BAB III
METODE PENELITIAN

1.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental karena dalam penelitian ini terdapat perlakuan konsentrasi dan waktu inkubasi yang berbeda-beda. Jenis penelitian eksperimental merupakan penelitian yang dilakukan untuk mencari pengaruh suatu perlakuan tertentu dalam kondisi yang terkendalikan (Quinn, 2002). Digunakan pendekatan secara kualitatif dan kuantitatif untuk membahas fenomena yang terjadi di dalam penelitian ini.

Desain penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) karena penelitian dilakukan di laboratorium dan kondisi yang homogen. RAL digunakan jika kondisi unit percobaan yang digunakan relatif homogen (Nurhayati, 2010). Penelitian ini meliputi persiapan sampel, ekstraksi, persiapan inokulum bakteri MRSA dan subkultur bakteri tersebut, pengamatan kurva tumbuh dan kurva baku bakteri MRSA, *Disc Diffuision Assay* (DDA), pengukuran nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC), serta *Time Kill Assay*. Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat pada uji aktivitas antibakteri dengan metode DDA, kekeruhan suspensi pada uji pengukuran nilai MIC dan uji pengukuran nilai MBC, serta jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada *Time Kill Assay*.

Metode difusi dalam hal ini *Disc Diffusion Assay* (DDA) dapat menjadi studi awalan untuk melihat ada atau tidaknya aktivitas antibakteri suatu agen terhadap bakteri tertentu. Sementara uji dilusi seperti MIC dan MBC dilakukan kemudian untuk mengetahui lebih rinci secara kuantitatif konsentrasi minimum suatu agen antibakteri untuk menghambat dan mematikan suatu koloni bakteri. Lebih lanjut, uji *Time Kill Assay* dilakukan untuk mengetahui spektrum ketepatan suatu konsentrasi hambat minimum yang dihasilkan (MIC) suatu agen antibakteri dengan kombinasi variasi waktu tertentu yang mematikan bagi suatu koloni bakteri.

Elysa Meilani Faradina, 2020
UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK BUAH KEMUKUS (Piper cubeba L.) TERHADAP BAKTERI METHICILLIN RESISTANT Staphylococcus aureus (MRSA)
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

1.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Riset Bioteknologi Departemen Pendidikan Biologi dan Laboratorium Kimia Instrumen Fakultas Pendidikan Matematiaka dan Ilmu Pengetahuan Alam (FPMIPA) Universitas Pendidikan Indonesia pada bulan Januari hingga Maret 2020.

1.3 Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat dan bahan yang terdapat di Laboratorium Riset Bioteknologi, Departemen Pendidikan Biologi, FPMIPA UPI yang terdapat pada Lampiran 1.

1.4 Prosedur Penelitian

1.4.1 Persiapan Alat dan Bahan Penelitian

Pada tahap persiapan, seluruh alat dan bahan dipersiapkan secara aseptik. Alat dibersihkan lalu disterilisasi pada suhu 121ºC dan 1,5 atm. Selain itu, bahan yang akan digunakan ditimbang sesuai dengan kebutuhan. Media yang digunakan pada tahap pelaksanaan kurva tumbuh dan kurva baku adalah *Nutrient Broth* (NB) dan *Nutrient Agar* (NA), sementara medium yang digunakan pada tahap uji DDA, MIC, MBC dan *Time Kill Assay* adalah *Mueller Hinton Agar* (MHA) dan *Mueller Hinton Broth* (MHB). Biakan bakteri MRSA yang akan diuji diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Sains dan Teknologi Makanan, Universiti Putra Malaysia. Buah kemukus (*Piper cubeba* L.) kering diperoleh dari salah satu Toko Herbal Tradisional di Bandung. Sampel buah kemukus yang terdapat pada toko tesebut berasal dari pertanian tanaman kemukus di Kabupaten Wonosobo dan Purworejo, Jawa Tengah.

1.4.2 Kurva Tumbuh dan Kurva Baku Bakteri MRSA

Pengamatan kurva tumbuh yang dilakukan dalam penelitian ini merujuk pada Cappuchino & Sherman (2011). Bakteri MRSA yang akan diuji disubkultur pada medium MHA dan diinkubasi pada suhu 37ºC selama 24 jam (Hamizan Rahman dkk., 2016). Bakteri diinokulasikan ke dalam 10 ml NB kemudian dibandingkan dengan 0,5 McFarland untuk mendapatkan inokulum dengan standar

$1,5\times10^8$ CFU/ml. Sebanyak 5 ml inokulum masing-masing bakteri dimasukkan ke dalam 95 ml medium NB dalam tabung Erlenmeyer 250 ml lalu diinkubasi pada *waterbath shaker* pada suhu 37°C pada kecepatan 121 rpm selama 24 jam dengan waktu observasi pada setiap interval 2 jam. Dilakukan pengukuran nilai absorbansi pada setiap waktu observasi dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Dilakukan perhitungan laju pertumbuhan untuk menentukan usia inokulum bakteri yang memiliki laju pertumbuhan tertinggi dengan rumus (Doelle dkk., 2009):

$$\mu = \frac{\log Nt - \log No}{0.301\ x\ t}$$

Keterangan:
(μ) : Kecepatan pertumbuhan bakteri
N_0 : Jumlah awal sel bakteri
Nt : Jumlah akhir sel bakteri
t : Selang waktu pertumbuhan bakteri

1.4.3 Ekstraksi

Sampel buah kemukus (*Piper cubeba* L.) kering yang baik disiapkan. Sampel buah kemukus yang digunakan merupakan sampel yang homogen karena berasal dari tempat pusat pertanian yang sama di Kabupatan Wonosobo dan Purworejo dengan usia tanaman sekitar 20 tahun, kemudian dipilih lagi dengan kriteria tertentu. Adapun kriteria pemilihan sampel adalah dengan cara memperhatikan hal-hal seperti warna buah yang berwarna coklat tua, ukuran yang sama dan organ buah tergolong lengkap atau tidak ada bagian yang rusak atau hilang. Sampel buah kering kemukus yang sudah dipisahkan lalu ditimbang sebanyak 300 g. Buah yang sudah ditimbang tersebut dihaluskan menggunakan *blender* sampai halus dan terbentuk seperti *powder* lalu dilarutkan menggunakan etanol absolut (PA) sebanyak 1200 ml sehingga perbandingan sampel dengan pelarut adalah 1:4. Larutan tersebut selanjutnya disimpan di dalam *waterbath shaker* pada suhu 30ºC dan dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam.

Larutan disaring menggunakan alat *aspirator pump* dan kertas filtrasi *Whatman filter paper* nomor 2 sampai terbentuk dua filtrat. *Round bottom flask* berisi filtrat kemudian dioven selama 30 menit dalam suhu 105ºC sesuai dengan standar AOAC (*Association of Official Analytical Chemist*). Larutan sampel dalam

etanol yang telah disaring lalu dipindahkan ke dalam *round bottom flask* yang telah dipanaskan sebelumnya dan ditimbang berat bersihnya. Larutan sampel dimasukan ke dalam alat *rotary evaporator*. Suhu air diatur sesuai dengan titik didih etanol, yakni 60ºC dengan kecepatan 100 rpm. Sampel dibiarkan hingga berbentuk semiliquid dan tetesan etanol dalam tabung penghisap menguap. Setelah terbebas dari etanol, sampel dimasukan ke dalam oven selama 15 menit dalam suhu 60ºC dan disimpan di dalam eksikator atau desikator selama 7 menit. Sampel kemudian ditimbang dan hasil timbangan dikurangi dengan timbangan *round bottoml flask* yang kosong. Ekstrak yang sudah terbentuk lalu disimpan di lemari es pada suhu 4ºC. Ekstrak sampel tersebut kemudian dibuat menjadi konsentrasi 1% (10 mg ekstrak dalam 1 ml 10% DMSO). Adapun penggunakaan ekstrak buah kering kemukus dalam konsentrasi 1% berdasarkan pada penelitian Rukayadi dkk. (2019) yang menyatakan bahwa ekstrak kering buah kemukus memiliki daya antibakteri yang kuat.

1.4.4 Pembuatan Inokulum Bakteri

Inokulum bakteri MRSA yang akan diuji dibuat dengan cara pembuatan subkultur bakteri yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Sains dan Teknologi Makanan, Universiti Putra Malaysia. Subkultur bakteri MRSA dilakukan di Laboratorium Riset Bioteknologi, Departemen Pendidikan Biologi, FPMIPA dengan kondisi aseptik pada medium MHA dan diinkubasi pada suhu 37ºC.

1.4.5 Uji *Disc Diffusion Assay* (DDA)

Tujuan dari uji kerentanan DDA Kirby-Bauer adalah untuk menentukan sensitivitas atau resistensi bakteri patogen aerob dan anaerob fakultatif terhadap berbagai senyawa antimikroba. Metode yang digunakan untuk uji DDA merujuk pada panduan *Clinical Laboratory Standart Institute* (CLSI, 2016).

Alat dan bahan yang dibutuhkan disiapkan dan disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121ºC dan tekanan 1,5 atm. Isolat murni masing-masing strain bakteri MRSA disiapkan untuk mendapatkan *single colony*. Isolat murni yang tersedia diinokulasikan ke dalam *plate* berisi medium *Mueller Hinton Agar* (MHA)

dengan *cotton swab* yang steril. Kertas cakram steril berukuran ±6 mm disimpan di atas medium MHA lalu ditetesi dengan *chlorohexidine* (CHX) sebagai kontrol positif sebanyak 10 µL, DMSO 10% sebagai kontrol negatif sebanyak 10 µL, dan ekstrak etanolik buah kemukus dengan konsentrasi 1% sebanyak 10 µL dengan 4× ulangan (A, B, C, D). *Plate* kemudian disimpan dalam inkubator dengan suhu 37ºC selama 24 jam. Zona bening yang terbentuk menunjukkan zona hambat pertumbuhan bakteri, lalu diameter zona hambat tersebut diukur dalam skala milimeter (mm) menggunakan penggaris dengan memasukkan diameter kertas cakram ke dalam perhitungan zona hambat yang terbentuk.

1.4.6 Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

Prosedur MIC dimulai dengan membuat 10 ml kaldu *Mueller Hinton Broth* (MHB) untuk setiap tabung reaksi. Jumlah tabung reaksi tergantung pada jumlah strain bakteri yang akan diuji. Dengan menggunakan jarum ose, koloni tunggal dari cawan Petri dimasukkan ke dalam botol tabung reaksi yang mengandung MHB dan dihomogenkan menggunakan *vortex*. Keempat tabung reaksi dari empat strain MRSA dibandingkan dengan standar kekeruhan 0,5 McFarland. Standar McFarland digunakan sebagai referensi untuk menyesuaikan kekeruhan suspensi bakteri sehingga jumlah bakteri berada dalam kisaran yang ditentukan untuk pengujian mikroba standar, yaitu sebanding dengan $1{,}5\times10^{8}$ CFU/ml.

Lempeng 96 mikrotiter sumur ditandai dan 100 µl MHB yang sudah mengandung bakteri dituangkan ke dalam sumur mikrotiter dari kolom 12-2. Sebanyak 100 µl 1% ekstrak buah kemukus ditambahkan ke kolom 12. Pengenceran dua kali atau *twofold dilution* dilakukan hingga kolom 3, begitu juga dengan CHX sebagai kontrol positif. Untuk kolom 1, hanya MHB tanpa bakteri yang dituangkan. Lempeng mikrotiter 96 sumur diinkubasi semalam pada suhu 37ºC (Rukayadi dkk., 2019). Nilai MIC pada penelitian ini menggunakan metode *two-fold serial broth microdilution* atau seri pengenceran 2 kali lipat (CLSI, 2016).

1.4.7 Uji *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC)

Untuk pengujian MBC, empat cawan medium MHA disiapkan dan ditandai dengan nomor 1-12 searah jarum jam untuk masing-masing strain bakteri MRSA.

Lempeng 96 mikrotiter sumur hasil dari uji MIC yang telah diinkubasi disiapkan. Sebanyak 10 µl kolom tersebut dipindahkan ke titik yang ditandai dalam cawan Petri MHA baik ekstrak maupun CHX sebagai kontrol positif. Lalu cawan Petri tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37ºC (Rukayadi dkk., 2019).

1.4.8 Uji *Time Kill Assay*

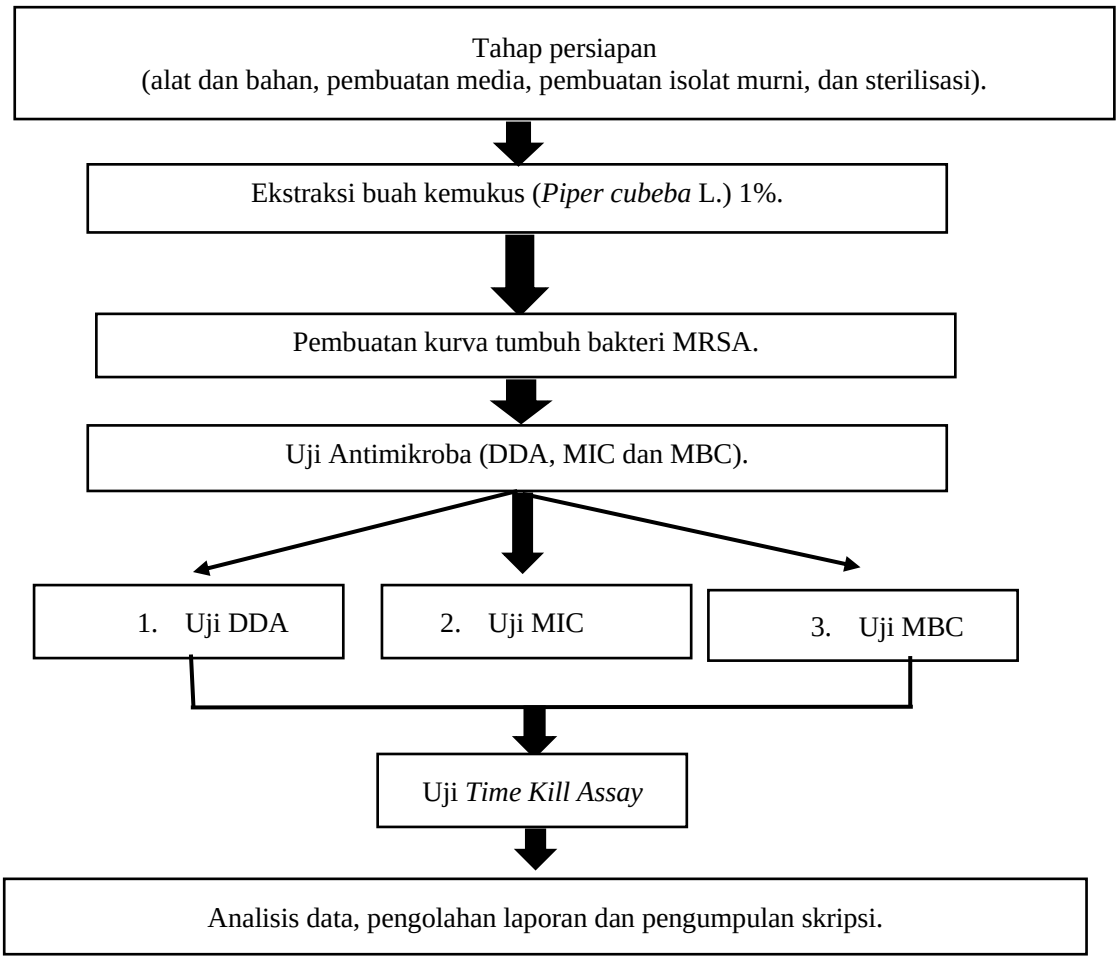
Metode yang digunakan untuk *Time Kill Assay* merujuk pada Rukayadi dkk. (2006). Inokulum bakteri MRSA yang akan diuji dibuat dalam 10 ml medium MHB dan dikomparasi dengan larutan 0,5 McFarland. Inokulum bakteri yang digunakan yaitu pada pengenceran 10^{-5} dan 10^{-6}. Larutan stok MIC dibuat sesuai dengan perhitungan dengan konsentrasi 0×MIC, 1×MIC, 2×MIC, dan 4×MIC. Pengujian 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 pada suhu 37ºC. Sebanyak 10 µl masing-masing suspensi bakteri ditumbuhkan pada medium MHA. Cawan kemudian diinkubasi pada suhu 37ºC selama 24 jam.

1.5 Analisis Data

Analisis data yang dilakukan pada penelitian ini adalah uji normalitas dan uji *Mann Whitney* menggunakan *software* SPSS versi 2.2. Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui sebaran data sebagai salah satu asumsi dasar dalam uji statistik. Uji *Mann Whitney* merupakan uji non parametrik untuk mengetahui perbedaan median dua kelompok bebas yang datanya tidak terdistribusi normal. Digunakan pula aplikasi Microsoft Excel 2010 untuk membuat kurva hasil penelitian.

1.6 Alur Penelitian

Alur penelitian dimulai dengan tahap persiapan, ekstraksi, pembuatan kurva tumbuh, uji antimikroba DDA, MIC dan MBC. Kemudian, dilanjutkan uji *time kill assay* dan pembuatan skripsi seperti yang dijelaskan pada Gambar 3.6 di bawah ini.



Gambar 3.6 Alur Penelitian