

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional laboratorik.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Oktober–Desember 2014 bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Ekstraksi bahan dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

C. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan Uji

Bahan penelitian ialah ekstrak ethanol 96% Bawang Putih (*Allium sativum L.*) dengan konsentrasi (50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, dan 0,78%) (Ramadanti, 2008). Bawang putih diekstrak di laboratorium kimia organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

2. Bakteri Uji

Bakteri Uji yang dipergunakan adalah bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* yang berasal dari UPTD Balai Laboratorium Klinik Bandar Lampung.

3. Media Kultur

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Mueller Hinton Broth* dan *Mueller Hinton Agar*, yang merupakan agar standar uji sensitivitas antibiotik (Stephen *et al.*,2004).

4. Alat – alat yang digunakan

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah pipet hisap, rak, pipet ukur, lampu spirtus, mikropipet, ose, tabung reaksi, neraca penimbang, *beaker glass*, *stir plate*, tabung erlemeyer, inkubator, dan autoklaf.

D. Prosedur Penelitian

1. Ekstraksi Bawang Putih

Ekstrak bawang putih sebanyak 300 ml didapatkan dari bawang putih kering dengan berat 2 kg, yang kemudian diekstraksi dengan tehnik maserasi dengan ethanol, yang kemudian dilakukan proses evaporasi (penguapan). Bawang putih yang dipakai dalam penelitian ini ialah bawang putih jenis *Hardneck*, yang sering digunakan untuk memasak (Everhart, 2003). Ekstrak bawang putih didapatkan dari Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Unversitas Lampung. Menurut Dusica pada tahun 2011 dalam jurnal *Physics, Chemistry and Technology*, kandungan *allicin* dalam bawang putih dapat diekstrak dengan pelarut organik bersifat polar, seperti ethanol.

Adapun cara pembuatan ekstrak ethanol bawang putih dalam penelitian ini ialah:

- a. Bawang putih dikupas, dicuci bersih dengan air dan kemudian diiris tipis-tipis.
- b. Irisan bawang putih direndam di dalam ethanol sebanyak 2 Liter selama 24 jam.
- c. Setelah proses perendaman selesai dilakukan selama 24 jam, ekstrak ethanol disaring dengan kertas saring dan dilakukan proses evaporasi untuk memisahkan antara ekstrak dan ethanol. Maka didapatkanlah ekstrak ethanol bawang putih sebanyak 300mL.

2. Sterilisasi Alat

Alat yang digunakan pada penelitian dibersihkan terlebih dahulu kemudian dibungkus dengan kertas, selanjutnya dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah itu dimasukkan oven suhu 100°C selama 1 jam untuk mengeringkan alat.

3. Pembuatan MHA (*Mueller Hinton Agar*)

Timbang 3,8 gram *Muller Hinton Agar* (38 gr/L) dengan komposisi medium (*Beef Infusion* 300 gr, *Casamino acid* 17,5 gr, Agar 17 gr) kemudian dilarutkan dalam 100 ml *aquadest*. Panaskan hingga

mendidih, sterilkan selama 15 menit di autoklaf dengan tekanan udara 1 atm suhu 121°C (Ramadanti, 2008).

4. Identifikasi dan Isolasi *Staphylococcus aureus*.

Sebelum dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji, dilakukan isolasi terlebih dahulu terhadap bakteri uji untuk memastikan bahwa bakteri uji benar-benar bakteri uji yang diinginkan. Hal ini dilakukan dengan cara melakukan inokulasi bakteri yang telah dibeli di UPTD balai laboratorium klinik Bandar Lampung ke dalam agar *Mannitol Salt Agar* (MSA).

Mannitol Salt Agar merupakan agar selektif yang mengandung karbohidrat manitol, NaCl 7,5%, dan indikator pH *phenol red*, yang akan berubah warna menjadi kuning apabila pH berada dibawah angka 6,8 dan tetap berwarna merah apabila pH berada diantara 7,4 sampai 8,4 dan berubah warna menjadi merah muda dengan pH diatas 8,4. Kadar NaClnya yang tinggi mendukung pertumbuhan bakteri *Staphylococci* dan menghambat pertumbuhan organisme lain. Bakteri *Staphylococcus aureus* akan menghasilkan pertumbuhan koloni berwarna kuning apabila diinokulasikan ke dalam MSA, hal ini dikarenakan kemampuannya untuk memfermentasikan manitol dan menurunkan pH. Asam yang dihasilkan dari reaksi fermentasi berdifusi ke dalam medium dan menghasilkan halo berwarna kuning yang mengelilingi koloni *Staphylococcus aureus* yang tumbuh di dalam media MSA (Leboffe, 2008).

Setelah dilakukan inokulasikan di MSA, pada koloni bakteri yang tumbuh dilakukan pewarnaan gram untuk memastikan jenis bakteri dan dari hasilnya dilakukan pembiakan bakteri pada beberapa media agar miring MSA dan Nutrient Agar (NA).

5. Pembuatan Suspensi Bakteri

Biakan bakteri diambil menggunakan ose sebanyak 1-2 ose, dan kemudian disuspensikan kedalam larutan NaCl 0,9 sampai diperoleh kekeruhan yang sesuai dengan standar 0,5 *MacFarland* atau sebanding dengan jumlah bakteri 10^8 (CFU)/ml (Ramadanti, 2008).

6. Pengujian Aktivitas Antimikroba

Aktivitas mikroba diuji dengan menggunakan metode dilusi yang meliputi 2 tahap, yaitu penentuan KHM (Kadar Hambat minimum) dan KBM (Kadar Bunuh Minimum). Konsentrasi ekstrak bawang putih yang digunakan ialah 7 konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, dan 0,78%. Ditambah 1 kelompok kontrol bakteri (K+), dan 1 kelompok kontrol bakteri negatif (K-).

Penelitian ini membagi sampel terhadap 9 kelompok :

- a. Kelompok perlakuan 1 (P1) yaitu 1 ml *Mueller Hinton* cair ditambahkan ekstrak bawang putih dengan konsentrasi sampel 50% dan diberi satu ose suspensi bakteri.
- b. Kelompok perlakuan 2 (P2) yaitu 1 ml *Mueller Hinton* cair ditambah dengan 1 ml ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 25% dan diberi satu ose suspensi bakteri.

- c. Kelompok perlakuan 3 (P3) yaitu 1 ml *Mueller Hinton* cair ditambah dengan 1 ml ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 12,5% dan diberi satu ose suspensi bakteri.
- d. Kelompok perlakuan 4 (P4) yaitu 1 ml *Mueller Hinton* cair ditambah dengan 1 ml ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 6,25%, dan diberi satu ose suspensi bakteri.
- e. Kelompok perlakuan 5 (P5) yaitu 1 ml *Mueller Hinton* cair ditambah dengan 1 ml ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 3,125% dan diberi satu ose suspensi bakteri.
- f. Kelompok perlakuan 6 (P6) yaitu 1 ml *Mueller Hinton* cair ditambah dengan 1 ml ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 1,56% dan kemudian diberi satu ose suspensi bakteri.
- g. Kelompok perlakuan 7 (P7) yaitu 1 ml *Mueller Hinton* cair ditambah dengan 1 ml ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 0,78% dan kemudian diberi satu ose suspensi bakteri.
- h. Kelompok kontrol positif (K+) yaitu 1 ml *Mueller Hinton* cair ditambah dengan 0,1 ml suspensi bakteri dan diberi antibiotik Gentamisin.
- i. Kelompok kontrol negatif (K-) yaitu 1 ml *Mueller Hinton* cair ditambah dengan 1 ml suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*.

Semua tabung tersebut diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam, kemudian diamati dan dibandingkan dengan kontrol positif. Konsentrasi sampel terkecil yang dapat menghambat pertumbuhan

bakteri (ditandai secara visual oleh tiga pengamat) ditentukan sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM) (Garba *et al.*, 2006).

Untuk mengetahui Kadar Bunuh Minimum (KBM), diambil satu ose dari konsentrasi *Mueller Hinton* cair yang telah dinyatakan jernih (memiliki kadar hambat) pada observasi sebelumnya, lalu diinokulasikan pada media *Mueller Hinton* agar dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kadar Bunuh Minimum ditentukan pada konsentrasi terkecil dimana pada media *Mueller Hinton* Agar tidak lagi ditemukan pertumbuhan koloni bakteri (Garba *et al.*, 2006).

Pengujian terhadap masing-masing kelompok uji diatas dibuat secara tripol, yang dimaksud dengan tripol sendiri ialah dilakukan replikasi terhadap satu kelompok ujicoba sebanyak 3 kali.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Ekstrak bawang putih dengan 8 tahap pemberian konsentrasi, yaitu konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56% dan 0,78%.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat untuk penelitian ini tingkat kejernihan secara visual media *Mueller Hinton* cair dan pertumbuhan koloni kuman pada media *Mueller Hinton* Agar.

F. Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Hasil	Cara Ukur	Alat Ukur	Skala
Konsentrasi ekstrak bawang putih	Pemberian ekstrak bawang putih yang dilakukan pada penelitian ini adalah : Kelompok 1 (P1) Ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 50% Kelompok 2 (P2) Ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 25% Kelompok 3 (P3) Ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 12,5% Kelompok 4 (P4) Ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 6,25% Kelompok 5 (P5) Ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 3,125% Kelompok 6 (P5) Ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 1,56% Kelompok 7 (P7) Ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 0,78% Kelompok (K+) 1 ml media <i>Mueller Hinton</i> cair + 1 ose bakteri <i>S. aureus</i> + Gentamisin Kelompok (K-) Media <i>Mueller Hinton</i> cair + 0,1 ml suspensi bakteri <i>S. Aureus</i>	Konsentrasi bertingkat ekstrak ethanol bawang putih	rumus pengenceran $M_1V_1=M_2V_2$	Mikropipet, pot, pipet ukur, tongkat pengaduk	Ordinal
Kadar Hambat	Kadar konsentrasi ekstrak bawang putih yang memiliki daya hambat terhadap bakteri <i>S. aureus</i>	Media <i>Mueller Hinton</i> cair keruh (+) Media <i>Mueller Hinton</i>	Observasi kekeruhan media <i>Mueller Hinton</i> dengan latar	Visual	Ordinal

		cair jernih (-)	belakang kertas hitam		
Kadar Bunuh	Kadar konsentrasi bawang putih yang memiliki daya bunuh terhadap bakteri <i>S. aureus</i>	Ada koloni bakteri tumbuh (+) Tidak ada koloni bakteri tumbuh (-)	Observasi tidak adanya pertumbuh an koloni bakteri <i>S. aureus</i> pada hasil kultur di <i>Mueller Hinton Agar</i>	Visual	Ordinal

G. Analisis Data

Penelitian ini merupakan penelitian yang bersifat observasional, Penjabaran data yang didapatkan dari hasil penelitian akan dipaparkan secara deskriptif, dengan melihat dan menjabarkan konsentrasi terkecil bawang putih yang memiliki efek hambat dan efek bunuh terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

H. Etika Penelitian

Proposal penelitian ini telah diajukan kepada Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, dan telah disetujui dengan nomor surat 2239/ UN26/8/DT/2014.