

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis dan Desain Penelitian**

Penelitian yang dilakukan menggunakan jenis penelitian eksperimental. Penelitian ini bertujuan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap sesuatu dalam kondisi yang terkendalikan (Quinn, 2002). Penelitian yang dilakukan menggunakan desain penelitian rancangan acak lengkap (RAL). Rancangan acak lengkap (RAL) merupakan jenis rancangan percobaan yang paling sederhana dan dipilih karena satuan percobaan yang digunakan bersifat homogen atau tidak terdapat faktor lain yang bisa memengaruhi respon diluar faktor yang diteliti (Hartanto, 2004). Uji yang digunakan dalam RAL yaitu uji *Disc Diffusion Assay* (DDA) dengan tujuan untuk menguji pengaruh ekstrak terhadap beberapa jenis bakteri penyebab jerawat. Beberapa pengujian lain yang dilakukan dalam penelitian ini, yaitu *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) untuk melihat konsentrasi minimum ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) untuk melihat konsentrasi minimum ekstrak yang dapat menyebabkan kematian pada bakteri, dan *Time-Kill Assay* untuk melihat waktu optimum yang dapat menyebabkan kematian pada bakteri. Uji antibakteri yang dilakukan berkaitan satu sama lain. Uji yang dilakukan pertama adalah DDA karena dari uji ini dapat diketahui pengaruh ekstrak terhadap beberapa jenis bakteri penyebab jerawat. Apabila sudah diketahui pengaruh ekstrak terhadap bakteri, selanjutnya dilakukan uji MIC dan MBC untuk mengetahui konsentrasi ekstrak yang tepat untuk menghambat dan menyebabkan kematian bakteri. Uji yang terakhir dilakukan adalah *Time-Kill Assay* karena konsentrasi yang digunakan dalam uji ini didapatkan dari konsentrasi uji MIC yang tepat untuk menghambat bakteri.

#### **3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FPMIPA) Universitas Pendidikan Indonesia (UPI) untuk tahap pembuatan kultur dan

pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri penyebab jerawat. Adapun proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FPMIPA) Universitas Pendidikan Indonesia (UPI) untuk proses ekstraksi. Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Januari hingga bulan Maret 2020.

### **3.3 Alat dan Bahan Penelitian**

Alat dan bahan penelitian dalam hal ini berupa seluruh alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian yang terdapat baik di Laboratorium Riset Bioteknologi FPMIPA B UPI, Laboratorium Biokimia, Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA A UPI, dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas *Food Science and Technology* Universiti Putra Malaysia yang terdapat pada Lampiran 1.1 dan Lampiran 1.2.

### **3.4 Prosedur Penelitian**

#### **3.4.1 Persiapan Alat dan Bahan**

Tahap persiapan adalah mempersiapkan alat dan bahan yang akan digunakan terlebih dahulu. Bahan yang akan digunakan ditimbang terlebih dahulu sesuai dengan kebutuhan. Media yang harus ditimbang dan digunakan dalam penelitian yaitu *Nutrient Broth* (NB) dan *Nutrient Agar* (NA) untuk kurva tumbuh, *Mueller Hinton Agar* (MHA) untuk uji DDA (*Disc Diffusion Assay*), MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*), dan *Time Kill Assay*, sedangkan *Mueller Hinton Broth* (MHB) digunakan untuk pengukuran nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) pada *microtiter plate*. Kemudian semua alat dan medium yang akan digunakan dalam penelitian ini di sterilisasi terlebih dahulu sebelum digunakan, dengan metode sterilisasi basah menggunakan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1.5 atm.

Buah kemukus (*Piper cubeba* L.) diperoleh dari salah satu toko herbal di Bandung, Jawa Barat. Buah kemukus yang ada di toko herbal berasal dari perkebunan di Kabupaten Wonosobo dan Purworejo, Jawa Tengah dengan usia tanaman sekitar 20 tahun. Sampel buah kemukus sudah dalam keadaan kering sehingga tidak lagi diperlukan pengeringan dan dipisahkan buah kemukus kering yang terlihat bagus untuk diekstraksi. Biakan bakteri diperoleh dari Fakultas *Food*

*Science and Technology* Universiti Putra Malaysia. Biakan bakteri yang digunakan diantaranya *Staphylococcus aureus* KCCM 12255, *Staphylococcus epidermidis* KCCM 40003 dan *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 yang ditumbuhkan pada medium *Mueller Hinton Agar* (MHA), diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk uji antibakteri (Hamizan Rahman dkk., 2016).

### **3.4.2 Ekstraksi Buah Kemukus (*Piper cubeba* L.)**

Metode ekstraksi merujuk pada Rukayadi dkk. (2009). Sampel buah kemukus kering yang baik dipisahkan dan dipersiapkan. Pemilihan sampel buah kemukus yang baik dapat dilihat dari buahnya yang berwarna coklat tua dengan ukuran yang sama dan juga organ buahnya yang tergolong lengkap (tidak ada yang rusak atau hilang). Buah kemukus ditimbang sebanyak 250 g kemudian dihaluskan menggunakan *blender* hingga menjadi *powder*. Kemudian bubuk buah kemukus 250 g dilarutkan dalam etanol absolut 99,80 % pro analitik (PA) dengan perbandingan 250 g bubuk buah kemukus dan 1000 mL etanol (w/v). Selanjutnya larutan dihomogenkan dengan *waterbath shaker* selama 24 jam dalam suhu 30°C dan kecepatan 150 rpm. Larutan kemudian disaring menggunakan 2 buah kertas Whatman No.2. Lalu *Round bottom flask* ditimbang menggunakan timbangan analitik untuk tempat ekstraksi. Dimasukkan larutan sampel yang sudah disaring ke dalam *round bottom flask*. Kemudian *round bottom flask* berisi sampel disambungkan dengan alat evaporimeter dengan suhu 60°C dan kecepatan 100 rpm hingga konsentrasi larutan sampel menjadi semi solid. Semi solid hasil evaporasi dalam *round bottom flask* dimasukkan ke dalam oven 50°C selama 15 menit. Hasil semi solid dalam *round bottom flask* selanjutnya dikeluarkan dari inkubator dan dimasukkan ke dalam tabung eksikator untuk didinginkan selama 7 menit. Setelah itu ekstrak Hasil semi solid dari *round bottom flask* ditimbang menggunakan timbangan analitik dan hasil timbangan dikurangi dengan timbangan *round bottom flask* yang kosong. Setelah dikurangi maka dapat diketahui mengenai persentase dari hasil semi solid yang akan digunakan. Hasil semi solid yang sudah dibuat lalu disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C. Ekstrak yang digunakan untuk pengujian antibakteri yaitu pada konsentrasi 1% karena mengacu pada penelitian

sebelumnya ekstrak kemukus 1% sudah dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Ann & Rukayadi, 2019).

### 3.4.3 Kurva Tumbuh Bakteri

Metode kurva tumbuh yang digunakan adalah metode turbidimetri (Cappucino & Sherman, 2011). Bakteri uji (*S. aureus* KCCM 12255, *S. epidermidis* KCCM 40003 dan *P. acnes* ATCC 6919) disubkultur pada medium NA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian satu ose koloni bakteri (*S. aureus* KCCM 12255, *S. epidermidis* KCCM 40003 dan *P. acnes* ATCC 6919) diinokulasikan ke dalam tabung reaksi berisi 10 mL NB dan dikomparasi dengan standar turbiditas 0.5 McFarland untuk mendapatkan jumlah inokulum yang sesuai dengan  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL. Sebanyak 5 mL inokulum diambil dan dimasukkan ke dalam 95 mL medium NB baru dalam tabung Erlenmeyer 250 mL lalu diinkubasi pada *waterbath shaker* dengan suhu 37°C serta kecepatan 121 rpm selama 24 jam dengan waktu observasi pada setiap interval 2 jam. Kemudian nilai absorbansi diukur pada setiap waktu observasi dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Setelah diketahui waktu pertumbuhannya dari kurva tumbuh maka ditentukan laju pertumbuhan tertinggi dari setiap bakteri. Menurut Doelle dkk (2009), laju pertumbuhan bakteri dapat dihitung dengan rumus:

$$\mu = \frac{\log N_t - \log N_0}{0,301 \times t}$$

Keterangan:

- $\mu$  : kecepatan pertumbuhan bakteri
- $N_0$  : Jumlah awal sel bakteri
- $N_t$  : Jumlah akhir sel bakteri
- $t$  : Selang waktu pertumbuhan bakteri

### 3.4.4 Uji Antibakteri

Uji antibakteri dilakukan terhadap bakteri penyebab jerawat yaitu *S. aureus* KCCM12255, *S. epidermidis* KCCM40003 dan *P. acnes* ATCC6919. Uji antibakteri yang dilakukan terhadap beberapa bakteri tersebut yaitu *Disc Diffusion Assay* (DDA), *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MIC) (Ann & Rukayadi, 2019).

#### 3.4.4.1 *Disc Diffusion Assay (DDA)*

Metode yang digunakan dirujuk pada *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016). Pengujian ini diawali dengan disiapkannya medium pertumbuhan bakteri yaitu *Mueller Hinton Agar* (MHA). Isolat murni bakteri (*S. aureus* KCCM12255, *S. epidermidis* KCCM40003 dan *P. acnes* ATCC6919) disubkultur dan diinkubasi selama 12 jam pada medium MHA sesuai dari hasil kurva tumbuh. Bakteri yang sudah disubkultur disiapkan pada medium MHA dengan *cotton bud* steril menggunakan metode *swab*.

Sebanyak 6 kertas cakram steril berukuran  $\pm 6$  mm diletakkan di atas medium MHA. Satu kertas cakram ditetesi dengan 0,1% *chlorohexidine* (CHX) sebanyak 10  $\mu$ l sebagai kontrol positif, satu kertas cakram lain ditetesi dengan 10% *dimethylsulfoxide* (DMSO) sebanyak 10  $\mu$ l sebagai kontrol negatif, dan empat kertas cakram lainnya ditetesi dengan 1% ekstrak kemukus masing masing sebanyak 10  $\mu$ l sebagai perlakuan uji. *Plate* kemudian disimpan dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, maka daerah bening yang terbentuk menunjukkan zona hambat pertumbuhan bakteri. Diameter zona hambat yang diukur termasuk dengan diameter kertas cakram yang ditetesi ekstrak ataupun kontrol positif dan negatif. Pengukuran dilakukan menggunakan penggaris dengan satuan milimeter (mm).

#### 3.4.4.2 *Minimum Inhibitory Concentration (MIC) dan Minimum Bactericidal Concentration (MBC)*

Metode MIC pada penelitian ini menggunakan metode *two-fold dilution* (CLSI, 2016). Isolat murni bakteri (*S. aureus* KCCM12255, *S. epidermidis* KCCM40003 dan *P. acnes* ATCC6919) disubkultur dan diinkubasi selama 12 jam pada medium MHA sesuai dari hasil kurva tumbuh. Tahapan ini diawali dengan dilarutkannya masing-masing bakteri hasil subkultur ke dalam 10 mL media *Mueller Hinton Broth* (MHB) pada tabung reaksi. Kemudian inokulum bakteri yang sudah dilarutkan dibandingkan dengan larutan Mc Farland  $1.5 \times 10^{-8}$  CFU/mL. Perbandingan dilakukan untuk mengetahui koloni dari suspensi bakteri. Sebanyak 100  $\mu$ l suspensi bakteri dipindahkan ke dalam microtiter 96 *well* untuk dilakukan pengujian MIC, kolom pertama hanya diisi oleh media MHB sebagai kontrol pertumbuhan negatif. Kolom kedua diisi oleh MHB dan inokulum bakteri saja

sebagai kontrol pertumbuhan positif. Selanjutnya kolom 3 sampai dengan kolom 12 diisi oleh suspensi bakteri yang sudah ditambahkan dengan ekstrak etanol buah kemukus dengan pengenceran berturut-turut setengah kali dari konsentrasi awal, sehingga pada uji MIC ini terdapat 10 macam konsentrasi, yaitu 5 mg/mL, 2.5 mg/mL, 1.25 mg/mL, 0.6250 mg/mL, 0.3125 mg/mL, 0.1562 mg/mL, 0.0781 mg/mL, 0.0390 mg/mL, 0.0195 mg/mL, dan 0.0097 mg/mL. *Plate microtiter* kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi dilakukan pengecekan secara visual.

Medium MHA disiapkan dalam *plate disposable*. Bagian bawah *plate disposable* diberikan label 1 hingga 12 searah dengan jarum jam untuk menandai masing-masing suspensi bakteri hasil MIC. Sebanyak 10 µl suspensi dari setiap sumur *microtiter* ditumbuhkan pada medium MHA sesuai. Selanjutnya medium MHA dengan kultur suspensi bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Konsentrasi dari setiap suspensi bakteri yang diuji sama seperti konsentrasi pada pengujian MIC (Rukayadi dkk., 2009).

#### **3.4.4.3 Time Kill Assay**

Metode yang digunakan untuk *Time Kill Assay* merujuk pada Rukayadi dkk. (2009). Selanjutnya inokulum bakteri (*S. aureus* KCCM 12255, *S. epidermidis* KCCM 40003 dan *P. acnes* ATCC 6919) dibuat dalam 10 mL medium MHB dan dibandingkan dengan larutan Mc Farland  $1.5 \times 10^{-8}$  CFU/mL untuk membandingkan kesamaan dari suspensi inokulum bakteri. Inokulum bakteri yang digunakan yaitu pada pengenceran  $10^{-5}$  dan  $10^{-6}$ . Larutan stok MIC dibuat sesuai dengan perhitungan dengan konsentrasi  $0 \times \text{MIC}$ ,  $1 \times \text{MIC}$ ,  $2 \times \text{MIC}$ , dan  $4 \times \text{MIC}$ . Pengujian ini dilakukan dalam jangka waktu 0 jam, 1 jam, 2 jam dan 4 jam. Untuk jangka waktu 1 jam, 2 jam dan 4 jam masing-masing *microtube* dimasukkan ke dalam inkubator 37°C. Sebanyak 10 µl masing-masing suspensi bakteri ditumbuhkan pada medium MHA. *Plate* diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

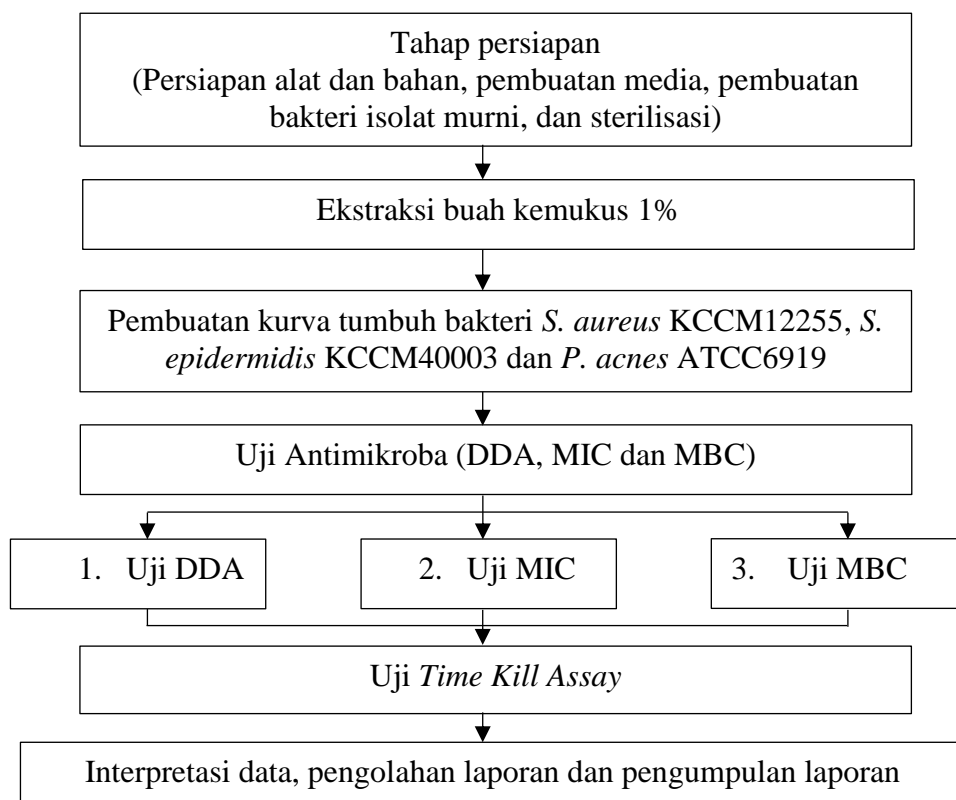
### **3.5 Analisis Statistik**

Analisis data yang dilakukan dalam penelitian ini menggunakan uji Normalitas dan *Mann-Whitney* menggunakan aplikasi SPSS 2.2 untuk melihat signifikansi perbedaan perlakuan antara ekstrak buah kemukus dengan CHX pada

bakteri uji. Kurva dari hasil penelitian dibuat menggunakan aplikasi Microsoft Excel 2010.

### 3.6 Alur Penelitian

Alur penelitian pada uji aktivitas ekstrak kemukus (*P. cubeba* L.) terhadap bakteri penyebab jerawat terdapat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Alur Penelitian