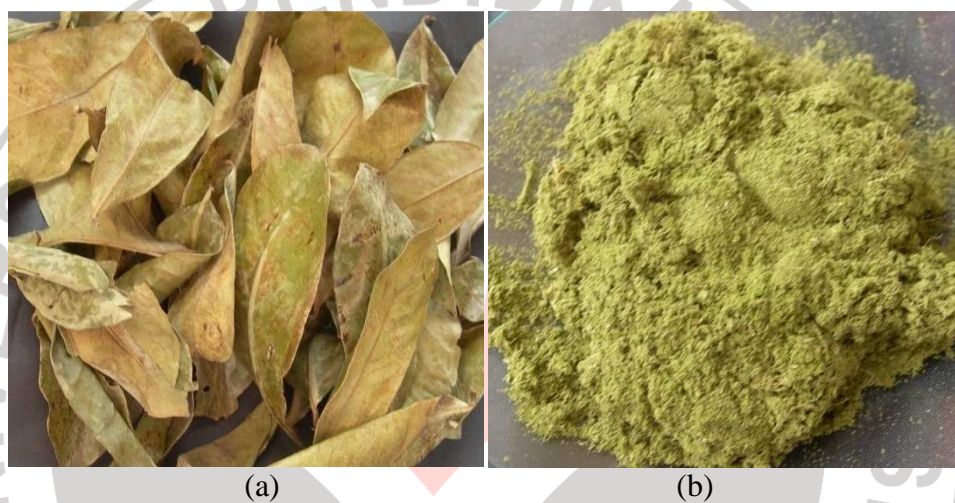
Medium yang digunakan untuk mengkultur bakteri *Staphylococcus aureus* adalah Nutrient Agar (NA) dan Nutrient Broth (NB). Medium NA dibuat dengan melarutkan 3 gram *beef extract*, 10 gram pepton, 5 gram Natrium Klorida (NaCl), dan 15 gram *agar bacteriological* dalam 1000 ml akuades. Medium NB dibuat dengan melarutkan 3 gram *beef extract*, 10 gram pepton, dan 5 gram NaCl dalam 1000 ml akuades. Masing-masing medium bakteri tersebut dipanaskan selama 20 menit.

b. Sterilisasi

Alat, bahan dan medium yang tahan panas disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 15 menit dengan suhu sebesar 121°C. Untuk alat-alat yang tidak tahan panas disterilisasi menggunakan alkohol 70%.

c. Ekstraksi

Daun *Annona muricata* yang diekstraksi merupakan daun yang dipanen dari Jalan Baladewa, Bandung Barat. Daun segar dikering-anginkan selama dua minggu lalu ditimbang. Selanjutnya dihaluskan menggunakan blender hingga berbentuk bubuk. Daun *A. muricata* yang sudah dikering-anginkan dan dibubukkan dapat dilihat pada gambar 3.1.



Gambar 3.1 : (a). Daun *Annona muricata* yang Sudah Dikering-anginkan, (b). Bubuk Daun *Annona muricata*. (Sumber : dokumentasi pribadi)

Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi, seperti yang ditulis oleh Patel *et al.* (2009). Sebanyak 40 gram bubuk daun ditambahkan ke dalam 400 ml pelarut metanol *pro analyst* lalu dimaserasi selama 24 jam. Ekstrak lalu disaring menggunakan kertas saring Whatman No.1. Pelarut dikentalkan hingga mendekati kering dengan suhu 40 °C. Ekstrak kemudian diencerkan hingga berbagai konsentrasi dengan dimethylsulfoxide (DMSO) *pro analyst* 1%. Selanjutnya ekstrak disimpan dalam botol gelap yang ditutup kertas alumunium pada suhu 4°C untuk mencegah terjadinya perubahan kimiawi.

d. Pembuatan Kurva Tumbuh Bakteri *Staphylococcus aureus*

Bakteri uji diaktivasi terlebih dahulu dengan menginokulasikan satu ose bakteri dari biakan murni ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi 10 ml medium NB (*Nutrient Broth*) lalu diinkubasikan secara aerob pada *waterbath shaker incubator* bersuhu 37°C dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Suspensi kemudian dicampurkan ke dalam 90 ml medium NB pada labu Erlenmeyer baru dan dihomogenkan selama 5 menit. Untuk menentukan nilai kekeruhan digunakan alat *spectrophotometer* dengan panjang gelombang (λ) 625 nm. Disiapkan 5 ml medium NB tanpa bakteri uji sebagai blanko dan dimasukkan ke dalam tabung *cuvette* untuk dilakukan pengaturan besarnya nilai transmittan hingga 100%. Untuk pengujian sampel, 5 ml kultur bakteri dalam labu Erlenmeyer dimasukkan ke dalam tabung *cuvette* dan nilai absorbansinya diukur. Sisa bakteri uji dalam labu Erlenmeyer diukur kekeruhannya setiap 2 jam sekali seperti langkah sebelumnya. Pengukuran dilakukan hingga bakteri berusia 24 jam (Cappuccino dan Sherman, 2005).

e. Pembuatan Kurva Baku Bakteri *Staphylococcus aureus*

Satu ose bakteri uji dari biakan murni diinokulasikan pada labu Erlenmeyer yang berisi 10 ml medium NB. Labu tersebut diinkubasikan secara aerob pada *waterbath shaker incubator* bersuhu 37°C dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Suspensi lalu dicampurkan ke dalam 90 ml medium NB pada labu Erlenmeyer baru dan diaktivasi kembali hingga

bakteri berusia pada fase logaritmik (jam ke-2 hingga 8). Ketika telah mencapai fase logaritmik, dilakukan pengenceran suspensi bakteri uji mulai dari 10^{-1} hingga 10^{-8} . Pengenceran 10^{-1} dibuat dengan cara mengambil 1 ml suspensi bakteri uji yang telah diaktivasi dan dimasukkan pada tabung reaksi yang berisi 9 ml larutan akuades steril, lalu dihomogenkan dengan *vortex*. Untuk pengenceran 10^{-2} , diambil 1 ml suspensi bakteri pada tabung pengenceran 10^{-1} tadi dan dicampurkan dengan 9 ml akuades steril pada tabung lain, begitupun pada pengenceran 10^{-3} sampai 10^{-8} . Setelah pengenceran bakteri, pada pengenceran bakteri 10^{-6} sampai 10^{-8} diambil 1 ml suspensi bakteri dan dicampurkan dengan 9 ml medium NA cair kemudian dihomogenkan pada cawan Petri. Kultur diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Koloni bakteri yang tumbuh pada medium dihitung dengan *colony counter*. Perkiraan banyaknya jumlah bakteri yang tumbuh dapat dihitung dengan mengalikan jumlah koloni yang terhitung dengan besarnya pengenceran. Hasil jumlah bakteri tersebut dihubungkan dengan nilai absorbansi yang telah diukur sebelumnya hingga dapat dibuat sebuah kurva baku (Cappuccino dan Sherman, 2005).

f. Pengenceran Ekstrak Daun *Annona muricata*

Untuk semua uji aktivitas antibakteri, ekstrak metanol daun *A. muricata* diencerkan menggunakan dimethylsulfoxide (DMSO) *pro analyst* 1% (Patel *et al.*, 2009). Ekstrak daun *A. muricata* diencerkan

menjadi berbagai konsentrasi mulai dari 15 mg/ml, 30 mg/ml, 45 mg/ml, 60 mg/ml hingga 75 mg/ml.

g. Penyediaan Inokulum

Tahap ini dilakukan dengan menginokulasi satu ose bakteri dari medium NA miring ke dalam 10 ml medium NB steril, kemudian diinkubasikan secara aerob pada *waterbath shaker incubator* bersuhu 37°C dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Suspensi bakteri lalu dimasukkan ke dalam Erlenmeyer lain yang berisi 90 ml medium NB steril. Bakteri diaktivasi kembali hingga mencapai fase logaritmik dengan laju pertumbuhan tertinggi yaitu pada jam ke-4. Sebanyak 10 ml kultur bakteri tersebut diambil dan dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf steril untuk kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Pellet dan supernatan yang dihasilkan lalu dipisahkan. Pellet tersebut dicuci dengan larutan fisiologis (NaCl 0,85%) steril kemudian disentrifugasi kembali. Proses pencucian ini dilakukan sebanyak dua kali. Pellet kemudian disuspensikan kembali menggunakan larutan fisiologis steril dan disesuaikan turbiditasnya dengan standar turbiditas 0,5 *McFarland* (Ogunmwoyi, *et al.*, 2010; Nazemiyeh, *et al.*, 2011). Standar turbiditas *McFarland* biasanya digunakan untuk menstandarisasi perkiraan jumlah bakteri dalam suspensi cair secara visual, dengan membandingkan turbiditas suspensi uji dengan standar turbiditas *McFarland* (NCCLS, 2003).

3. Tahap Perlakuan

a. *Disc-Difussion*

Pengujian aktivitas antibakteri tahap awal dilakukan menggunakan metode *disc-diffusion* dengan teknik *spread plate*. Sembilan ml medium NA cair dimasukkan ke dalam cawan Petri steril dan dibiarkan hingga padat. Sebanyak 200 μ l inokulum pada fase logaritmik (jam ke-4) yang kekeruhannya telah disamakan dengan standar 0,5 *McFarland* diletakkan di atas permukaan agar (Kankamol *et al.*, 2003). Inokulum lalu diratakan dengan tongkat L steril. Kertas cakram yang akan digunakan direndam dalam berbagai konsentrasi ekstrak kemudian ditempatkan dipermukaan agar yang telah berisi bakteri menggunakan pinset steril. Untuk kontrol positif menggunakan tetracycline 30 μ g/ml (Uwaezuoke and Aririatu, 2004) dan untuk kontrol negatif menggunakan DMSO 1% (Patel *et al.*, 2009). Selanjutnya medium tersebut diinkubasikan dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Parameter pada uji ini adalah inhibisi pertumbuhan bakteri dengan mengukur diameter daerah bening disekitar cakram (Cappuccino and Sherman, 2005).

b. *Minimum Inhibitory Concentration (MIC)*

Untuk menentukan nilai MIC digunakan metode *macro tube dilution* seperti yang direkomendasikan oleh *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS). Sebanyak 800 μ l suspensi bakteri uji pada fase logaritmik (jam ke-4) yang kekeruhannya telah disamakan

dengan standar 0,5 McFarland dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 4 ml medium NB dan 200 μ l ekstrak metanol daun *A. muricata* (Nazemiyeh *et al.*, 2011). Untuk kontrol positif menggunakan tetracycline 30 μ g/ml (Uwaezuoke and Aririatu, 2004) dan untuk kontrol negatif menggunakan DMSO 1% (Patel *et al.*, 2009). Kultur lalu diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Nilai MIC ditentukan berdasarkan konsentrasi ekstrak paling kecil yang menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri (Doss *et al.*, 2009; Nazemiyeh *et al.*, 2011).

c. *Minimum Bactericidal Concentration (MBC)*

Penentuan nilai MBC dilakukan dengan metode lempeng agar. Sebanyak 1 ml kultur dari tabung MIC diambil lalu dimasukkan ke dalam cawan Petri steril. Setelah itu dimasukkan 9 ml medium NA cair, dihomogenkan dan dibiarkan hingga memadat. Kultur diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Parameter pada uji ini yaitu dengan menghitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada lempeng agar (Doughari, 2006; Doss *et al.*, 2009). Untuk menentukan nilai MBC, konsentrasi ekstrak metanol daun *A. muricata* yang dipilih adalah konsentrasi terendah yang jumlah koloninya mendekati nol atau 99% dapat membunuh bakteri (Mayer, 2010).

F. Analisis Data

Data hasil uji aktivitas antibakteri kemudian diuji normalitas dan homogenitasnya dengan *Kolmogorov-Smirnov Test* dan *Homogeneity of Variances*. Selanjutnya data dianalisa menggunakan *Kruskal-Wallis Test* dengan taraf kepercayaan 95% untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh yang signifikan pada pemberian ekstrak metanol daun *Annona muricata* terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Semua uji statistika di atas diolah dengan menggunakan perangkat lunak SPSS 16 *for windows*.

