

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Pada penelitian ini penulis menggunakan desain penelitian “*True Experimental in Vitro*” dengan rancangan *Post Test Control Only Group Design*, yang bertujuan untuk mengetahui dan membuktikan efek antibakteri dari ekstrak etanol daun turi merah terhadap pertumbuhan koloni *Klebsiella pneumoniae*. Kelompok kontrol adalah isolat bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang tidak diberi larutan ekstrak etanol daun turi merah (konsentrasi 0%) yang disebut sebagai kontrol bakteri dan larutan ekstrak etanol daun turi merah murni (konsentrasi 100%) yang disebut sebagai kontrol bahan. Kelompok perlakuan adalah isolat *Klebsiella pneumoniae* yang diberi larutan ekstrak daun turi merah dengan lima macam konsentrasi.

Uji sensitivitas bakteri yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah dengan metode dilusi tabung. Metode dilusi tabung meliputi dua tahap, yaitu tahap pertama adalah pengujian ekstrak pada media *Nutrient Broth* untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimal) dan tahap uji *streaking* pada NAP (*Nutrient Agar Plate*) untuk menentukan KBM (Kadar Bunuh Minimal).

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi objek penelitian adalah seluruh bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Sedangkan yang menjadi sampel adalah bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang dibiakkan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang diisolasi dari sputum pasien di Rumah Sakit Saiful Anwar Malang.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Juni s.d Juli tahun 2013.

4.4 Pengulangan dan Besar Sampel Penelitian

4.4.1 Pengulangan

Pada penelitian ini, penulis menggunakan 5 macam dosis konsentrasi (15%, 16,25%, 17,5%, 18,75%, dan 20%), 1 kontrol bakteri, dan 1 kontrol bahan. Sehingga jumlah pengulangan yang digunakan dalam penelitian ini, dapat dihitung dengan rumus estimasi pengulangan, sebagai berikut (Notobroto, 2005):

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

$$7(n-1) \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,143 \approx 4$$

Jadi besarnya pengulangan adalah 4 kali.

Keterangan :
 n = Jumlah pengulangan
 p = Jumlah kelompok sampel
 Kelompok sampel terdiri dari :
 - Kelompok kontrol: kontrol bakteri (konsentrasi 0%) dan kontrol bahan (konsentrasi 100%)
 - Kelompok perlakuan (konsentrasi a, b, c, d, dan e)

4.4.2 Besar Sampel

Dari hasil perhitungan didapatkan jumlah pengulangan. Selanjutnya akan ditentukan besar sampel dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Dahlan, 2010):

$$S = p \times n = 7 \times 4 = 28$$

Jadi besar sampel yang akan digunakan sebanyak 28 sampel.

Keterangan :
 S = besar sampel
 p = jumlah perlakuan
 n = jumlah pengulangan

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas (Independen)

Variabel bebas di dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun turi merah, dengan konsentrasi akhir 0%, 15%, 16,5%, 17,5%, 18,25%, 20%, dan 100% yang didapatkan setelah melakukan penelitian pendahuluan.

4.5.2 Variabel Tergantung (Dependen)

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah jumlah koloni bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada media NAP.

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Ekstrak etanol daun turi merah dimana daun turi merah diperoleh dari kebun milik Materia Medika Batu Malang yang telah dikeringkan dalam bentuk serbuk, kemudian diekstraksikan dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% di Laboratorium Kimia Politeknik Negeri Malang.

4.6.2 Isolat *Klebsiella pneumoniae* yang diisolasi dari sputum pasien di RSSA kemudian dibiakkan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan dilakukan identifikasi bakteri terlebih dahulu sebelum digunakan untuk pengujian.

4.6.3 Kontrol bakteri adalah tabung dengan konsentrasi 0% larutan ekstrak etanol daun turi merah.

4.6.4 Kontrol bahan adalah tabung dengan konsentrasi 100% larutan ekstrak etanol daun turi merah.

4.6.5 *Original Inoculum* adalah inokulum bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml yang diinokulasikan pada media agar padat sebelum diinkubasi dan digunakan untuk mencari kategori KBM.

- 4.6.6 Uji sensitivitas bakteri menggunakan metode dilusi tabung (*Tube Dilution Test*) yang terdiri dari 2 tahap, yaitu tahap pertama adalah pengujian ekstrak pada media *Nutrient Broth* untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimal) dan tahap uji *streaking* pada NAP (*Nutrient Agar Plate*) untuk menentukan KBM (Kadar Bunuh Minimal).
- 4.6.7 Kadar Hambat Minimal (KHM) atau MIC (*Minimal Inhibition Concentration*) yaitu kadar terendah dari konsentrasi ekstrak etanol daun turi merah yang mampu menghambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* yang ditandai dengan tidak adanya kekeruhan pada tabung, setelah diinkubasi selama 18-24 jam.
- 4.6.8 Kadar Bunuh Minimal (KBM) atau MBC (*Minimal Bactericidal Concentration*) yaitu kadar terendah dari konsentrasi ekstrak etanol daun turi merah yang mampu membunuh pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* yang ditandai dengan tidak tumbuhnya bakteri pada NAP, atau pertumbuhan koloninya kurang dari 0,1% dari jumlah koloni inokulum awal (*Original Inoculum*) pada media NAP yang telah dilakukan penggosokan sebanyak satu ose.

4.7 Instrumen Penelitian

4.7.1 Alat

Alat- alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah pisau, alat inkubasi, bunsen, blender, *evaporator set*, ose, *colony counter*, timbangan analitik, spektrofotometer, mikroskop, *beaker glass*, vortex, kertas saring, obyek glass, pipet ukur, kapas lidi, tabung reaksi dan *microbact*.

4.7.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk kering daun turi merah, pelarut etanol 96%, biakan murni *Klebsiella pneumoniae*, media padat NAP (*Nutrient Agar Plate*), media cair NB (*Nutrient Broth*), media agar *MacConkey*, NaCl 0,9%, bahan pewarnaan Gram : kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin, minyak emersi, dan kertas saring.

4.8 Prosedur Penelitian

Untuk melakukan penelitian untuk menguji ekstrak etanol daun turi merah sebagai antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae*, terdapat beberapa prosedur penelitian yang akan dilakukan, yaitu mengidentifikasi bakteri, membuat suspensi bakteri, dan melakukan uji sensitivitas.

4.8.1 Identifikasi Bakteri

Melakukan identifikasi terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* melalui pengecatan menggunakan Gram, penanaman bakteri pada media *MacConkey*, dan dilakukan uji biokimia menggunakan *microbact*.

4.8.1.1 Pewarnaan Gram

Prosedur pewarnaan Gram adalah sebagai berikut :

1. Membuat sediaan apusan bakteri pada *object glass*, mengeringkan di udara, kemudian difiksasi
2. Menuangkan kristal violet dan didiamkan selama 1 menit, kemudian dibilas dengan air
3. Menuangkan larutan lugol sebagai *mordant*
4. Menuangkan alkohol 96% sebagai *decolorized* selama 5-10 detik
5. Menuangkan safranin sebagai warna pembanding selama 30 detik

6. Mengeringkan sediaan dengan kertas saring, meneteskan minyak imersi, kemudian dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali (Dzen dkk, 2010).

4.8.1.2 Penanaman Kultur Bakteri pada Media *MacConkey*

1. Spesimen ditanam pada media *selenite broth* yang kemudian diinkubasikan pada inkubator dengan suhu 37°C selama 16-24 jam.
2. Biakan pada *selenite broth* diambil 1 ose, kemudian ditanam pada agar *MacConkey* untuk mendapat koloni terpisah kemudian pada suhu 37°C selama 16-24 jam
3. Apabila warna media berubah menjadi merah, berarti bakteri tersebut dapat memfermentasi glukosa. Tujuan dilakukan kultur bakteri ini adalah untuk melihat morfologi koloni bakteri *Klebsiella pneumoniae*, dan mengetahui apakah bakteri ini dapat memfermentasi laktosa (Santoso dkk, 2011).

4.8.1.3 Uji Biokimia Menggunakan *Microbact*

1. Melakukan tes oksidase untuk menentukan kit yang akan digunakan, karena *Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri Gram negatif, yang akan memberi hasil negatif pada tes oksidase, maka digunakan *microbact 12A/E*.
2. Mengambil 1 sampai 3 koloni bakteri yang dikultur pada NAP dan mencampurkan ke dalam 5ml larutan NaCl 0,9% dengan menggunakan vortex.
3. Membuka segel tempat uji strip.
4. Menambahkan 4 tetes suspensi bakteri pada setiap cekungan.

5. Menambahkan 2 tetes *Mineral Oil* (MB1093A) ke cekungan dengan warna hitam.
6. Diinkubasi pada suhu $\pm 37^{\circ}\text{C}$ selama 18-24 jam.
7. Setelah itu, dikeluarkan dari inkubator dan kemudian menambahkan reagen yang sesuai (pada cekungan ke 8 ditambahkan *indole* 2 tetes, kemudian dibaca setelah 2 menit; pada cekungan ke 10 ditambahkan reagen VP I dan VP II, masing-masing 1 tetes, kemudian dibaca setelah 15-30 menit; pada cekungan ke 12 ditambahkan reagen TDA 1 tetes, kemudian langsung dibaca).
8. Mencatat hasil pada form laporan dan menginterpretasi dengan menggunakan *Microbact*TM (Oxoid, 2012).

4.8.2 Pembuatan Suspensi Bakteri 10^6 CFU/ml

1. Sebelumnya, bersamaan dengan identifikasi bakteri, juga melakukan kultur bakteri pada media *Nutrient Agar Plate* (NAP) Koloni diambil dari lempeng *Nutrient Agar Plate* (NAP) sebanyak 1 ose, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi *Nutrient Broth* sejumlah 9 ml.
2. Tabung reaksi lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
3. Dilakukan pengukuran konsentrasi bakteri menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui OD (*Optical Density*) dari suspensi.
4. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 CFU/ml (sesuai standar McFarland 0,5) yang setara dengan OD=0,1 dilakukan perhitungan sebagai berikut:

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

Keterangan : N_1 = OD Hasil spektrofotometri
 V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer
 N_2 = OD (0,1 setara dengan 10^8 CFU/ml)
 V_2 = Volume suspensi bakteri uji (10 ml)

5. Dari hasil perhitungan tersebut diperoleh volume bakteri (V_1) yang akan ditambah pengencer berupa larutan fisiologis NaCl 0,9% untuk mendapatkan konsentrasi 10^8 CFU/ml sebanyak 10 ml.
6. Menyiapkan dua tabung reaksi yang masing-masing diisi larutan fisiologis NaCl 0,9%.
7. Dari konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ml dilakukan pengenceran dengan menambahkan 1 ml perbenihan (10^8 CFU/ml) ke dalam 9 ml *Nutrient Broth* tabung pertama untuk mendapatkan konsentrasi sebesar 10^7 CFU/ml.
8. Kemudian dilakukan pengenceran lagi dengan mengambil 1 ml perbenihan cair dari tabung pertama tadi (10^7) untuk ditambahkan pada 9 ml *Nutrient Broth* tabung kedua sehingga akhirnya didapatkan konsentrasi bakteri yang diinginkan yaitu sebesar 10^6 CFU/ml yang berarti suspensi bakteri telah didapatkan dan siap digunakan untuk penelitian (Santoso dkk, 2011).

4.8.3 Melakukan Uji Sensitivitas Antibakteri

1. Menyiapkan dan memberi label 1, 2, 3, 4, 5, 6, dan 7 pada ketujuh tabung steril.
2. Menyediakan aquades dan suspensi bakteri uji.
3. Menyediakan ekstrak etanol daun turi merah.
4. Untuk pengujian efek antibakteri diberi tanda dan dibuat larutan pada tabung 1 sampai dengan tabung 7. Sehingga, masing-masing tabung berisi :

Tabung 1: merupakan kontrol bakteri, yaitu ekstrak etanol daun turi merah dengan kadar 0 % atau tanpa ekstrak.

Tabung 2: untuk kadar ekstrak etanol daun turi merah dengan kadar 30% sebanyak 0,3ml ekstrak + 0,7ml aquades

Tabung 3: untuk kadar ekstrak etanol daun turi merah dengan kadar 32,5% sebanyak 0,325ml ekstrak + 0,675ml aquades

Tabung 4: untuk kadar ekstrak etanol daun turi merah dengan kadar 35% sebanyak 0,35ml ekstrak + 0,65ml aquades

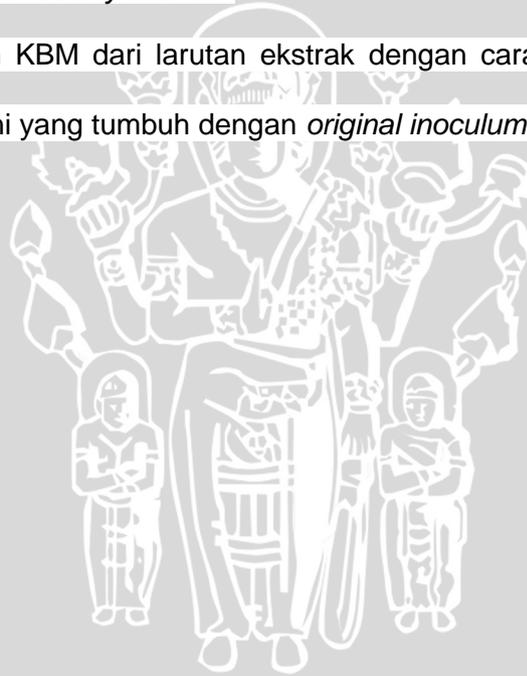
Tabung 5: untuk kadar ekstrak etanol daun turi merah dengan kadar 37,5% sebanyak 0,375ml ekstrak + 0,625ml aquades

Tabung 6: untuk kadar ekstrak etanol daun turi merah dengan kadar 40% sebanyak 0,4ml ekstrak + 0,6ml aquades

Tabung 7: merupakan kontrol bahan, yaitu ekstrak etanol daun turi merah dengan kadar 100 % sebanyak 2ml ekstrak

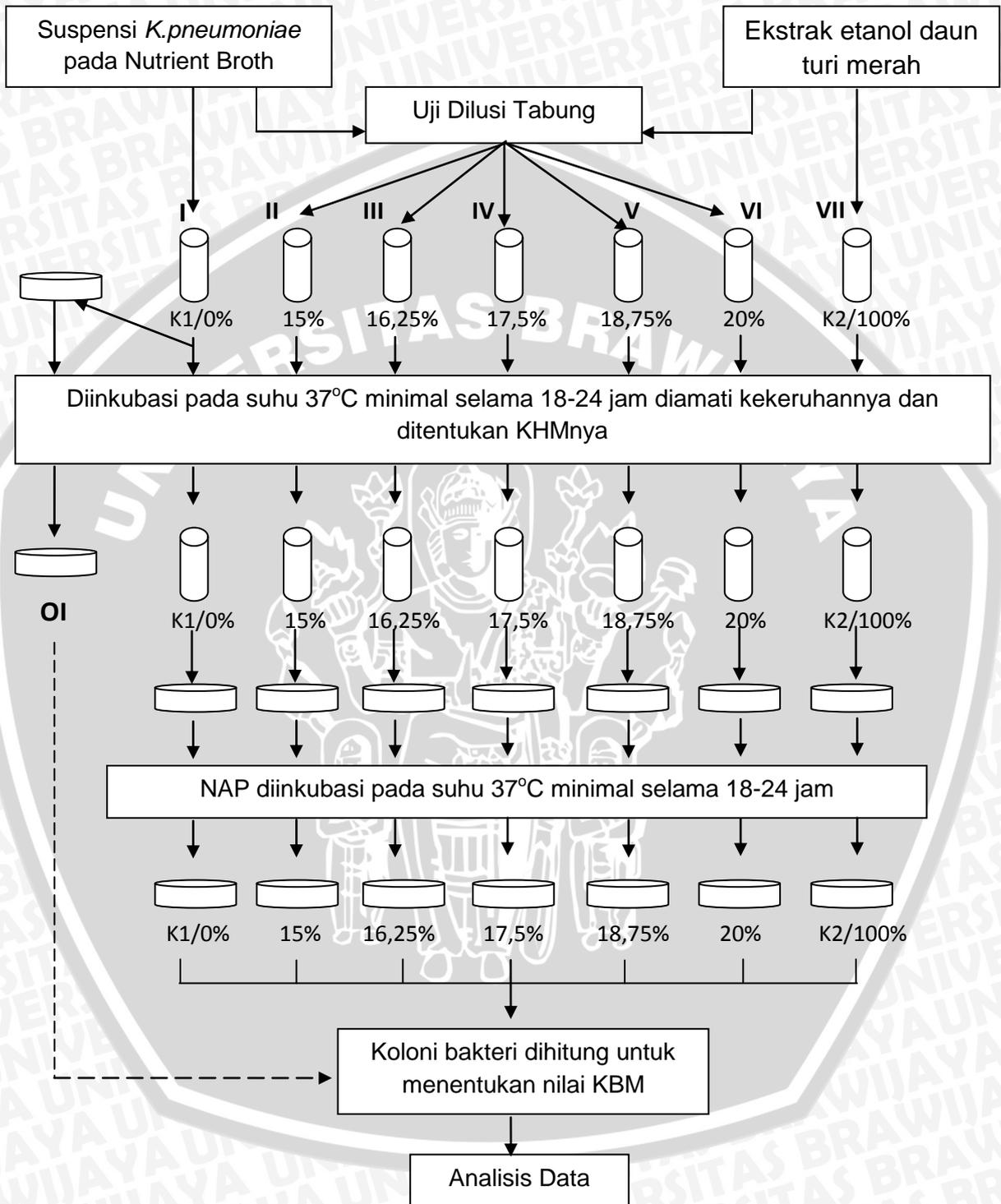
5. Memasukkan suspensi bakteri *Klebsiella pneumoniae* (konsentrasi 10^6 CFU/ml) sebanyak 2 ml ke dalam tabung 1. Kemudian memasukkan masing-masing 1 ml ke dalam tabung 2, 3, 4, 5, dan 6. Pada tabung 7 tidak diberi suspensi bakteri
6. Sehingga konsentrasi bahan uji dalam tabung 1,2, 3, 4, 5, 6, dan 7 menjadi 0%, 15%, 16,25%, 17,5%, 18,75%, 20%, dan 100%
7. Membuat *original inoculum* dengan cara *streaking* larutan bakteri murni pada NB yang diambil dari kontrol bakteri sebanyak 1 ose pada media NAP.
8. Tabung 1 sampai dengan tabung 7 beserta *original inoculum* diinkubasi selama 18-24 jam di dalam inkubator pada suhu 37°C.

9. Setelah diinkubasi, mengamati tingkat kekeruhan pada tabung 2 sampai tabung 6 dibandingkan dengan kontrol bakteri dan kontrol bahan untuk menentukan KHM. Sedangkan *original inoculum* yang telah diinkubasi, dihitung koloninya menggunakan *colony counter*.
10. Pada masing-masing tabung diambil 1 ose dan dilakukan *streaking* pada media NAP.
11. Media NAP diinkubasi selama 18-24 jam di dalam inkubator pada suhu 37°C.
12. Setelah diinkubasi, koloni yang tumbuh pada media NAP dihitung menggunakan *colony counter*.
13. Menentukan KBM dari larutan ekstrak dengan cara membandingkan jumlah koloni yang tumbuh dengan *original inoculum*.



4.9 Rancangan Operasional Penelitian

4.9.1 Kerangka Penelitian



Gambar 4.1 Kerangka Penelitian Uji Ekstrak Etanol Daun Turi Merah terhadap *Klebsiella pneumoniae*

Keterangan : K1 = Kontrol Bakteri K2 = Kontrol Bahan
 OI = Original Inoculum NAP = Nutrient Agar Plate



4.9.2 Alur Kerja Penelitian

Hari ke-1

Melakukan perbenihan bakteri *Klebsiella pneumoniae*

Koloni diambil dari lempeng *Nutrient Agar Plate* (NAP) sebanyak 1 ose, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi *Nutrient Broth* sejumlah 9 ml.



Diinkubasi ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam

Hari ke-2

Melakukan pembuatan suspensi bakteri 10^6 CFU/ml

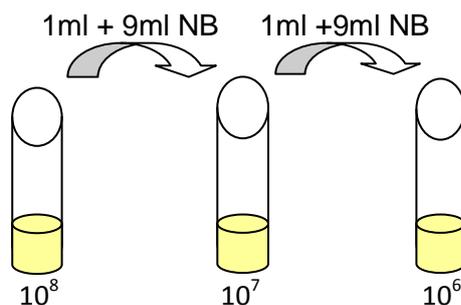
Penghitungan *Optical Density* suspensi bakteri uji dengan menggunakan spektrofotometri untuk menentukan volume suspensi yang akan ditambah oleh pengencer berupa NaCl 0,9% sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^8 CFU/ml.



Melakukan pengenceran secara serial suspensi bakteri uji sebesar 100 kali ke dalam media NB, agar didapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10^6 CFU/ml



Suspensi bakteri uji dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml ini yang akan dilakukan pengujian



Melakukan Pembuatan *Original Inoculum* (OI)

Pada suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml, diambil 1 ose, kemudian distreaking pada media *Nutrient Agar Plate* (NAP)



Setelah distreaking, kemudian diinkubasi ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam

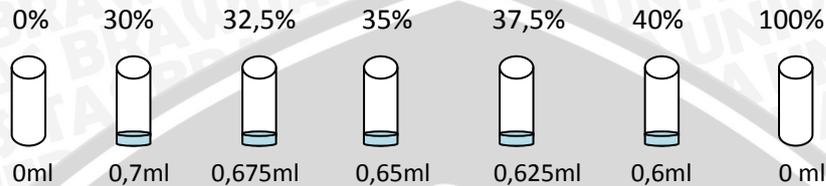


Setelah diinkubasi selama 18-24 jam, kemudian dihitung jumlah koloninya

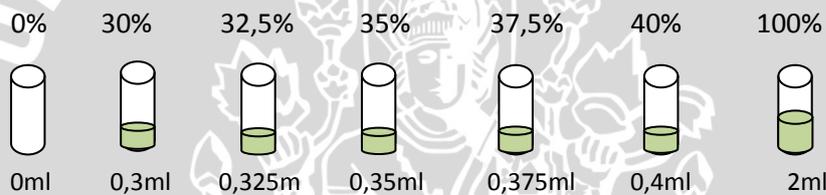
Melakukan Uji Sensitivitas Bakteri dengan Metode Dilusi Tabung

Untuk mendapatkan konsentrasi akhir ekstrak 0%, 15%, 16,25%, 17,5%, 18,75%, 20%, dan 100% dilakukan langkah-langkah sebagai berikut:

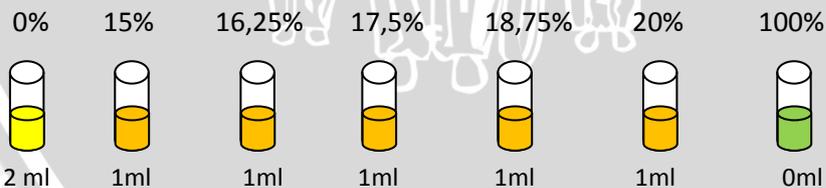
Masing-masing tabung diisi aquades sesuai dengan konsentrasi ekstraknya



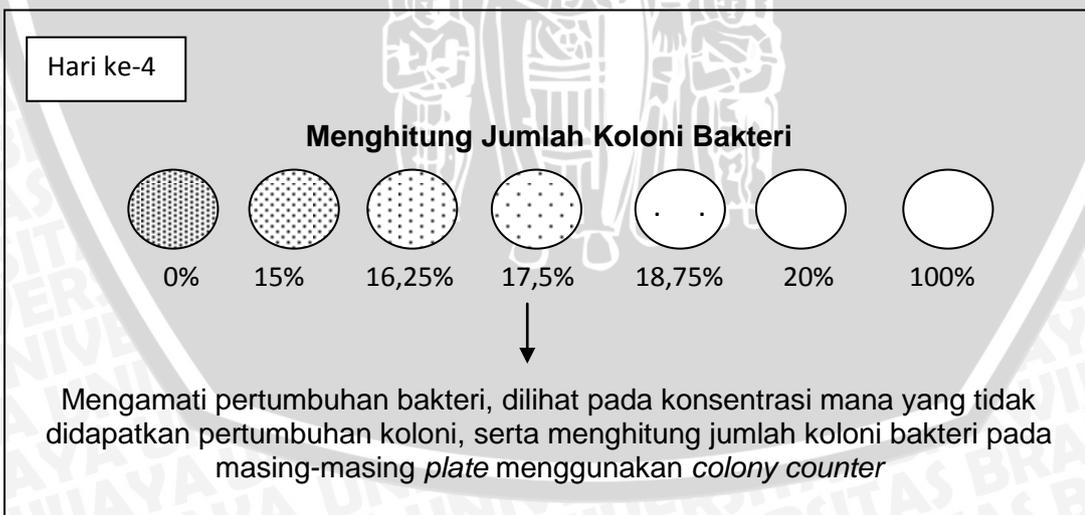
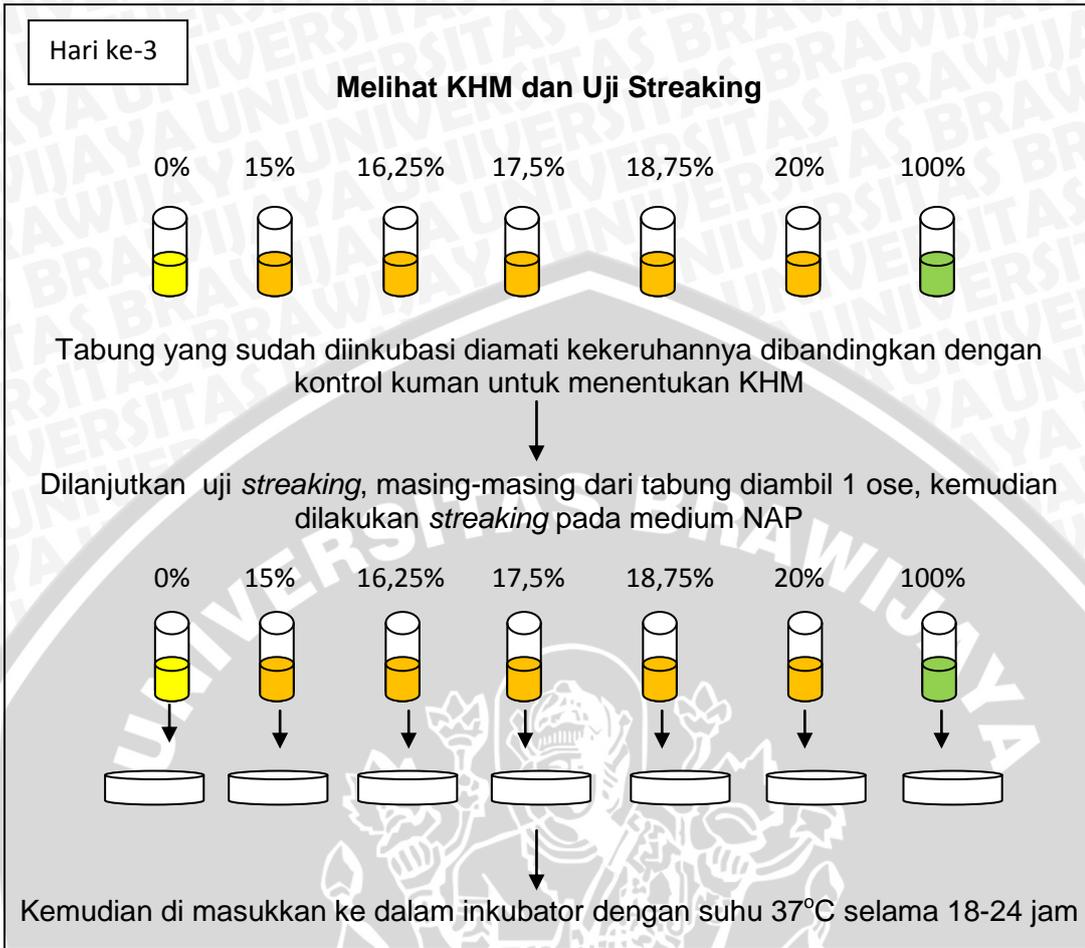
Kemudian ditambah dengan ekstrak etanol daun turi merah sesuai dengan konsentrasinya



Kemudian divortex, lalu masing-masing tabung ditambahkan 1 ml bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml, kecuali pada tabung 0% ekstrak diisi 2 ml bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml dan pada tabung 100% tidak diisi bakteri.



Setelah itu, divortex lagi, kemudian dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam



4.10 Metode Pengumpulan Data

Data secara primer diperoleh melalui hasil penelitian yang dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Cara kualitatif untuk menentukan KHM, yaitu berupa mengamati perbedaan tingkat kekeruhan pada tabung dan membandingkannya dengan kontrol bakteri. Sedangkan cara kuantitatif untuk menentukan KBM, yaitu menghitung jumlah koloni bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada medium NAP dengan *colony counter*.

4.11 Analisis Data

Data KHM dan KBM yang akan diperoleh dari penelitian ini akan disajikan secara kualitatif dan kuantitatif. Pada penelitian ini, yang akan dilakukan analisis statistik yaitu pada KBM yang berupa data kuantitatif. Data pertumbuhan koloni akan diperoleh berdasarkan konsentrasi ekstrak etanol daun turi merah dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri pada tiap konsentrasi, kemudian data akan diolah menggunakan analisis statistik parametrik dengan taraf kepercayaan 96% ($p=0,05$), menggunakan *software SPSS for Windows* versi 18. Dalam penelitian ini akan digunakan uji *one-way ANOVA*, karena data yang digunakan adalah data numerik yang memiliki satu variabel dependen (jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae*) dan satu variabel independen dengan beberapa kelompok dengan satu faktor pembeda (konsentrasi ekstrak etanol daun turi merah) beserta alternatifnya menggunakan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis*. *One-way ANOVA* digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara konsentrasi ekstrak daun turi merah dengan pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*.

Metode *one-way ANOVA* dapat digunakan apabila memenuhi syarat uji parametrik sebagai berikut (Dahlan,2010):

1. Terdapat lebih dari dua kelompok atau yang tidak berpasangan.

2. Distribusi data normal ($p > 0,05$) yang dapat diketahui dari uji normalitas (*Kolmogrov-Smirnov Goodness of Fit Test*). Apabila distribusi data tidak normal, maka diupayakan untuk melakukan transformasi data supaya distribusi data menjadi normal.
3. Varian data sama atau homogen ($p > 0,05$) yang dapat diketahui dari uji homogenitas *Levene* (*Levene Test Homogeneity of Variance*). Apabila varian data tidak homogen, maka diupayakan untuk melakukan transformasi data supaya varian data sama atau homogen.
4. Apabila data hasil transformasi tidak terdistribusi normal atau varian data tetap tidak sama, maka dapat digunakan uji *Kruskal-Wallis*.

Untuk mengetahui konsentrasi ekstrak etanol daun turi merah mana saja yang menyebabkan jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* cenderung tidak berbeda atau secara nyata berbeda, dapat digunakan uji *Post-Hoc* atau *Tukey test* untuk data yang menggunakan uji *One-way ANOVA*, dan uji *Mann-Whitney* untuk data yang menggunakan uji *Kruskal-Wallis*. Perbedaan tersebut dikatakan bermakna apabila didapatkan nilai signifikansi kurang dari 0,05 (Dahlan, 2010).

Untuk mengetahui kekuatan hubungan pemberian ekstrak etanol daun turi merah terhadap jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae*, dapat digunakan uji korelasi *Pearson* dengan alternatif berupa uji korelasi *Spearman* apabila syarat uji parametrik tidak terpenuhi. Dari uji korelasi ini dapat diketahui besarnya perbedaan secara kualitatif kelompok yang berbeda secara nyata atau bermakna, yang sebelumnya telah diketahui dari uji *Tukey* atau uji *Mann-Whitney* (Dahlan, 2010).

Selanjutnya dilakukan uji regresi linear, yang digunakan untuk mengetahui besarnya pengaruh pemberian ekstrak etanol daun turi merah terhadap jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* (Dahlan, 2010).