

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah *true experiment-post test only control group design* yang dilakukan di laboratorium dengan menggunakan metode dilusi agar untuk mengetahui potensi aktivitas antibakteri ekstrak daun juwet (*Syzygium cumini* Linn.) terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*. Sampel diberi perlakuan kemudian diamati pengaruh setelah perlakuan.

#### 4.2 Populasi Dan Sampel

Sampel uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Shigella dysenteriae* ATCC. Bakteri ini diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta yang dibiakkan dalam media agar di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

##### 4.2.1 Pengulangan Sampel

Pengulangan sampel harus dilakukan untuk meningkatkan pengukuran hasil penelitian. Jumlah pengulangan dapat dihitung dengan menggunakan rumus  $p(n-1) \geq 15$  (Kusriningrum, 2008).

$$\left[ \begin{array}{l} p = \text{jumlah perlakuan (jumlah perlakuan dalam penelitian ini sebanyak 5)} \\ n = \text{jumlah pengulangan dan n harus bilangan bulat} \end{array} \right]$$

sehingga,  $p(n-1) \geq 15$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$n \geq 4$$

Jumlah minimal pengulangan yang didapatkan dari perhitungan adalah empat kali pengulangan. Jadi, pada penelitian ini dilakukan empat kali pengulangan untuk tiap kali perlakuan.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu ekstrak daun juwet (*Syzygium cumini* Linn.) dibuat dalam beberapa macam konsentrasi dari hasil eksplorasi dosis awal yaitu 0,2%  $V/V$ ; 0,3%  $V/V$ ; 0,4%  $V/V$ ; 0,5%  $V/V$  dan 0% sebagai kontrol.

#### 4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah jumlah koloni bakteri *Shigella dysenteriae* yang dilihat pada media NAP.

### 4.4 Lokasi Dan Waktu Penelitian

#### 4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Laboratorium Farmakognosi dan Fitoterapi Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

#### 4.4.2 Waktu

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret sampai Mei 2013

## 4.5 Bahan Dan Alat/Instrumen Penelitian

### 4.5.1 Bahan

Bahan yang digunakan adalah serbuk kering daun juwet (*Syzygium cumini* Linn.), bakteri *Shigella dysenteriae* ATCC, etanol 70%, kapas steril, aquades steril, alkohol 96%, media *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), larutan NaCl 0,9%, reagen uji fitokimia

### 4.5.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah wadah maserasi, *rotary evaporator*, kertas saring, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas ukur, kain flanel, sendok kayu, pengaduk kaca, pipet tetes, timbangan, ose, kapas steril, lampu spiritus, cawan porselen, plat tetes, penggaris, inkubator, spektrofotometer

## 4.6 Definisi Istilah/Operasional

- a. Daun juwet yang digunakan pada penelitian ini adalah daun juwet yang berwarna hijau tua, tebal dengan permukaan mengkilap dan halus didapatkan dari UPT Materia Medica bertempat di Jalan Lahor Nomor 87, Kota Batu. Lokasi UPT Materia Medica ini pada ketinggian 875 meter diatas permukaan laut dengan curah hujan 256 mm/bulan, suhu rata-ratanya 23°C (suhu minimal 5°C dan suhu maksimal 30°C) dengan kelembaban sekitar 80 %.
- b. Ekstrak daun juwet adalah sediaan dari hasil maserasi menggunakan etanol 70% sebagai pelarutnya kemudian dievaporasi dengan *vacuum rotary evaporator*.

- c. Remaserasi dilakukan dua kali untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak 100%.
- d. Bakteri *Shigella dysentriae* adalah bakteri ATCC yang didapatkan dari Laboratorium Kesehatan Yogyakarta berasal dari stok EQAM Belgia yang kemudian dikultur dan diidentifikasi.
- e. Uji kepekaan antimikroba metode dilusi agar adalah uji kepekaan secara *in vitro* dengan mencampur ekstrak bahan uji antimikroba dalam beberapa variasi konsentrasi dengan media *Nutrient Agar* kemudian diinokulasikan bakteri uji sejumlah 10 $\mu$ L atau setara dengan 10<sup>4</sup> CFU/mililiter pada permukaan media agar.
- f. Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah jumlah konsentrasi terendah dari zat antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysentriae* pada media agar. Penentuan jumlah bakteri ini secara kualitatif diamati dari nilai KHMnya yang ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri.

#### **4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data**

##### **4.7.1 Pembuatan Ekstrak Daun Juwet**

###### **4.7.1.1 Proses Ekstraksi**

- a. Daun juwet tua dikumpulkan lalu dikering-anginkan pada temperatur ruangan dan diserbuk.
- b. Ditimbang serbuk daun juwet sebanyak 200 gram dengan timbangan analitik
- c. Serbuk daun juwet dimasukkan ke dalam toples kaca dan dicampurkan dengan etanol 70% sebanyak 1 liter, lalu diaduk perlahan agar serbuk

simplisia dan pelarut etanol tercampur rata. Toples kaca A kemudian diberi aluminium foil dan ditutup rapat.

- d. Campuran maserasi awal didiamkan dalam suhu ruang dan disimpan selama 3 x 24 jam
- e. Setelah itu, dilakukan penyaringan menggunakan kain flanel untuk mendapatkan maserat. Hasil maserat kemudian ditampung dalam toples kaca B. Ampas maserasi awal dimasukkan kembali ke toples A.
- f. Maserasi dilakukan berulang sebanyak tiga kali.
- g. Proses remaserasi pertama yakni mencampurkan ampas maserasi awal dengan etanol 70% sebanyak 1 liter dan disimpan selama 1 x 24 jam. Setelah satu hari, hasil maserat disaring kembali menggunakan kain flanel dan ditampung ke dalam toples B. Setelah itu, ulangi prosedur yang sama untuk proses remaserasi kedua.
- h. Hasil maserat yang ditampung di dalam toples kaca B kemudian dievaporasi menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 40°C dengan kecepatan 30 – 35 rpm hingga ekstrak menjadi kental dan pekat.
- i. Hasil ekstrak diletakkan dalam cawan porselen untuk ditimbang dan dicatat beratnya. Selanjutnya, ekstrak kental dikeringkan dengan oven pada suhu  $\pm 40^\circ\text{C}$  selama 5 hari sampai mendapatkan hasil ekstrak yang lebih kental dan pekat.
- j. Setelah itu, hasil ekstrak dituang ke dalam tabung falcon dan disimpan dalam lemari es pada suhu  $-20^\circ\text{C}$ .

#### 4.7.2 Screening Uji Fitokimia

Menurut Gowri *et al.*, 2010, uji fitokimia yang dapat dilakukan antara lain :

#### 4.7.2.1 Uji Fenol (menggunakan tes Ferri Klorida)

Sampel diambil sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan aquades sebanyak 2 mL diikuti dengan beberapa tetes larutan Ferri klorida 10%. Apabila terbentuk warna biru atau hijau maka mengindikasikan adanya senyawa fenol.

#### 4.7.2.2 Uji Flavonoid (metode Wilstater)

Sampel ekstrak dimasukkan dalam *test tube* sebanyak 0,5 mL lalu dilarutkan dengan 5 sampai 10 tetes HCl dan ditambahkan sedikit potongan pita Mg, larutan kemudian dipanaskan selama beberapa menit. Positif mengandung flavonoid jika timbul warna pink-kemerahan atau coklat keruh.

#### 4.7.2.3 Uji Tanin (menggunakan tes $\text{FeCl}_3$ )

Filtrat yang berasal dari 200 mg serbuk simplisia dalam 10 mL aquades panas lalu disaring, kemudian diambil sebanyak 2 mL dan ditambahkan 2 mL  $\text{FeCl}_3$ . Apabila terbentuk endapan berwarna biru kehitaman maka positif mengandung tanin.

#### 4.7.2.4 Uji Alkaloid (Mayer's test)

Sampel dalam suasana asam sebanyak 1 mL ditambahkan dengan beberapa tetes reagen Mayer. Apabila terbentuk endapan berwarna putih atau pucat maka positif mengandung alkaloid.

#### 4.7.2.5 Uji Saponin

Setetes natrium bikarbonat ditambahkan dalam *test tube* yang didalamnya berisi 50 mL sampel ekstrak. Campuran tersebut dikocok kuat selama 3 menit. Apabila

terbentuk busa atau gelembung yang tidak segera hilang dalam beberapa menit maka positif mengandung saponin.

#### 4.7.3 Identifikasi *Shigella dysenteriae*

##### 4.7.3.1 Pewarnaan Gram

- a. Dibuat sediaan (slide), dikeringkan diudara kemudian dilakukan fiksasi
- b. Sediaan dituangi kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit
- c. Sisa bahan pewarna dibuang dan dibilas dengan air
- d. Sediaan dituangi larutan lugol sebagai *mordant*, dibiarkan selama 1 menit
- e. Sisa lugol dibuang lalu dibilas dengan air
- f. Sediaan dituangi alkohol 96% sebagai peluntur selama 1 menit
- g. Sisa alkohol dibuang lalu dibilas dengan air
- h. Sediaan dituangi safranin sebagai pewarna pembanding selama 30 detik
- i. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air
- j. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak imersi kemudian dilihat dibawah mikroskop dengan pembesaran 100 kali

##### 4.7.3.2 Uji Biokimia

Uji biokimia *lysine*, *ornithine*, H<sub>2</sub>S, glukosa, manitol, *xylose*, ONPG, indol, urease, V-P, citrat, TDA yang dilakukan secara lengkap menggunakan *Microbact*.

#### 4.7.4 Preparasi *Original Inoculum* (Pembuatan Larutan Pembenuhan Bakteri) *Shigella dysenteriae*

Prosedur untuk memperoleh inokulum *Shigella dysenteriae* dengan konsentrasi  $10^6$ CFU/mililiter adalah sebagai berikut :

- Sampel *Shigella dysenteriae* yang telah terbukti melalui uji identifikasi diinokulasikan ke dalam *Nutrient Broth* dengan cara mengambil koloni *Shigella dysenteriae* dari media NAP dengan menggunakan ose yang telah disterilkan dengan api bunsen kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi *Nutrient Broth*. Tabung reaksi divortex *ad homogen*, setelah itu diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $37^\circ\text{C}$ .
- Hasil suspensi bakteri yang telah diinkubasi dikeluarkan → diukur menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui *Optical Density* (OD). Nilai OD yang diperoleh dicatat sebagai  $N_1$  untuk rumus perhitungan yang akan dilakukan pada poin (c).
- Mencari volume *Shigella dysenteriae* yang akan diambil dari tabung reaksi yang telah diperoleh nilai ODnya dilakukan dengan perhitungan sebagai berikut (Muliani dan Hala, 2003) :

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$\text{nilai OD} \times V_1 = 0,1 \times V_2$$

$$V_1 = 0,1 \times V_2 / \text{nilai OD}$$

Keterangan:

$V_1$  = Volume bakteri yang akan ditambah dengan pengenceran (volume *Shigella dysenteriae* yang akan diambil dari tabung reaksi).

$N_1$  = nilai OD hasil spektrofotometri (nilai absorbansi suspensi)

$N_2$  = konsentrasi bakteri awal 0,1 yang setara dengan  $10^8$  CFU/mililiter.

$V_2$  = Volume suspensi bakteri uji yang diharapkan (5 mL).

Hasil perhitungan pada penelitian ini yaitu :

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$0,424 \times V_1 = 0,1 \times 5$$

$$V_1 = 1,2 \text{ mL}$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, didapatkan volume bakteri yang akan ditambahkan pengencer ( $V_1$ ) sebanyak 1,2 mL untuk mendapatkan konsentrasi  $10^8$  CFU/mililiter sebanyak 5 mL.

- d. Dari hasil poin (c), diambil volume bakteri sebanyak 1,2 mL dengan mikropipet → dimasukkan ke tabung reaksi steril lain yang masih kosong kemudian ditambahkan larutan NaCl 0,9% steril ad volume tepat 5 mL. Tutup dengan kapas steril lalu divortex *ad homogen*. Diperoleh biakan cair dengan konsentrasi  $1 \times 10^8$  CFU/mililiter.
- e. Selanjutnya, suspensi bakteri dengan konsentrasi  $1 \times 10^8$  CFU/mililiter tersebut diencerkan sampai konsentrasi  $10^6$  CFU/mililiter dengan cara menyiapkan tabung reaksi sebanyak 2 buah lalu pada tabung reaksi pertama dan kedua masing-masing diisi dengan larutan *Nutrient Agar* sebanyak volume 9 mL.
- f. Suspensi *Shigella dysenteriae* konsentrasi  $1 \times 10^8$  CFU/mililiter diambil sebanyak 1 mL dengan mikropipet dari tabung reaksi kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi pertama yang telah diisi 9 mL *Nutrient Agar*. Divortex *ad homogen*. Konsentrasi bakteri sekarang menjadi  $1 \times 10^7$  CFU/mililiter.
- g. Suspensi *Shigella dysenteriae* dengan konsentrasi bakteri  $1 \times 10^7$  CFU/mililiter tersebut lalu diambil sebanyak 1 mL larutan dari tabung

reaksi pertama dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kedua yang telah diisi 9 mL *Nutrient Agar*. Divortex ad homogen. Konsentrasi bakteri sekarang menjadi  $1 \times 10^6$  CFU/mililiter dan siap digunakan untuk penelitian.

#### 4.7.5 Penentuan Konsentrasi Uji Ekstrak Daun Juwet melalui Eksplorasi

##### Dosis

Eksplorasi dosis awal dilakukan pada penelitian ini. Perhitungan untuk mendapatkan konsentrasi yang diujikan pada bakteri, yakni dengan rumus :

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Keterangan :

$N_1$  = konsentrasi ekstrak uji (konsentrasi awal = 50%)

$V_1$  = volume ekstrak yang dibutuhkan

$N_2$  = variasi konsentrasi ekstrak yang diinginkan

$V_2$  = volume media NAP yang dibuat (20 mL)

$$V_{\text{kontrol}} = (0\% \times 20\text{mL}) / 50\% = 0 \text{ mL}$$

$$V_{\text{ekstrak1}} = (0,2\% \times 20\text{mL}) / 50\% = 0,08 \text{ mL}$$

$$V_{\text{ekstrak2}} = (0,3\% \times 20\text{mL}) / 50\% = 0,12 \text{ mL}$$

$$V_{\text{ekstrak3}} = (0,4\% \times 20\text{mL}) / 50\% = 0,16 \text{ mL}$$

$$V_{\text{ekstrak4}} = (0,5\% \times 20\text{mL}) / 50\% = 0,2 \text{ mL}$$

#### 4.7.6 Uji Dilusi Agar

##### 4.7.6.1 Pembuatan Media Dilusi Agar

Media dilusi agar dibuat dengan konsentrasi yang telah ditentukan, caranya adalah sebagai berikut :

- a. Menyiapkan *plate* steril yang diperlukan kemudian diberi label sesuai konsentrasi masing-masing ekstrak uji dan 1 *plate* untuk kontrol.
- b. Diambil sebanyak  $V_{\text{ekstrak}}$  menggunakan mikropipet kemudian dimasukkan ke dalam tabung falcon berskala.
- c. Media NA cair yang masih hangat dimasukkan ke dalam tabung falcon yang sudah berisi ekstrak pada prosedur (b) *ad volume* 20 mL → digoyang-goyang perlahan hingga homogen kemudian dituang ke dalam *plate* steril sesuai label konsentrasinya. Diamkan hingga agar dingin dan memadat.
- d. Ulangi langkah tersebut untuk semua konsentrasi uji.
- e. Setelah *plate* agar memadat, diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.

##### 4.7.6.2 Penanaman Bakteri *Shigella dysenteriae* pada media NAP

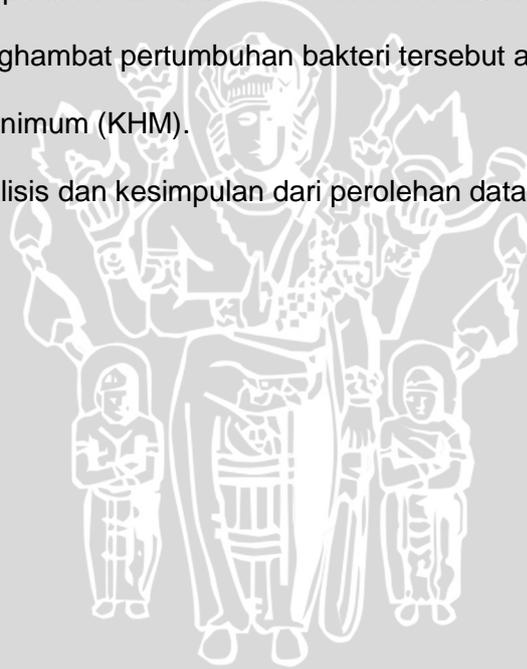
- a. Media dilusi agar yang dibuat sebelumnya dikeluarkan dari dalam inkubator.
- b. *Plate* media agar tersebut dibagi menjadi 4 bagian yang sama besar menggunakan spidol marker, digariskan pada bagian bawah *plate*.
- c. Suspensi bakteri *Shigella dysenteriae* konsentrasi  $10^6$  CFU/mililiter diinokulasi sebanyak 10 $\mu$ L diatas permukaan media agar pada

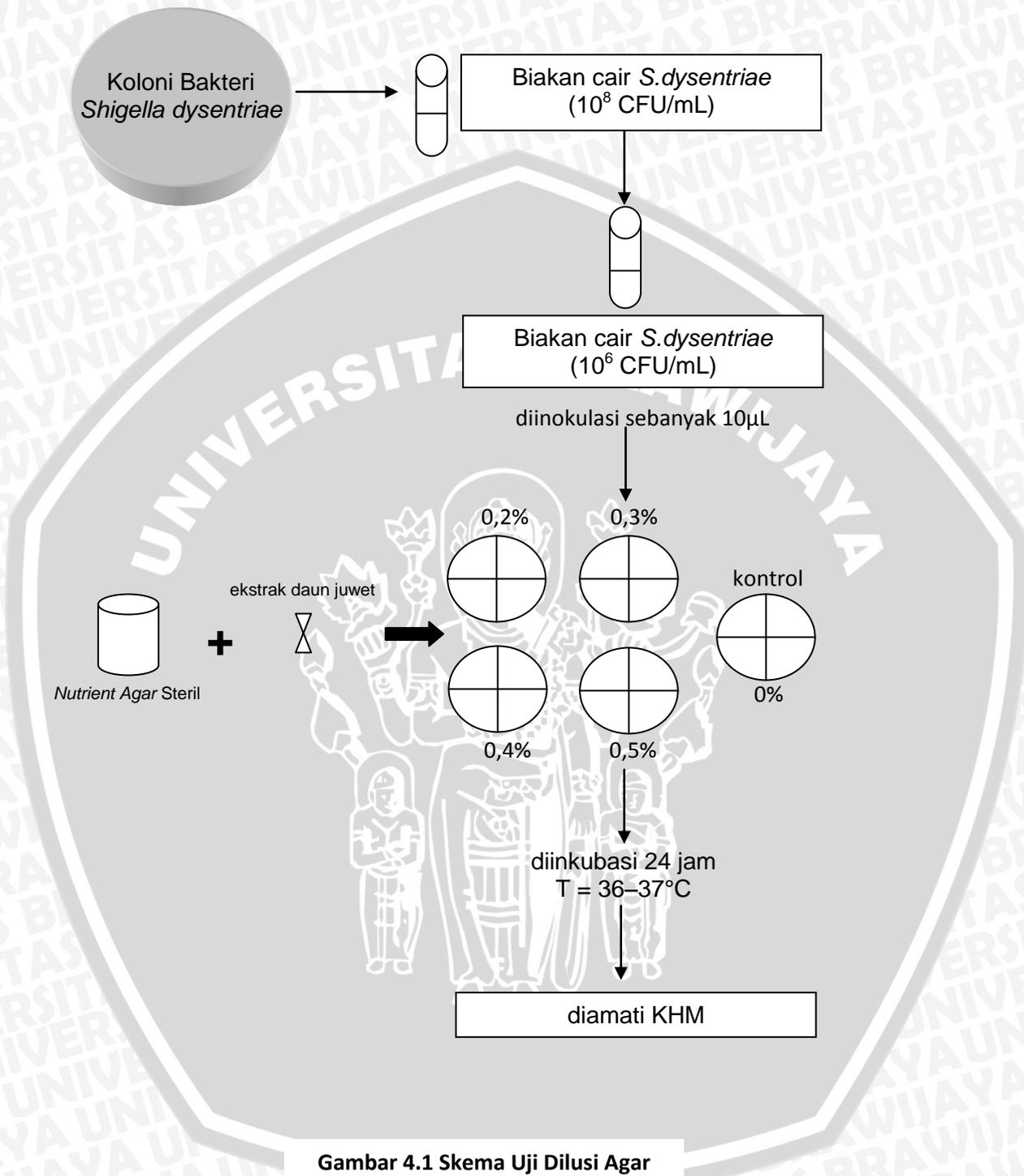
masing-masing bagian *plate*. *Plate* kemudian di diamkan beberapa menit sampai tetesan meresap ke dalam agar.

- d. *Plate* agar dimasukkan ke inkubator, diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.
- e. Diamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri.

#### 4.7.6.3 Penentuan KHM

- a. Diamati secara visual (langsung) pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* pada media NAP. Konsentrasi terendah ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri tersebut adalah nilai Kadar Hambat Minimum (KHM).
- b. Dibuat analisis dan kesimpulan dari perolehan data penelitian.





Gambar 4.1 Skema Uji Dilusi Agar

#### 4.8 Analisis Data

Analisis data menggunakan uji statistik dengan fasilitas SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) 17.0 for Windows. Data KHM disajikan secara kualitatif. Uji statistik jenis *Kruskall-Wallis* dengan taraf kepercayaan sebesar 95% dengan ( $\alpha = 0.05$ ). Hitungan ini digunakan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun juwet (*Syzygium cumini* Linn.) dalam beberapa variasi konsentrasi tertentu terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* pada media NAP kemudian apabila didapatkan  $p < 0.05$  dapat dilanjutkan dengan uji *post-hoc Mann Whitney*. Selanjutnya, dilakukan uji korelasi *Spearman* untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi ekstrak daun juwet terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*.

