

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental *post control group design* dengan menggunakan metode dilusi agar untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica*) sebagai anti-mikroba terhadap *Salmonella* Typhimurium.

4.2. Sampel Penelitian

Pada penelitian ini digunakan sampel berupa bakteri *Salmonella* Typhimurium dengan kepadatan 10^4 CFU/ml yang didapatkan dari stok milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.3. Estimasi Jumlah Pengulangan Sampel

Cara pengulangannya adalah dengan rumus (Lukito, 1998):

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

Keterangan n=jumlah pengulangan

p=jumlah perlakuan (jumlah isolat+jumlah konsentrasi)

Penelitian ini menggunakan 5 konsentrasi (2%, 3%, 4%, 5% dan 6%) dari ekstrak etanol rimpang kunyit dan 1 Kontrol Kuman (KK) *Salmonella* Typhimu

rium tanpa diberi ekstrak rimpang kunyit ($p=5+1=6$), didapatkan jumlah pengulangan sampel:

$$6(n-1) \geq 15$$

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

Jadi jumlah pengulangan sampel pada penelitian ini adalah minimal 4 kali pengulangan (1 sampel diulang minimal sebanyak 4 kali).

4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Februari–April 2013.

4.5. Variabel Penelitian

4.5.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol rimpang kunyit dengan konsentrasi 2%, 3%, 4%, 5%, dan 6%. Konsentrasi tersebut diperoleh melalui eksplorasi (penelitian pendahuluan). Pada penelitian eksplorasi digunakan konsentrasi 1% dan 5%, dari penelitian tersebut didapatkan hasil koloni tumbuh tebal pada konsentrasi 1% dan koloni tumbuh sangat tipis pada konsentrasi 5%. Oleh karena itu, peneliti menggunakan rentang konsentrasi sampai 6% dengan dugaan bahwa bakteri akan mati pada konsentrasi tersebut.

4.5.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung yang akan diamati dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Salmonella* Typhimurium pada media agar padat untuk menentukan KHM.

4.6. Definisi Operasional

- Rimpang kunyit yang digunakan adalah rimpang kunyit dalam bentuk serbuk yang dibeli di Materia Medika kota Batu Malang.
- Ekstrak etanol rimpang kunyit adalah kadar atau ekstrak yang dibuat dari serbuk rimpang kunyit yang telah dikeringkan, setelah itu dilakukan ekstraksi dingin (maserasi) dengan menggunakan etanol 96%.
- Bakteri *Salmonella* Typhimurium adalah isolate yang didapatkan dari stok milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- Kadar Hambat Minimal (KHM) atau *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) yaitu konsentrasi terendah dari antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan metode dilusi agar yang ditandai dengan pertumbuhan koloni kurang dari sama dengan 2 (Andrews, 2001).
- Hasil penelitian untuk KHM dinyatakan dalam bentuk skoring, yaitu +4, +3, +2, +1, 0 yang berarti +4 adalah koloni tumbuh tebal dan tidak terhitung, +3 adalah koloni tumbuh agak tebal dan tidak terhitung, +2 adalah koloni tumbuh tipis dan tidak terhitung, +1 adalah koloni tumbuh sangat tipis dan tidak terhitung, dan 0 berarti tidak ada pertumbuhan bakteri (Hendriksen, 2003).

4.7. Bahan dan Alat

Bahan:

- Rimpang kunyit (sediaan serbuk)
- Etanol 96%
- Aquadest steril
- Biakan murni *Salmonella* Typhimurium dengan kepadatan 10^4 CFU/ml
- NaCl
- *Nutrient agar*
- *Bismuth sulfit agar* (BSA)
- *MacConkey agar*
- Nutrient Agar Plate (NAP)
- *Triple Sugar Iron* (TSI) agar
- Indole
- Methyl red
- Preparat Voges Proskauer
- Citrate
- Urease
- Bahan pewarnaan Gram : Kristal violet, Lugol, Alkohol 96%, Safranin

Alat:

- | | |
|-------------------|-----------------|
| • Neraca Analitik | • Objek glass |
| • Pisau | • Minyak emersi |
| • Erlenmeyer | • Mikroskop |
| • Kertas saring | • Bunsen |
| • Saringan | • Korek api |

- Klem dan statis
- Labu ekstraksi evaporasi
- Labu destilasi etanol
- Rotary evaporator
- Selang *water pump*
- *Water bath*
- Corong pisah
- Tabung reaksi
- Stiker label
- Cawan petri/*plate*
- Inkubator
- Spektrofotometri
- Vortex
- Pipet ukur
- *Colony counter*
- Ose

4.8. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian meliputi pembuatan ekstrak etanol rimpang kunyit, identifikasi bakteri uji (*Salmonella Typhimurium*), persiapan suspensi uji *Salmonella Typhimurium* dan uji antimikroba ekstrak etanol rimpang kunyit.

4.8.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit

Pembuatan ekstrak etanol rimpang kunyit dimulai dengan persiapan sampel serbuk rimpang kunyit, dilanjutkan dengan pembuatan sediaan ekstrak etanol rimpang kunyit yang terdiri atas proses ekstraksi dan evaporasi (Stangarfin *et al*, 2005 dalam Nurhayati *et al.*, 2008).

4.8.1.1 Persiapan sampel Serbuk Rimpang Kunyit

- a. Rimpang kunyit yang masih segar dicuci dengan air untuk menghilangkan debu, tanah, atau kotoran yang melekat.
- b. Rimpang kunyit yang telah dibersihkan kemudian dirajang tipis-tipis.
- c. Rimpang kunyit yang sudah dirajang kemudian dikeringkan pada tempat yang tidak secara langsung terkena sinar matahari dengan cara diangin-

inginkan supaya terdapat sirkulasi udara yang baik. Pengeringan ini bertujuan untuk memperoleh bahan tanaman yang tidak mudah rusak. Proses pengeringan selesai apabila rimpang telah kering.

- d. Rimpang kunyit yang telah kering kemudian diblender sehingga diperoleh serbuk yang siap untuk diekstraksi.

4.8.1.2 Pembuatan Sediaan Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit

Proses ekstraksi :

Serbuk rimpang kunyit kemudian dimaserasi (direndam) dengan etanol 96% yaitu 200g/1000ml (Balbi-Pena *et al*, 2006) kemudian diaduk dan dishaker minimal 24 jam.

Proses ekstraksi ini dilakukan sampai hasil ekstraksi jernih. Kemudian hasil ekstraksi siap untuk dievaporasi.

Proses evaporasi

- a. Serbuk rimpang kunyit yang telah direndam kemudian disaring dengan kertas saring Whatman No. 1, lalu dimasukkan dalam labu evaporasi 1 liter.
- b. Labu evaporasi dipasang pada evaporator.
- c. *Water bath* diisi air sampai penuh.
- d. Semua rangkaian alat dipasang, termasuk *rotary evaporator* pemanas *water bath* (diatur sampai suhu 78,5°C, sesuai dengan titik didih etanol), lalu disambungkan dengan aliran listrik.
- e. Larutan etanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
- f. Ditunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5$ -2 jam untuk 1 labu).

- g. Hasil yang diperoleh adalah ekstrak murni rimpang kunyit berupa pasta yang disimpan dalam botol gelap pada suhu 4°C.

4.8.2 Identifikasi *Salmonella Typhimurium*

4.8.2.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram merupakan metode pewarnaan untuk identifikasi bakteri gram positif atau negatif. *Salmonella Typhimurium* termasuk di dalam family *Enterobacteriaceae* yang bersifat gram negatif.

Prosedur pewarnaan :

- *Object glass* dibersihkan dengan kapas steril, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak. Setelah itu, *object glass* dibiarkan dingin.
- Panaskan ose dengan menggunakan bunsen hingga ose berpijar.
- Ambil satu tetes aquades steril atau larutan saline dengan menggunakan ose, teteskan *object glass*.
- Panaskan kembali ose dengan menggunakan bunsen hingga ose berpijar. Ambil satu koloni *Salmonella Typhimurium* yang tumbuh pada medium padat kemudian disuspensikan pada satu tetes aquades steril atau larutan saline yang sudah diteteskan terlebih dahulu pada *object glass*. Hapusan sebaiknya dibuat tipis.
- Hapusan dibiarkan kering di udara. Setelah kering, hapusan difiksasi dengan cara melewatkan sediaan sebanyak 3x di atas api. Sediaan siap diwarnai.
- Sediaan dituangi Kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit kemudian sisa bahan pewarna dibuang dan dibilas dengan air.

- Sediaan dituangi larutan lugol sebagai *mordant*, dibiarkan selama 1 menit kemudian sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dituangi larutan 96% sebagai peluntur selama 5-10 detik kemudian sisa alcohol dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dituangi safranin sebagai warna pembanding selama 30 detik kemudian sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak emersi dan dilihat dibawah mikroskop dengan lensa objektif pembesaran 100x.
- Hasil positif : bakteri *Salmonella* Typhimurium berbentuk batang dan tercat merah (Gram negatif).

4.8.2.2 Medium Bismuth Sulfite Agar

Medium *Bismuth Sulfite Agar* (BSA) adalah medium selektif yang digunakan untuk isolasi dari bakteri *Enterobacteriaceae* terutama *Salmonella*. Dalam medium ini terdapat ferrosulfat dan bismuth sulfid sebagai indikator. Kedua kandungan tersebut akan bereaksi terhadap H₂S yang dihasilkan oleh *Salmonella*.

Prosedur :

- Dilakukan inokulasi bakteri *Salmonella* Typhimurium dengan metode *streaking* pada medium BSA.
- Diinkubasi pada *inkubator* dengan suhu 37°C selama 24-48 jam dan diamati hasilnya.
- Hasil positif : reaksi antara ferrosulfat, bismuth sulfid dan H₂S akan menimbulkan koloni bakteri *Salmonella* Typhimurium yang berwarna hitam (*black jet colony*) dan memiliki *bright sheen*.

4.8.2.3 MacConkey Agar

MacConkey agar adalah medium untuk mengisolasi bakteri negatif di usus serta merupakan medium diferensiasi yang membedakan antara bakteri gram negatif yang memfermentasi laktosa dari yang tidak memfermentasikan laktosa. Komponen utamanya adalah *peptone base* dan laktosa. Bakteri yang memfermentasikan laktosa akan menghasilkan koloni berwarna merah muda sedangkan bakteri yang tidak memfermentasikan laktosa akan menghasilkan koloni yang *colorless* atau berwarna kuning pucat.

Prosedurnya :

- Dilakukan inokulasi bakteri *Salmonella Typhimurium* dengan metode streaking pada medium *MacConkey* agar.
- Diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati hasilnya.
- Hasil positif : koloni bakteri *Salmonella Typhimurium* akan muncul *colorless* atau kuning pucat.

4.8.2.4 Triple Sugar Iron (TSI) Agar Slant

Medium TSI agar slant mengandung 3 macam gula yaitu glukosa, laktosa dan sukrosa, serta fenol merah sebagai indikator dan FeSO₄. Konsentrasi glukosa 1:10 dari konsentrasi laktosa dan sukrosa, sehingga dapat dideteksi apabila terdapat fermentasi terhadap glukosa saja.

Prosedurnya :

- Dengan menggunakan ose lurus, kuman ditanam dengan cara menusuk sampai dekat dasar tabung, kemudian menggoreskan ose tersebut secara zig-zag pada permukaan media.
- Tabung tidak boleh ditutup rapat.

- Kemudian diinkubasi di dalam *inkubator* dengan suhu 37°C dalam waktu 18-24 jam.
- Hasil positif : *Salmonella Typhimurium* memfermentasi glukosa sehingga terbentuk dasar (butt) asam (kuning) dan cekungan (slant) alkali (merah) pada TSI agar atau dapat dituliskan Alk/As. Pengamatan atas produksi gas dan H₂S positif (berwarna kehitaman).

4.8.2.5 Tes IMVIC

Tes IMVIC adalah tes biokimia yang digunakan untuk membedakan bakteri-bakteri dari famili *Enterobacteriaceae*. Tes IMVIC ini meliputi tes Indol, tes *Methyl Red*, tes *Voges-Proskauer*, tes Sitrat, tes motilitas dan tes urease.

Prosedur IMVIC :

a. Tes Indol

- Medium *Tryptophan broth* (Indol media) diinokulasi dengan kuman yang diperiksa.
- Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
- Teteskan reagens Kovacs atau Ehrlich.
- Hasil positif apabila terjadi cincin merah pada permukaan broth.
- Hasil negatif apabila tidak ada perubahan warna reagen (kuning).
- Pada *Salmonella Typhimurium* tes indol negatif.

b. Tes *Methyl Red*

- Medium MR-VP diinokulasi dengan kuman yang diperiksa.
- Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
- Tetesi dengan 5 tetes indikator *methyl red*.
- Hasil positif apabila warna medium menjadi merah.
- Hasil negatif apabila medium menjadi kuning.

- Pada *Salmonella* Typhimurium tes *methyl red* positif.
- c. Tes *Voges-Proskauer*
- Medium MR-VP diinokulasi dengan kuman yang diperiksa.
 - Inkubasi selama 24 jam 37°C.
 - Tambahkan alpha-naphtol dalam alcohol absolute (15 tetes) + KOH 40% (10 tetes).
 - Hasil positif bila terjadi warna merah kecoklatan (terjadi pembentukan acetylmethylcarbinol) dalam waktu 15-30 menit.
 - Pada *Salmonella* Typhimurium tes *Voges-Proskauer* negatif.
- d. Tes *Sitrat*
- Medium *Cimon's citrate* diinokulasi dengan kuman yang diperiksa menggunakan ose lurus, dengan cara menggores bentuk garis lurus pada permukaan medium.
 - Inkubasi semalam pada suhu 37°C.
 - Hasil positif bila medium berubah menjadi biru prussic yang menunjukkan bahwa kuman menggunakan citrat sebagai satu-satunya sumber karbon.
 - Pada *Salmonella* Typhimurium tes *Sitrate* positif.
- e. Tes *Motilitas*
- Medium semisolid diinokulasi dengan kuman yang diperiksa, menggunakan ose lurus dengan cara menusuknya.
 - Inkubasi semalam pada suhu 37°C.
 - Kuman yang motil akan tumbuh menyebar (terlihat bagian keruh yang menyebar), sedang kuman yang non motil hanya tumbuh pada garis bekas tusukan.

- Pada *Salmonella* Typhimurium tes motilitas positif.
- f. Tes Urease
 - Medium cair yang mengandung urea diinokulasi dengan kuman yang diperiksa.
 - Inkubasi semalam pada suhu 37°C.
 - Tes urease positif (kuman memecah urea) akan terbentuk amonia dan menyebabkan medium berwarna merah-ungu (karena suasana menjadi alkali).
 - Pada *Salmonella* Typhimurium tes urease positif.

4.8.2.6 VITEK

VITEK[®] 2 merupakan suatu alat laboratorium yang secara otomatis dan cepat dapat melakukan identifikasi mikroba secara akurat serta dapat melakukan tes kepekaan mikroba terhadap antibiotik tertentu. Komponen terpenting dari Vitek 2 adalah *identification cards* (ID) dan *antibiotic susceptibility testing* (AST) cards. Vitek 2 card terdiri dari 64 *microwells*, setiap *well* berisi substrat untuk identifikasi bakteri atau antimikroba.

4.8.3 Persiapan Suspensi Uji *Salmonella* Typhimurium

- Koloni dengan karakteristik sama diambil dari lempeng agar *Mueller Hinton* kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi *Nutrient Broth*.
- Tabung reaksi lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- Dilakukan spektrofotometri pada tabung reaksi di atas dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui OD (Optical Density) dari suspensi.

- Dari nilai absorbansi dapat diperkirakan jumlah kuman pada perbenihan cair dengan kalibrasi yang sudah diketahui yaitu absorbansi 0,1 ekuivalen dengan jumlah kuman sebesar 10^8 CFU/ml.
- Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 CFU/ml (sesuai standar McFarland 0,5) yang setara dengan OD=0,1 (Murray *et al*, 1999), maka dilakukan perhitungan sebagai berikut:

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

Keterangan :

N_1 = 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)

Dari hasil perhitungan tersebut diperoleh volume bakteri (ml) yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan konsentrasi 10^6 CFU/ml sebanyak 10 ml.

- Lakukan pengenceran suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml sebanyak 100 kali untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10^6 CFU/ml. Caranya dari 10 ml bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi 9 ml NaCl sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^7 CFU/ml. Lalu dari larutan dengan konsentrasi 10^7 CFU/ml tersebut diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml NaCl sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^6 CFU/ml.

4.8.4 Uji Antimikroba Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit

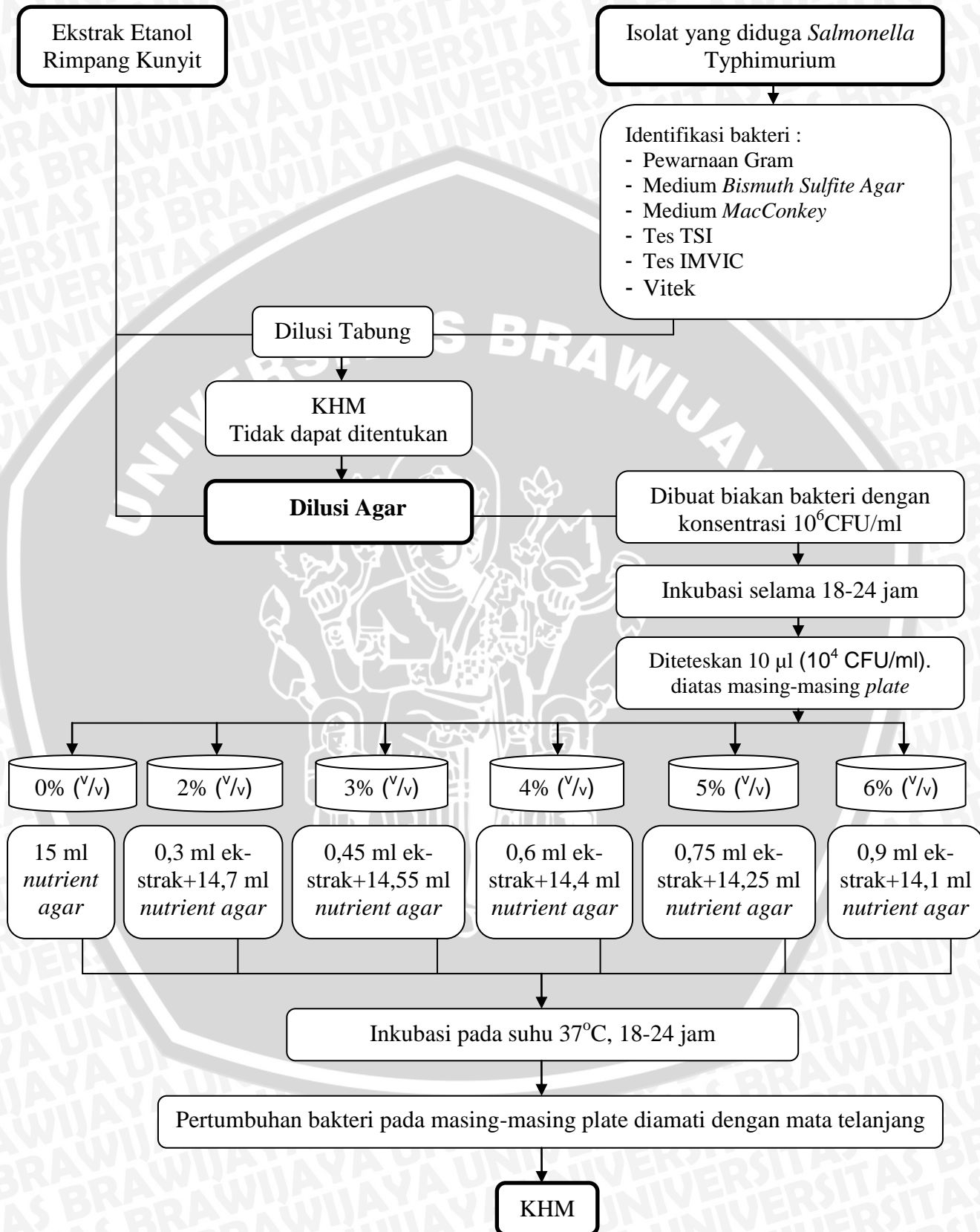
Tes dilusi agar dilakukan karena untuk menentukan KHM tidak dapat menggunakan metode dilusi tabung. Hal ini disebabkan ekstrak rimpang kunyit berwarna kuning gelap serta terdapat endapan sehingga mengganggu visualisasi untuk menentukan KHM.

Prosedur tes dilusi agar adalah sebagai berikut :

- a. Disediakan 6 *plate* berdiameter 9 cm dan telah diberi tanda I, II, III, IV, V dan VI. *Plate* sebelumnya telah disterilisasi dengan menggunakan *autoclaf* (suhu 121°C selama 15 menit), kemudian didinginkan hingga suhunya mencapai 48-50°C.
- b. Masing-masing *plate* diisi dengan larutan ekstrak etanol daun rimpang kunyit (*Curcuma domestica*) dengan konsentrasi 0%, 2%, 3%, 4%, 5% dan 6% dan dicampur dengan *nutrient agar*. Volume yang dipakai dalam setiap *plate* adalah 15 ml. Dengan perhitungannya sebagai berikut :
 - Konsentrasi 0% ($\%v/v$) : tanpa ekstrak + 15 ml *nutrient agar*
 - Konsentrasi 2% ($\%v/v$) : 0,3 ml ekstrak etanol rimpang kunyit + 14,7 ml *nutrient agar*
 - Konsentrasi 3% ($\%v/v$) : 0,45 ml ekstrak etanol rimpang kunyit + 14,55 ml *nutrient agar*
 - Konsentrasi 4% ($\%v/v$) : 0,6 ml ekstrak etanol rimpang kunyit + 14,4 ml *nutrient agar*
 - Konsentrasi 5% ($\%v/v$) : 0,75 ml ekstrak etanol rimpang kunyit + 14,25 ml *nutrient agar*

- Konsentrasi 6% (%v) : 0,9 ml ekstrak etanol rimpang kunyit + 14,1 ml *nutrient agar*
- c. Bakteri uji yang dipakai diencerkan sampai 10^6 CFU/ml
- d. Keesokan harinya, setiap *plate* tersebut dibagi 4 untuk masing-masing isolat karena dalam penelitian ini menggunakan 4 pengulangan sama dengan 4 isolat yang akan ditetesi bakteri uji sebanyak $10\mu\text{l}$ (10^4 CFU/ml). Kemudian semua plate diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C .
- e. Koloni yang tumbuh pada agar *plate* diamati. *Plate* dengan konsentrasi terendah dimana sudah tidak didapatkan pertumbuhan bakteri adalah plate dengan konsentrasi yang dapat disebut sebagai Kadar Hambat Minimum (Andrews,2001).





Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian

4.9 Analisis Data

Data hasil penelitian adalah data nonparametrik (+4, +3, +2, +1 dan 0) dari hasil pertumbuhan bakteri *Salmonella Typhimurium* pada *agar plate* yang telah diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Analisis statistik dilakukan dengan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 20.0 dengan signifikansi 0,05 (5%). Hipotesis dilakukan melalui H_0 diterima bila nilai signifikansi yang diperoleh $p > 0,05$. Adapun H_0 ditolak bila nilai signifikansi yang diperoleh $p < 0,05$. Adapun H_0 dari penelitian ini adalah tidak ada pengaruh pemberian ekstrak etanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica*) terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella Typhimurium*. Sedangkan H_1 -nya adalah ada pengaruh pemberian ekstrak etanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica*) terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella Typhimurium*.

Analisis data yang digunakan adalah uji statistik Kruskal Wallis untuk mengetahui adanya perbedaan derajat pertumbuhan bakteri *Salmonella Typhimurium* pada kelompok yang diberikan berbagai konsentrasi ekstrak etanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica*) dan yang tidak diberikan ekstrak etanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica*) pada media agar sehingga dapat disimpulkan apakah ekstrak etanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica*) mempunyai efek antimikroba terhadap *Salmonella Typhimurium*. Uji Mann Whitney digunakan untuk mengetahui perbedaan pengaruh pemberian ekstrak etanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica*) sebagai antimikroba terhadap *Salmonella Typhimurium* pada setiap konsentrasi yang diberikan. Dan uji Korelasi Spearman untuk mengetahui besarnya keeratan hubungan dari pemberian ekstrak etanol rimpang kunyit (*Curcuma domestica*) terhadap pertumbuhan *Salmonella Typhimurium*.