

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan yaitu eksperimen. Rancangan penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), Variabel bebas dari penelitian ini yaitu ekstrak etanol bawang putih konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%. variabel terikat dari penelitian ini yaitu pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827. Metode pemeriksaan yang digunakan pada penelitian ini yaitu metode dilusi padat.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi, Jurusan Analis Kesehatan, Politeknik Kesehatan Tanjungkarang. Proses determinasi bawang putih dilakukan di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung dan proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Universitas Lampung. Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei-Juli 2021.

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini yaitu bawang putih (*Allium sativum*) varietas lumbu kuning dengan ciri-ciri kulit luar umbi berwarna putih kekuningan, tiap umbi terdiri dari 10 siung yang letaknya beraturan, ukuran siung dengan panjang 3 cm dan lebar 2 cm yang kemudian dibuat ekstrak dengan pelarut etanol 96% dan dilakukan pengenceran dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%. Pada penelitian ini pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali dengan rumus Federer $(t-1)(n-1) \geq 15$.

D. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Ekstrak etanol bawang putih	Bawang putih varietas lumbu kuning dibuat ekstrak dengan pelarut etanol 96% metode maserasi.	Metode Maserasi	Pengenceran dengan rumus V1.%1 = V2.%2	Ekstrak bawang putih konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%.	Ordinal
bakteri <i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11827	Pertumbuhan koloni bakteri <i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11827 yang dihambat oleh ekstrak etanol bawang putih konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%.	Metode dilusi padat	Jumlah koloni bakteri <i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11827	- Konsentrasi hambat minimum (KHM) -Konsentrasi bunuh minimum (KBM)	Ordinal

E. Pengumpulan Data

1. Prosedur

Prosedur pengumpulan data dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu :

- a. Pembuatan surat izin penelitian dan pemesanan strain bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 ke Laboratorium Universitas Indonesia
- b. Determinasi bawang putih di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung
- c. Pembuatan ekstrak etanol bawang putih di Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Universitas Lampung
- d. Identifikasi dan peremajaan bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827
- e. Pembuatan suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 dan pengenceran bertingkat metode *Standar Plate count* (SPC)
- f. Pengujian antibakteri ekstrak etanol bawang putih terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 dengan metode dilusi padat.

2. Metode Pemeriksaan

Metode pemeriksaan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode dilusi padat. Dengan suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* yang terlebih dulu dilakukan pengenceran menggunakan Standar Plate Count (SPC)

3. Prinsip pemeriksaan

Pengenceran bertingkat bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 yang memiliki koloni antara 30-300 dicampurkan ke dalam ekstrak etanol bawang putih sesuai konsentrasi yang diuji lalu diinokulasi dengan metode *spread plate* pada permukaan media Mueller Hinton Agar (MHA) lalu diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Penentuan nilai KHM dan KBM dilakukan dengan menghitung jumlah koloni *Propionibacterium acnes* pada masing-masing konsentrasi ekstrak etanol bawang putih dengan menggunakan *colony counter*. Konsentrasi ekstrak etanol bawang putih terendah yang mengalami penurunan pertumbuhan koloni bakteri ditentukan sebagai KHM dan konsentrasi ekstrak etanol bawang putih terendah yang tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri ditentukan sebagai KBM.

4. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian yaitu autoclave, tabung reaksi, rak tabung, oven, hotplate, batang pengaduk, petridisk, ose, incubator, lampu spiritus, gelas ukur, elenmeyer, karet penghisap, pipet ukur, mikropipet, penangas air, kain hitam, aluminium foil, evaporator, alat *spreader*, dan *digital colony counter*.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu pelarut etanol 96%, aquadest steril, standar Mac Farland 0,5, NaCl 0,85%, antibiotik Tetrasiklin 200 mg, larutan uji yaitu ekstrak etanol bawang putih dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% dan strain murni *Propionibacterium acnes* ATCC 11827.

c. Media

Media yang digunakan dalam penelitian yaitu media Mueller Hinton Agar, Blood Agar Plate, dan Nutrient Broth.

5. Cara Kerja

a. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian dibersihkan dan dikeringkan terlebih dahulu kemudian dibungkus dengan kertas kopi, dimasukkan dalam oven dan disterilkan pada suhu 160°C selama 1 jam (Soemarno, 2000).

b. Pembuatan Media Mueller Hinton Agar

Media Mueller Hinton Agar (MHA) ditimbang sebanyak 22,1 gram kemudian dimasukan dalam Erlenmeyer dan dilarutkan dalam 650 ml aquadest, ditutup dengan sumbat kapas yang dibungkus alumunium foil, dipanaskan pada hot plate hingga larut, lalu kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm, Media yang telah steril selanjutnya dituang ke dalam cawan petri sebanyak 20 ml, dan ditunggu hingga mengeras.

c. Pembuatan Media Blood Agar Plate

Media Blood Agar Plate (BAP) ditimbang sebanyak 3,7 gram kemudian dimasukan dalam Erlenmeyer dan dilarutkan dalam 100 ml aquadest, ditutup dengan sumbat kapas yang dibungkus alumunium foil, dipanaskan pada hot plate hingga larut, lalu kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm, Media yang telah steril ditunggu hingga suhu 45°C lalu ditambahkan darah selanjutnya dihomogenkan dan dituang ke dalam cawan petri sebanyak 20 ml, dan ditunggu hingga mengeras.

d. Pembuatan Media Nutrient Broth

Media Nutrient Broth ditimbang sebanyak 0,19 gram dan dilarutkan dalam 15 ml aquadest lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer, dan dipanaskan di atas hot plate, kemudian dituangkan ke dalam tabung reaksi 5 ml pada masing-masing tabung, lalu ditutup kapas dan disterilkan dalam autoclave selama 15 menit pada tekanan 1 atm suhu 121°C. Media dapat disimpan di lemari pendingin apabila tidak segera digunakan.

e. Pembuatan Larutan Standar Mac Farland 0,5

Larutan Barium Chloride Dihidrat ($\text{BaCl}_2\text{H}_2\text{O}$) 1% sebanyak 0,5 ml dicampur dengan asam sulfat (H_2SO_4) 1% sebanyak 99,5 ml. Reagen di kocok hingga homogen. Standar kekeruhan ini dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditutup rapat supaya tidak terjadi penguapan. Kekeruhan Standar Mac Farland 0,5 diukur menggunakan alat nefelometer agar benar-benar setara dengan jumlah bakteri sebanyak 1.500 juta/ml. setiap akan digunakan dikocok terlebih dahulu (Soemarno, 2000).

f. Pembuatan NaCl 0,85%

Ditimbang sebanyak 2,10 gram Kristal NaCl kemudian dimasukkan kedalam labu ukur dan ditambahkan 250 ml aquadest lalu dihomogenkan. Larutan NaCl 0,85% dituang kedalam erlenmeyer, lalu ditutup dengan sumbat kapas yang dibungkus aluminium foil kemudian disterilkan dengan autoclave suhu 121°C , tekanan 1 atm selama 15 menit.

g. Pembuatan kontrol positif Tetrasiklin 200 mg atau setara dengan 0,2%

Satu tablet antibiotik tetrasiklin dengan dosis 200 mg dihaluskan menggunakan mortar dan dilarutkan menggunakan etanol sebanyak 100 ml lalu dihomogenkan (Das dan Reynolds, 2014).

h. Pemilihan Bawang Putih

Bawang putih yang akan di ekstraksi adalah bawang putih varietas lumbu kuning dalam kondisi segar, kulit luarnya berwarna putih kekuningan, tidak busuk dan tidak berjamur.

i. Persiapan dan Determinasi Bawang Putih

Tanaman bawang putih diperoleh dari petani bawang putih yang berada di daerah Gisting, Kabupaten Tanggamus, Provinsi Lampung. Kemudian bawang putih tersebut dideterminasi di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung untuk memastikan kebenaran dari tanaman yang digunakan. Dengan cara mencocokkan morfologi yang ada pada bawang putih terhadap kepustakaan dan dibuktikan dibidang Botani Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.

j. Pembuatan Ekstrak Etanol Bawang Putih

1) Pembuatan Simplisia

Bawang putih varietas lumbu kuning dalam kondisi yang segar dipisahkan dari kulit luarnya. Selanjutnya ditimbang sebanyak 1 Kg lalu bawang putih diiris tipis-tipis dan dikeringkan dengan cara ditutup kain hitam dan dijemur dibawah sinar matahari secara tidak langsung. Bawang putih yang telah kering lalu dihaluskan menggunakan *blender* serta diayak sehingga menjadi bentuk serbuk dan disimpan dalam wadah yang kering dan tertutup.

2) Pembuatan Ekstrak Etanol Bawang Putih

Bawang putih yang telah menjadi serbuk simplisia ditimbang sebanyak 500 gram, dimasukkan kedalam wadah lalu ditambahkan etanol 96% sebanyak 1000 ml dan diaduk menggunakan batang pengaduk lalu didiamkan selama 3 hari. Ekstrak disaring dengan penyaring, diperoleh filtrat I, ditampung dalam botol dan ampas I ditambah etanol 96% 1000 mL lagi, diaduk dengan batang pengaduk lalu diamkan selama tiga malam. Setelah itu ekstrak disaring dengan kertas saring sehingga diperoleh filtrat II. Selanjutnya proses yang sama dilakukan hingga diperoleh filtrat III. Seluruh filtrat yang diperoleh dari proses maserasi I, II, III digabung, disaring dan dipekatkan dengan alat evaporator pada suhu 40⁰C untuk menghilangkan pelarut hingga diperoleh ekstrak kental. Kemudian ekstrak diencerkan menjadi konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% menggunakan NaCl 0,85% sebanyak 3 tabung dari masing masing konsentrasi (Manu, 2013).

Rumus Pengenceran :

$$V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$$

Keterangan :

V_1 = Volume larutan uji yang dipipet (ml)

$\%_1$ = Konsentrasi larutan uji (100%)

V_2 = Volume larutan uji dengan NaCl 0,85% (ml)

$\%_2$ = Konsentrasi yang akan dibuat (%)

Tabel 3.2 Pengenceran larutan ekstrak etanol bawang putih

Konsentrasi (%)	Volume ekstrak bawang putih (ml)	Volume NaCl 0,85% (ml)	Volume larutan (ml)
10	0,5	4,5	5
20	1	4	5
30	1,5	3,5	5
40	2	3	5
50	2,5	2,5	5
60	3	2	5
70	3,5	1,5	5
80	4	1	5
90	4,5	0,5	5
100	5	0	5

3) Persiapan bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827a. Peremajaan bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827

Biakan murni bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 diambil menggunakan ose lalu diinokulasi dengan cara digores pada media agar darah dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya bakteri yang tumbuh pada media blood agar plate dapat dilanjutkan untuk keperluan identifikasi atau dapat disimpan.

b. Identifikasi bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827

- 1) Disiapkan alat dan media yang diperlukan
- 2) Diambil koloni terpisah dari media Blood Agar Plate (BAP) lalu diinokulasi pada media TSIA lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam
- 3) Diambil koloni terpisah dari media Blood Agar Plate (BAP) lalu diinokulasi pada media simon citrat lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam
- 4) Diambil koloni terpisah dari media Blood Agar Plate (BAP) lalu diinokulasi pada media SIM lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam
- 5) Diambil koloni terpisah dari media Blood Agar Plate (BAP) lalu diinokulasi pada media media gula gula seperti glukosa, laktosa, maltosa, manitol dan sukrosa lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- 6) Diambil koloni terpisah dari media Blood Agar Plate (BAP) lalu dilakukan uji katalase pada koloni *Propionibacterium acnes* ATCC 11827.
(Hasil dapat dilihat pada lampiran 8)

- c. Pembuatan suspensi bakteri yang setara dengan standar Mac Farland 0,5
Diambil koloni bakteri *Propionibacterium acnes* yang telah diremajakan menggunakan ose lalu dimasukkan ke dalam tabung yang berisi media nutrisi broth dan dihomogenkan. Suspensi bakteri kemudian disamakan kekeruhannya dengan standar Mac Farland 0,5. Jika suspensi terlalu keruh ditambahkan NaCl 0,85% atau jika suspensi terlihat jernih, ditambahkan lagi dengan kuman hingga kekeruhannya sama dengan standar Mac Farland 0,5
- d. Pengenceran bertingkat suspensi *Propionibacterium acnes*
 - 1) Pengenceran dilakukan dengan cara mengambil 1 ml suspensi *Propionibacterium acnes* yang telah disamakan dengan standar Mac Farland 0,5 lalu dicampurkan dengan larutan 9 ml NaCl 0,85% sehingga diperoleh larutan dengan tingkat pengenceran 10^{-1} .
 - 2) Larutan pada tingkat pengenceran 10^{-1} diambil sebanyak 1 ml dan dihomogenkan dengan 9 ml NaCl, sehingga diperoleh larutan dengan tingkat pengenceran 10^{-2} .
 - 3) Dilakukan perlakuan yang sama sampai tingkat pengenceran 10^{-7}
 - 4) Masing-masing pengenceran dipipet sebanyak 1 ml dan dituang pada cawan petri lalu ditambahkan media muller hinton agar dengan suhu sekitar 45°C lalu dihomogenkan membentuk angka 8 dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam
 - 5) Koloni yang tumbuh pada media dihitung menggunakan *colony counter*.
 - 6) Pengenceran *Propionibacterium acnes* yang dipilih yang memiliki jumlah koloni antara 30-300 koloni (Muntalif; dkk, 2018)
6. Uji Antibakteri Metode Dilusi Padat
 - a. Disiapkan 12 tabung reaksi dalam keadaan steril untuk 1 kali pengulangan
 - b. Dipipet masing-masing sebanyak 1 ml ekstrak etanol bawang putih dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% ke dalam tabung reaksi.
 - c. Dipipet masing-masing sebanyak 1 ml kontrol positif tetrasiklin 200 mg dan kontrol negatif aquadest steril lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi.
 - d. Ditambahkan 0,1 ml suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* dari pengenceran 10^{-6} ke dalam tiap-tiap tabung lalu dihomogenkan.

- e. Dipipet sebanyak 0,1 ml campuran dari tiap-tiap tabung dan ditanam pada permukaan media MHA yang telah mengeras dengan metode *spread plate* lalu diinkubasi pada suhu 37⁰C pada inkubator selama 24 jam.
 - f. Dilakukan perhitungan koloni *Propionibacterium acnes* menggunakan *colony counter*.
7. Interpretasi Hasil Uji antibakteri Metode Dilusi Padat
- a. Konsentrasi ekstrak etanol bawang putih terendah yang menunjukkan penurunan jumlah koloni bakteri jika dibandingkan dengan kontrol negatif ditentukan sebagai konsentrasi hambat minimum (KHM)
 - b. Konsentrasi ekstrak etanol bawang putih terendah yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri ditentukan sebagai konsentrasi bunuh minimum (KBM) (Desmara; dkk, 2017).

F. Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diperoleh berupa jumlah koloni bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 disajikan dalam bentuk tabel dan kemudian dilakukan analisa data. Analisa data yang digunakan yaitu analisa data univariat dan analisa data bivariat. Analisa univariat dilakukan dengan menghitung nilai rata-rata jumlah koloni bakteri *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 untuk menentukan nilai KHM dan KBM. Analisa bivariat dilakukan menggunakan alat bantu berupa perangkat *software* SPSS. Analisa bivariat digunakan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang nyata antar setiap perlakuan menggunakan uji statistik *ANOVA (Analysis of variance)*, apabila terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil pada taraf 5% atau tingkat kepercayaan 95%.

G. Etical Clearance

Penelitian ini telah dilakukan uji laik etik oleh KEPK Poltekkes Tanjungkarang dengan nomor registrasi No.128/KEPK-TJK/VI/2021 dan mendapatkan izin laik etik, karena penelitian ini tidak menimbulkan bahaya bagi lingkungan, limbah yang dihasilkan dari proses penelitian dikumpulkan dan dimusnahkan dalam penanganan limbah. Limbah larutan uji ekstrak bawang putih ditangani dengan cara langsung dibuang pada saluran pembuangan. Limbah media plate serta limbah suspensi bakteri

Propionibacterium acnes ATCC 11827 pada tabung dimusnahkan dengan cara perebusan pada suhu 100°C selama 30 menit, limbah suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* yang telah direbus dibuang pada saluran pembuangan, lalu plate dan tabung direbus kembali dengan penambahan detergen, setelah itu air bekas rebusan plate dan tabung dibuang pada saluran pembuangan, plate dan tabung dicuci dengan detergen pada air mengalir.