

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan termasuk ke dalam jenis penelitian eksperimental dengan memberikan perlakuan konsentrasi dan waktu inkubasi yang berbeda-beda.

B. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) karena penelitian dilakukan di laboratorium dan kondisi yang homogen. Pada pengujian aktifitas antispora digunakan konsentrasi ekstrak kemukus sebesar 0%, 1% dan 2% terhadap spora *B. cereus* dan *B. subtilis*. Pada pengujian *disk-diffusion* digunakan konsentrasi 1% dan 10%, dengan *chlorhexidine* merupakan kontrol positif serta DMSO 10% merupakan kontrol negatif. Digunakan pula konsentrasi yang berbeda pada saat MIC dan MBC dengan konsentrasi pengujian berdasarkan teknik pengenceran, yaitu 10000 µg/mL, 5000 µg/mL, 2500 µg/mL, 1250 µg/mL, 625 µg/mL, 312,5 µg/mL, 156,25 µg/mL, 78,1 µg/mL, 39 µg/mL dan 19,5 µg/mL. Setiap konsentrasi pengujian terdapat pengulangan, termasuk diantaranya kontrol positif dan kontrol negatif. Pada pengujian MIC dan MBC terdapat kontrol positif yang hanya terdiri dari medium sebanyak 200 µL dan kontrol negatif yang hanya terdiri dari inokulum sebanyak 200 µL.

C. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian adalah tanaman kemukus, sedangkan sampel dari penelitian ini adalah bagian buah dari tanaman kemukus.

D. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dimulai dari tanggal 01 April 2015 sampai dengan tanggal 28 April 2015 yang dilaksanakan di *Institute of Biosains (IBS), Universiti Putra Malaysia (UPM), Serdang, Malaysia*.

E. Instrumen Penelitian

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut:

Tabel 3.1. Alat Penelitian

No.	Nama Alat	Spesifikasi	Jumlah
1	Botol laboratorium	Fisherbrand 500 mL	2 buah
		Schott Duran 500 mL	2 buah
2	Timbangan	Sartorius	1 buah
3	<i>Autoclave</i>	Tomy SX500	1 buah
4	Spatula	-	2 buah
5	Cawan petri <i>disposable</i>	Brandon	100 buah
6	Laminar	ESCO EQU/04-EBC-2A	1 buah
7	Lup	-	5 buah
8	Bunsen	Fireboy	1 buah
9	Kaca objek	-	4 buah
10	Marker	Snowman	1 buah
11	Cotton bud	-	1 bungkus
12	Pinset	-	1 buah
13	Pipet mikro	Eppendorf	4 buah
14	Tips	Biru, kuning, putih	Secukupnya
15	Tabung mikro	1,5 mL	Secukupnya
		2 mL	
16	<i>Vortex</i>	Stuart	1 buah
17	<i>Scale zone</i>	HiAntibiotic Scale zone	1 buah
18	Kamera digital	Canon IXUS	1 buah
19	<i>Universal bottle</i>	-	2 buah
20	Microtiter	Cellstar	2 buah
21	Tabung sentrifugal	-	8 buah
22	Inkubator	Memmert IN55	1 buah
23	Destilator	Arium 611DI	1 buah
24	Lemari pendingin	Berjaya	1 buah
25	<i>Rotary vacuum evaporator</i>	Buchi Rotavapor R-3	1 buah
26	Penangas air	-	1 buah
27	Alat sentrifugasi	Sigma 1-14	1 buah
28	Labu erlenmeyer	-	1 buah
29	Corong kaca	-	1 buah
30	Labu ekstraksi	Pyrex	1 buah
31	Oven	-	1 buah
32	Gelas kimia	Pyrex	1 buah
33	<i>Incubator+shaker</i>	Wisecube	1 buah
34	Penjepit kaca objek	-	1 buah
35	Gelas ukur	Pyrex 500 mL	1 buah

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut:

Tabel 3.2. Bahan Penelitian

No.	Nama Bahan	Spesifikasi	Jumlah
1	Tryptic Soy Broth	Difco, Becton, Dickinson and Company, Spark, MD, USA	15 g
2	Agar	Merck, Darmstadt, Germany	16,8
3	Aluminium foil	My Chef	Secukupnya
4	Sarung tangan	Vandaier	2 pasang
5	Parafilm	"M"	Secukupnya
6	Akuades	-	3 L
7	Nutrient Broth	Difco, Becton, Dickinson and Company, Spark, MD, USA	4 g
8	Mueller Hinton Broth	Difco, Becton, Dickinson and Company, Spark, MD, USA	4,2 g
9	Stok <i>B. cereus</i>	ATCC 33019	1 cawan petri
10	Stok <i>B. subtilis</i>	ATCC 6633	1 cawan petri
11	Kemukus kering	-	100 g
12	Metanol 100%	QREC, QREC (Asia) SDN BHD, Selangor, Malaysia	500 mL
13	Natrium klorida	R&M Chemicals, R&M Marketing, Essex, U. K.	7,6 g
14	Kertas cakram	Whatman No. 1; d=6 mm	Secukupnya
15	<i>Chlorhexidine</i>	-	1 mL
16	DMSO	-	300 mL
17	Kertas saring	Whatman No. 1 Whatman No. 5	1 lembar 1 lembar
18	<i>Malachite green</i>	-	Secukupnya
19	Safranin	-	Secukupnya
20	Alkohol	70%	Secukupnya
21	Minyak imersi	-	Secukupnya
22	Kertas hisap	-	Secukupnya
23	Tisu	-	1 gulung

F. Metode Kerja

1. Persiapan Medium Pertumbuhan Bakteri

a) TSA (*Tryptic Soy Agar*)

Medium TSA dibuat dengan mencampurkan 15 g TSB (*Tryptic Soy Broth*), 7 g agar dan 500 mL akuades dalam botol laboratorium. Larutan medium kemudian dihomogenkan dan disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 90 menit kemudian dituang ke dalam cawan petri (*plating*). Medium disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 6⁰C.

b) NA (*Nutrient Agar*)

Medium NA dibuat dengan mencampurkan 4 g NB (*Nutrient Broth*), 7 g agar dan 500 mL akuades ke dalam botol laboratorium. Larutan medium kemudian dihomogenkan dan disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 90 menit kemudian dituang ke dalam cawan petri (*plating*). Medium disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 6⁰C.

c) MHA (*Mueller Hinton Agar*)

Medium dibuat sebanyak 200 mL dengan mencampurkan 4,2 g MHB, 2,8 g agar dan 200 mL akuades ke dalam botol laboratorium. Larutan medium kemudian dihomogenkan dan disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 90 menit kemudian dituang ke dalam cawan petri (*plating*). Medium disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 6⁰C.

2. Persiapan Kultur *B. cereus* dan *B. subtilis*

Stok *B. cereus* ATCC 33019 dan *B. subtilis* ATCC 6633 didapatkan dari *Laboratory of Natural Products, Institute of Bioscience (IBS), Universiti Putra Malaysia (UPM), Serdang, Selangor, Malaysia*. Satu lup bakteri diambil dari stok kemudian dipindahkan ke medium TSA. Kultur diinkubasi pada suhu 36⁰C selama 24 jam untuk keperluan sel vegetatif, sedangkan untuk keperluan spora inkubasi dilakukan selama 7 hari.

3. Ekstraksi Kemukus

Ekstraksi tanaman dilakukan berdasarkan Rukayadi *et al.* (2008) dengan modifikasi. Buah kemukus kering dicacah kecil menggunakan blender kemudian diambil sebanyak 100 g untuk dimaserasi. Maserasi dilakukan dengan pelarut

metanol 100% sebanyak 400 mL. Botol selanjutnya dilapisi dengan aluminium foil lalu disimpan dalam suhu ruangan selama 5 hari. Ekstrak kemukus kemudian disaring menggunakan kertas saring dan dipadatkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50°C. Selanjutnya ekstrak dilarutkan dengan DMSO 100% untuk mendapatkan larutan stok dengan konsentrasi 100 mg/mL (10 %).

4. Persiapan Spora

Spora *B. cereus* dan *B. subtilis* disiapkan berdasarkan metode yang dijelaskan sebelumnya oleh Rukayadi *et al.* (2009) dengan modifikasi. Satu cawan petri kultur bakteri *B. cereus* dan *B. subtilis* masing-masing dilarutkan dengan 10 mL 0,95% NaCl steril dalam tabung sentrifugal. Spora dipanen melalui sentrifugasi (4500 rpm selama 5 menit) dan tiga kali pencucian menggunakan larutan 0,95% NaCl steril. Setelah itu suspensi bakteri diinkubasi dalam penangas air dengan suhu 60°C selama 90 menit, dengan melakukan tahapan ini sel-sel vegetatif bakteri diasumsikan telah mati sehingga hanya spora yang masih bertahan. Suspensi spora kemudian disimpan dalam *freezer* sampai akan digunakan.

5. Penghitungan Jumlah Spora

Jumlah spora pada stok yang akan digunakan untuk pengujian dihitung terlebih dahulu. Stok spora *B. cereus* dan *B. subtilis* dibuat serial pengenceran mulai dari 10^{-1} sampai 10^{-9} . Pengenceran 10^{-3} sampai 10^{-6} kemudian disebar pada medium NA. Medium diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 37°C. Setelah 24 jam koloni yang tumbuh dihitung dan menghasilkan nilai spora awal dari *B. cereus* sebanyak $2,14 \times 10^8$ CFU/mL sedangkan untuk *B. subtilis* sebanyak $1,77 \times 10^8$ CFU/mL.

6. Pewarnaan Endospora

Untuk memastikan bahwa sampel spora dalam tabung benar-benar spora yang akan diuji, maka dilakukan verifikasi dengan pewarnaan spora. Stok spora *B. cereus* dan *B. subtilis* dibuat sediaan mikroskopis. Sediaan mikroskopis kemudian ditutup dengan kertas hisap lalu ditetesi *malachite green* dan dipanaskan di atas api, jika kertas hisap sudah mengering *malachite green* kembali ditambahkan, hal ini dilakukan selama 5 menit. Kertas hisap dibuang lalu sediaan mikroskopis dicuci dengan dialiri akuades. Safranin ditetaskan di atas sediaan kemudian ditunggu selama 2 menit. Sediaan dicuci kembali, air yang masih tersisa diserap

menggunakan kertas hisap. Hasil pewarnaan dilihat dibawah mikroskop dengan bantuan minyak imersi.

7. Uji Antibakteri

a) Metode *Disk Diffusion*

Metode diadaptasi dari Zainin *et al.* (2013). Inokulum *B. cereus* dan *B. subtilis* diambil menggunakan *cotton bud* kemudian disebar secara merata. Kertas cakram (d=6 mm) diletakkan di atas medium yang telah disebar bakteri sebelumnya. Pada tiap kertas cakram diteteskan masing-masing 10 μ L ekstrak kemukus 1%, 10%, *chlorhexidine* (CHX) sebagai kontrol positif dan DMSO 10% sebagai kontrol negatif. Kertas cakram ditunggu kering kemudian cawan petri ditutup dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian luas zona hambat diukur.

b) Penentuan MIC

Metode diadaptasi dari Zainin *et al.* (2013). Koloni *B. cereus* dan *B. subtilis* diambil menggunakan lup kemudian dilarutkan dalam 1 mL medium MHB dalam tabung mikro. Larutan kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks. Sepuluh μ L larutan bakteri kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi 10 mL medium MHB. Larutan bakteri ini akan digunakan pada pengujian MIC dengan metode *two fold dilutions*.

c) Penentuan MBC

Metode diadaptasi dari Zainin *et al.* (2013). Pengujian MBC dilakukan dengan mensub-kultur suspensi (sebanyak 10 μ L) dari sumur mikrotiter pengujian MIC. Cawan petri kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 37°C.

8. Uji Antispora

Pengujian antispora dilakukan berdasarkan metode yang telah dipaparkan oleh Kida *et al.* (2004) dan Rukayadi *et al.* (2009) dengan modifikasi. Sebagai kontrol positif digunakan glutaraldehid 10%. Konsentrasi glutaraldehid dan ekstrak kemukus yang diujikan yaitu 0%, 1% dan 2%.

Pengujian dilakukan dengan mencampurkan suspensi spora dengan ekstrak kemukus atau glutaraldehid (Tabel 3.3 dan Tabel 3.4), larutan ini selanjutnya disebut larutan uji.

Tabel 3.3. Jumlah glutaraldehid dan spora yang digunakan pada masing-masing perlakuan.

Konsentrasi (%)	Glutaraldehid (μL)	Spora (μL)
0.00	-	1000
1.00	100	900
2.00	200	800

Tabel 3.4. Jumlah ekstrak dan spora yang digunakan pada masing-masing perlakuan.

Konsentrasi (%)	Ekstrak (μL)	Spora (μL)
0.00	-	1000
1.00	100	900
2.00	200	800

Larutan uji diinkubasi dalam *incubator shaker* 37°C. Pada rentang waktu 0 dan 1 jam 10 μL larutan uji diambil dan diencerkan hingga pengenceran 10^{-2} . Setiap serial konsentrasi ekstrak kemukus dan glutaraldehid kemudian disebarkan pada medium NA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Jumlah koloni yang tumbuh dihitung dan dibandingkan dengan jumlah spora awal. Jika terdapat penurunan jumlah spora maka mengindikasikan adanya aktivitas antispora.

9. Analisis Data

Data hasil pengujian diolah secara statistik dengan pengujian normalitas, homogenitas, Oneway Anova, Kruskal Wallis dan uji T menggunakan *software* SPSS v16.