

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini merupakan eksperimen. Penelitian eksperimen merupakan penelitian untuk menentukan pengaruh *independent variable* (perlakuan) terhadap *dependent variable* atau variabel dampak (Jaedun, 2011). Pada penelitian ini terdapat perlakuan konsentrasi dan waktu inkubasi yang berbeda. Jenis penelitian eksperimental yang dilakukan untuk mencari pengaruh suatu perlakuan tertentu dalam kondisi yang terkendali (Patton, 2002). Pada penelitian ini digunakan pendekatan secara kuantitatif dan kualitatif untuk membahas fenomena yang terjadi.

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

Metode difusi dalam uji *Disc Diffusion Assay* (DDA) menjadi studi awal untuk melihat ada atau tidaknya aktivitas antibakteri dari suatu agen terhadap bakteri tertentu. Kemudian untuk uji dilusi seperti *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) dilakukan untuk mengetahui konsentrasi minimum suatu agen antibakteri untuk menghambat dan mematikan suatu koloni bakteri tertentu secara kuantitatif. Terakhir, uji *Time Kill Assay* dilakukan untuk mengetahui ketepatan suatu konsentrasi hambat minimum hasil uji MIC suatu agen antibakteri dengan kombinasi variasi waktu tertentu yang mampu mematikan suatu koloni 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). Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Maret hingga bulan Juni 2022.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan pada penelitian ini berupa seluruh alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian yang terdapat di Laboratorium Riset Bioteknologi FPMIPA B UPI meliputi *beaker glass*, cawan Petri *disposable*, jarum ose, lemari pendingin, mikropipet, oven, parafilm, aquades, daun pegagan, daun baru cina, *antiseptic chlorhexidine* (CHX), *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) 100%, etanol, inokulum bakteri penyebab jerawat (*Propionibacterium acne*, *Staphylococcus epidermidis* dan *Staphylococcus aureus*). Daftar lengkap alat dan bahan yang digunakan terdapat pada Lampiran 1.1 dan Lampiran 1.2.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Alat dan Bahan

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

Biakan bakteri diperoleh diantaranya *S. aureus*, *S. Epidermidis*, dan *P. acnes* yang ditumbuhkan pada medium *Mueller Hinton Agar* (MHA), diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk uji antibakteri (Rahman *et al.*, 2016).

3.4.2 Ekstraksi Daun Pegagan (*Centella asiatica*) dan Daun Baru Cina (*Artemisia vulgaris*)

Ekstraksi dilakukan dengan modifikasi penelitian Rukayadi *et al.* (2008). Sampel yang sudah dilakukan pencucian, dikeringkan terlebih dahulu di dalam Oven selama 1-2 jam dalam suhu 50°C. Kemudian sampel di *blend* hingga halus. Timbang sampel sebanyak 100 g ditambahkan etanol sebanyak 400 ml dan disimpan *Shakerbath* pada suhu 40°C dengan kecepatan 80 rpm selama 24 jam. Lalu sampel disaring menggunakan *Paper Whatman* No. 1. Kemudian hasil penyaringan dipindahkan ke dalam *round bottom flask* steril yang sudah ditimbang. uapkan etanol menggunakan *Rotary Evaporator*, setelahnya sampel dimasukkan ke dalam Oven selama 15-30 menit pada suhu 50°C. Kemudian *round bottom flask* ditimbang kembali untuk menghitung ekstrak yang didapatkan. Ekstrak sampel kemudian dibuat konsentrasi 1%. Penetapan kadar ekstrak 1% atau 10 mg/ml yang digunakan berdasarkan hasil penelitian Park dan Oh (2019) yang menunjukkan bahwa ekstrak daun baru cina memiliki nilai MIC 10 mg/ml.

3.4.3 Kurva Tumbuh Bakteri

Metode kurva tumbuh yang digunakan adalah metode turbidimetri (Cappucino & Sherman, 2011). Bakteri uji (*P. acnes* ATCC 11827, *S. epidermidis* FNCC 0048, dan *S. aureus* FNCC 0047) disubkultur pada medium *Nutrient Agar* (NA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Bakteri diinokulasikan ke dalam 10 ml *Nutrient Broth* (NB) kemudian dibandingkan dengan 0,5 McFarland untuk mendapatkan inokulum dengan standar 1.5×10^8 CFU/mL. Sebanyak 5 mL inokulum bakteri 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. Dilakukan perhitungan laju pertumbuhan untuk menentukan inokulum bakteri yang memiliki laju pertumbuhan tertinggi. Menurut Doelle *et al.* (2009), laju pertumbuhan bakteri dapat dihitung dengan rumus :

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

Keterangan:

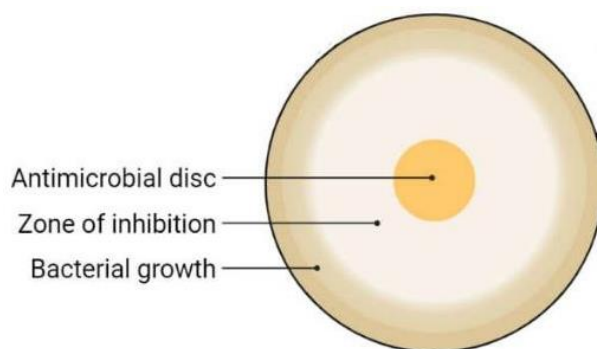
- μ : kecepatan pertumbuhan bakteri
- N_0 : Jumlah awal sel bakteri
- N_t : Jumlah akhir sel bakteri
- t : Selang waktu pertumbuhan bakteri

3.4.4 Uji Antibakteri

Uji antibakteri dilakukan terhadap bakteri penyebab jerawat yaitu *P. acnes* (ATCC 11827), *S. epidermidis* (FNCC 0048), dan *S. aureus* (FNCC 0047). Uji antibakteri yang dilakukan terhadap beberapa bakteri tersebut meliputi *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 merujuk pada *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016). Isolat murni bakteri (*P. acnes* ATCC 11827, *S. epidermidis* FNCC 0048, dan *S. aureus* FNCC 0047) disubkultur dan diinkubasi selama 12 jam pada medium MHA. Bakteri yang sudah disubkultur disiapkan pada medium MHA dengan *cotton bud* steril menggunakan metode swab. Kemudian kertas cakram steril berukuran ± 6 mm diletakkan di atas medium MHA secara melingkar. Kertas cakram ditetesi dengan 1% ekstrak daun pegagan sebanyak 10 μ l sebagai perlakuan uji, 0,1% *chlorhexidine* (CHX) sebanyak 10 μ l sebagai kontrol positif, dan ditetesi dengan 100% *dimethylsulfoxide* (DMSO) sebanyak 10 μ l sebagai kontrol negatif. Cawan Petri kemudian disimpan dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam untuk selanjutnya dilihat zona hambat yang terbentuk (Gambar 3.1).



Gambar 3.1. Interpretasi Pengukuran Zona Hambat
(Sharma, 2022)

Pengukuran diameter zona hambat dilakukan menggunakan penggaris dengan satuan milimeter (mm) pada area yang tidak ditumbuhi oleh bakteri (*zone inhibition*) dari ujung zona hambat terluar melewati kertas cakram. Hasil pengukuran zona hambat diinterpretasikan berdasarkan Susanto *et al.*, (2012) yaitu:

- $\leq 5,0$ mm : Lemah
- 6 - 10 mm : Sedang
- 11-20 mm : Kuat
- ≥ 20 mm : Sangat Kuat

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

Metode MIC pada penelitian ini menggunakan metode *two-fold serial broth microdilution* (CLSI, 2016). Prosedur ini diawali dengan melarutkan masing-masing bakteri hasil subkultur ke dalam 10 mL media *Mueller Hinton Broth* (MHB) pada tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan *vortex*. Kemudian inokulum bakteri dibandingkan dengan larutan *Mc Farland* yang digunakan sebagai standar referensi untuk menyesuaikan kekeruhan suspensi bakteri, standar kekeruhan 0,5 McFarland sesuai dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml bakteri.

Lempeng mikrotiter 96 *well* ditandai dan 100 μ l suspensi bakteri dipindahkan ke dalam mikrotiter 96 *well* dari kolom 3-12 untuk dilakukan pengujian MIC. Kolom 3-12 diisi oleh suspensi bakteri yang sudah ditambahkan ekstrak campuran daun pegagan dan daun baru cina dengan pengenceran dua kali (*two fold dilution*) dari konsentrasi awal seperti, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,625 mg/mL, 0,3125 mg/mL, 0,156 mg/mL, 0,0781 mg/mL, 0,0390 mg/mL, 0,0195 mg/mL, dan 0,0097 mg/mL. Untuk kolom pertama hanya diisi oleh media MHB sebagai kontrol pertumbuhan negatif sedangkan kolom kedua diisi oleh MHB dan inokulum bakteri sebagai kontrol pertumbuhan positif. *Plate microtiter* kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C (Rukayadi *et al.*, 2019).

Minimum Bactericidal Concentration (MBC) merupakan suatu metode yang digunakan untuk mengetahui konsentrasi minimum zat antimikroba yang

mampu membunuh bakteri (Andrews, 2001). Pada pengujian MBC, tiga cawan petri berisi medium MHA ditandai dengan nomor 1-12 untuk tiap bakteri penyebab jerawat. Sebanyak 10 µl kolom hasil MIC dipindahkan pada daerah yang telah ditandai. Cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Rukayadi *et al.*, 2019).

3.4.4.3 *Time Kill Assay*

Metode yang digunakan untuk *Time Kill Assay* merujuk pada Rukayadi *et al.* (2009). Inokulum bakteri (*P. acnes* ATCC 11827, *S. epidermidis* FNCC 0048, dan *S. aureus* FNCC 0047) dibuat dalam 10 mL medium MHB dan dibandingkan dengan larutan *Mc Farland* 1.5×10^{-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×MIC, 1×MIC, 2×MIC, dan 4×MIC. Pengujian ini dilakukan dalam interval waktu 0 jam, 1 jam, 2 jam dan 4 jam. Untuk interval waktu 1 jam, 2 jam dan 4 jam masing-masing microtube dimasukkan ke dalam inkubator 37°C. Sebanyak 10 µl suspensi bakteri ditumbuhkan pada medium MHA. Cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

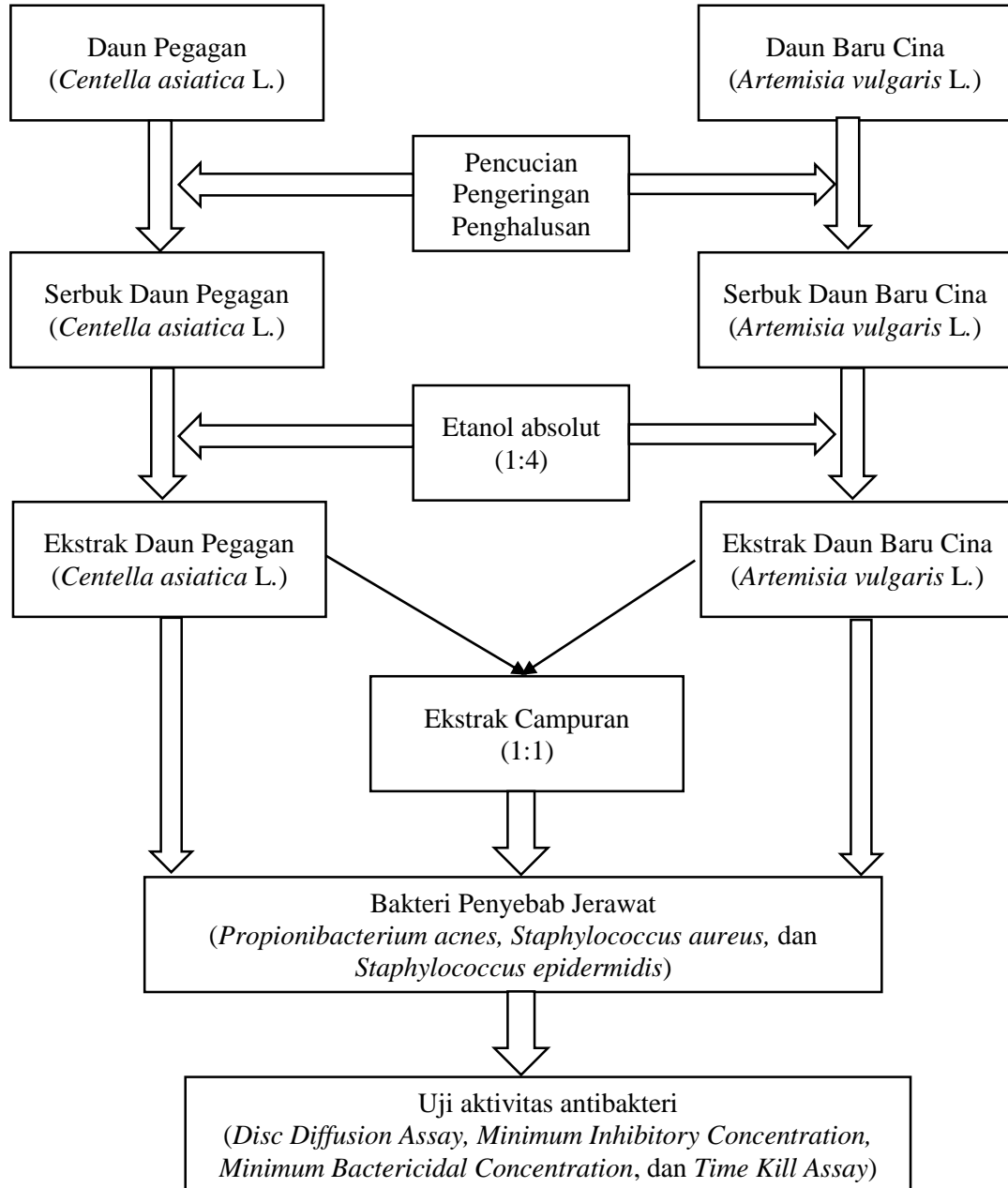
3.5 Analisis Data

Analisis data yang dilakukan dalam penelitian ini menggunakan uji Normalitas dan *Kruskal Wallis* menggunakan aplikasi SPSS untuk melihat signifikansi perbedaan zona hambat yang terbentuk dari masing-masing perlakuan ekstrak dengan CHX pada bakteri uji.

Analisis data dengan uji normalitas yang digunakan dalam penelitian dengan sampel kurang dari 30 adalah *Saphiro-Wilk* yang bertujuan untuk melihat distribusi data selisih diameter zona hambat pada tiap bakteri uji. Pada uji normalitas, apabila signifikansi lebih besar dari 0,05 maka data tersebut terdistribusi normal. Sebaliknya, jika nilai signifikansi kurang dari 0,05 maka data tersebut tidak terdistribusi normal. Apabila terdapat data kurang dari dan lebih dari 0.05 maka data tersebut tidak terdistribusi dengan normal. Kemudian untuk uji *Kruskal-Wallis*, apabila nilai signifikansi lebih kecil dari 0,05 maka data tersebut berbeda signifikan. Sebaliknya, jika nilai signifikansi lebih dari 0,05 maka data tersebut tidak berbeda

signifikan. Analisis statistika yang dilakukan dengan menggunakan data diameter zona hambat hasil uji *Disc Diffusion Assay* (DDA).

Adapun bagan alur dari penelitian ini dapat dilihat pada gambar 3.2.



Gambar 3.2. Bagan Alur Penelitian