BAB 4
METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian *True Experimental in Vitro* dengan metode dilusi agar untuk menguji efek ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) sebagai anti bakteri terhadap *Shigella dysenteriae* secara *in vitro.*

Kelompok kontrol dari penelitian ini adalah *Shigella dysenteriae* yang tidak diberi larutan ekstrak kulit buah manggis (konsentrasi 0%). Kelompok perlakuan adalah isolat *Shigella dysenteriae* yang diberi larutan ekstrak kulit buah manggis dengan berbagai kosentrasi.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Juni 2013- oktober 2013.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan di penelitian ini adalah bakteri *Shigella dysentreriae* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakukltas Kedokteran Brawijaya Malang dengan kode isolat EQAM BELGIA.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas (*Dependent Variable*)

Variabel bebas dari penelitian ini adalah ekstrak kulit dari buah manggis dengan konsentrasi 0%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5% $^{v}/_{v}$. Konsentrasi tersebut ditentukan berdasarkan eksplorasi awal atau penelitian pendahuluan.

4.4.2 Variabel Tergantung (Independent Variable)

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah tingkat pertumbuhan dari bakteri *Shigella dysenteriae.*

4.5 Estimasi Jumlah Pengulangan

Estimasi jumlah pengulangan dari penelitian ini dihitung dengan rumus :

p (n-1) ≥ 16 (Loekito, 1998)

6 (n-1) ≥ 16

6n-6 ≥ 16

6n ≥ 23

n ≥ 3,83 = 4

Keterangan :

n = jumlah pengulangan yang akan dilakukan

p = jumlah kelompok sampel yaitu terdiri dari 6 konsentarsi

Berdasarkan perhitungan di atas, maka besar pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah 4 kali.

4.6 Definisi Operasional

a) Kulit buah manggis yang digunakan pada penelitian ini berasal dari Balai Materia Medika, Batu, Jawa timur.

b) Ekstrak kulit buah manggis adalah ekstrak cair dari kulit buah manggis yang diambil bagian dalamnya saja lalu diekstrak menggunakan pelarut etanol 96% melalui proses maserasi karena mudah dilakukan dan proses evaporasi untuk menghilangkan pelarut etanol.

c) Isolat dari *Shigella dsynteriae* adalah satu isolat dengan kode EQAM BELGIA yang diperoleh dari Lab kesda Yogya dan dibiakkan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

d) Konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini 0%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% , 0,5% $^{v}/_{v}$ berdasarkan hasil penelitian pendahuluan. Oleh karena pertumbuhan koloni tidak dapat dihiting maka hasil penelitian dinyatakan dalam bentuk skoring, yaitu +3, +2, +1, 0. Adapun batasan skoring adalah sebagai berikut :

- +3 koloni bakteri tumbuh tebal, koloni tidak dapat dihitung , diameter pertumbuhan koloni lebar,
- +2 koloni bakteri tumbuh tipis, koloni tidak dapat dihitung, diameter pertumbuhan koloni sempit/kecil,
- +1 koloni bakteri tumbuh sangat tipis, koloni tidak dapat dihitung, diameter pertumbuhan koloni sangat sempit/kecil,
- 0 berarti bakteri tidak ada pertumbuhan koloni bakteri.

e) Kadar Hambat Minimal (KHM) yaitu kadar terendah dari konsentrasi ekstrak kulit buah manggis yang mampu menghambat pertumbuhan *Shigella dsynteriae* dimana tidak dijumpai lagi koloni bakteri.

4.7 Alat dan Bahan

4.7.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pisau, blender, timbangan analitik, kertas saring, alat inkubasi, evaporator set, mikroskop, obyek glass, kapas lidi, vortex, *colony counter*, tabel NCCLS, pipet ukur, ose, bunsen dan *beaker glass.*

4.7.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah manggis yang berupa serbuk, etanol 96%, biakan murni *Shigella dsyenteriae,* medium padat agar Mac Conkey, medium Salmonella-Shigella, Nutrient Broth, Aquades steril, bahan pewarnaan gram berupa kristal violet, lugol alkohol 96%, safranin.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Proses Ekstraksi

a) Kulit buah manggis dipanaskan sampai kering di bawah sinar matahari. Kemudian kulit manggis tersebut dihaluskan dengan menggunakan blender
b) Kulit manggis yang halus ditimbang 300 gram lalu dibungkus menggunakan kertas saring dan direndam dalam etanol 96% selama semalam (±12 jam).
c) Mengganti etanol 96% yang digunakan untuk merendam beberapa kali sampai air ekstrak jernih. Kemudian hasil ekstraksi dievaporasi.

4.8.2 Proses Evaporasi

a) Memasang Evaporator set pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan 30-40 derajat terhadap meja dengan susunan dari bawah ke atas alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotary evaporator* dan tabung pendingin
b) Menghubungkan tabung pendingin dengan pompa sirkulasi air dingin yang terhubung dengan bak penampung air dingin melalui pipa plastik. Tabung pendingin juga terhubung dengan pompa vakum dan penampung hasil penguapan.
c) Memasukkan hasil ekstraksi dalam labu penampung sedangkan *rotary* evaporator, alat pompa sirkulasi air dingin dan alat pompa vakum dinyalakan.

d) Menyalakan pemanas aquadest sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi mendidih sampai dengan suhu 80^0 C (sesuai titik didih etanol) dan etanol mulai menguap.
e) Hasil penguapan etanol dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tidak tercampur hasil evaporasi dan uap lain tersedot pompa vakum.
f) Melakukan proses evaporasi sampai volume hasil ekstraksi berkurang dan menjadi kental.
g) Menghentikan proses evaporasi jika volume hasil ekstraksi berkurang dan sudah menjadi kental lalu ambil hasil proses evaporasi.
h) Menampung hasil evaporasi ke dalam cawan penguap kemudian oven selama 2 jam pada suhu 80^0C untuk menguapkan pelarut yang tersisa sehingga didapatkan hasil ekstraksi 100%, sejumlah 100 ml ekstrak kulit buah manggis.

4.8.3 Identifikasi Bakteri Uji *Shigella dysenteriae*

Sebelum digunakan untuk penelitian, isolat *Shigella dysenteriae* yang diperoleh diidentifikasi ulang dengan pewarnaan Gram (didapatkan bentuk batang Gram negatif), inokulasi pada agar Mac Conkey dan diinokulasikan pada agar SS dan diuji menggunakan kit Microbact. (Jawetz*, et al*., 2001).

4.8.3.1 Inokulasi Pada Agar Mac Conkey

a) Menanam spesimen pada *nutrient broth*
b) Spesimen diinkubasikan semalam pada suhu 37°C
c) Biakan yang telah ditanam pada selenite broth kemudian ditanam dalam agar Mac Conkey untuk mendapatkan koloni yang terpisah.
d) Biakan diinkubasi semalam pada suhu 37°C

e) Biakan akan tidak berwarna karena *Shigella dysenteriae* tidak memfermentasi laktosa.

4.8.3.2 Pewarnaan Gram

a) Membuat sediaan hapusan bakteri pada glas obyek
b) Menuangi sediaan dengan kristal violet lalu biarkan selama 1 menit, kemudian sisa kristal violet dibuang lalu bilas dengan air
c) Menuangi sediaan dengan lugol lalu biarkan selama 1 menit, kemudian sisa lugol dibuang lalu bilas dengan air
d) Menuangi sediaan dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur lalu buang sisa alkohol dan bilas dengan air
e) Menuangi sediaan dengan safranin selama 0,5 menit lalu buang sisa safranin dan bilas dengan air
f) Mengeringkan dengan kertas penghisap
g) Meletakan di mikroskop lalu berikan minyak emersi agar lebih jelas
h) Melihat dengan perbesaran lensa obyektif 100 kali
i) Melihat jika bakteri *Shigella dysenteriae* akan berbentuk batang berwarna merah karena termasuk bakteri Gram Negatif.

4.8.3.3 Inokulasi pada agar SS

a) Melarutkan 60 gram media dalam 1 liter air destilasi
b) Mencampur dengan baik sampai diperoleh campuran homogen
c) Memanaskan sampai mendidih satu menit jangan di autoklaf
d) Mendinginkan sampai suhu 40-50 °C tuang ke dalam petri
e) Menyimpan pada suhu 8-15 °C dengan pH 7,0 ± 0,1

f) Media tidak berwarna karena *Shigella dysenteriae* tidak menfermentasikan laktosa

4.8.3.4 Preparasi Uji Bakteri

Perbenihan cair bakteri dari *Nutrient broth* dinilai absorbansinya dengan spektrofotometer pada gelombang cahaya 625 nm. Melalui nilai absorbansi dapat diperkirakan jumlah bakteri pada perbenihan cair dengan kalibrasi yang sudah diketahui yaitu absorbansi 0,1 ekuivalen dengan jumlah bakteri sebesar 10^8 CFU/ml. Dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N_1 = Nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometer)

V_2 = Volume suspensi bakteri uji (10 ml)

N_2 = Optical density (0,1= setara dengan 10^8/ml)

N_1 sama dengan nilai absorbansi yang didapat sedangkan N_2 adalah absorbansi 0,1 yang ekuivalen dengan jumlah bakteri 10^8 CFU/ml. V adalah volume suspensi bakteri. Sehingga diperoleh volume 10 ml bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8/ml sebanyak 10 ml. Konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ml tersebut diencerkan dengan menambahkan 1 ml perbenihan (10^8 CFU/ml) ke dalam 9 ml *Nutrient broth* untuk mendapatkan konsentrasi sebesar 10^7CFU/ml. Kemudian dilakukan pengenceran lagi dengan mangambil 1 ml perbenihan cair (10^7 CFU/ml) untuk ditambahkan pada 9 ml *Nutrient broth* sehingga akhirnya didapatkan konsentrasi

bakteri yang diinginkan yaitu sebesar 10^6 CFU/ml. Kini suspensi bakteri telah siap digunakan untuk penelitian.

4.9 Uji Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Manggis

- Menyediakan 6 cawan petri berdiameter 9 cm dan telah diberi label sesuai konsentrasinya. Masing-masing plate berisi ekstrak kulit buah manggis dengan konsentrasi 0%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5% $^{v}/_{v}$ dan dicampur dengan *nutrient broth* yang sebelumnya telah disterilisasi selama kurang lebih 30 menit dengan menggunakan autoclaf.
- Volume total yang dipakai dalam setiap cawan petri (agar+ekstrak) adalah 15ml, jadi volume ekstrak yang dimasukan ke dalam cawan petri adalah 0%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, dan 0,5% $^{v}/_{v}$. Sedangkan sisanya adalah volume agar steril yang masih cair.
- Bakteri uji yang dipakai adalah bakteri dengan daya 10^4 CFU/ml.
- Setiap cawan petri tersebut masing masing dibagi menjadi 4 bagian sama besar karena dalam penelitian ini menggunakan pengulangan 4 kali.Pada setiap bagian ditetesi bakteri uji sebanyak 10µl. Kemudian semua cawan petri diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37°C.
- Semua cawan petri diamati. Dilihat apakah masih ada pertumbuhan dari bakteri di setiap cawan petri yang ditanam. KHM adalah konsentrasi terendah dimana sudah tidak didapatkan pertumbuhan bakteri pada cawan petri.

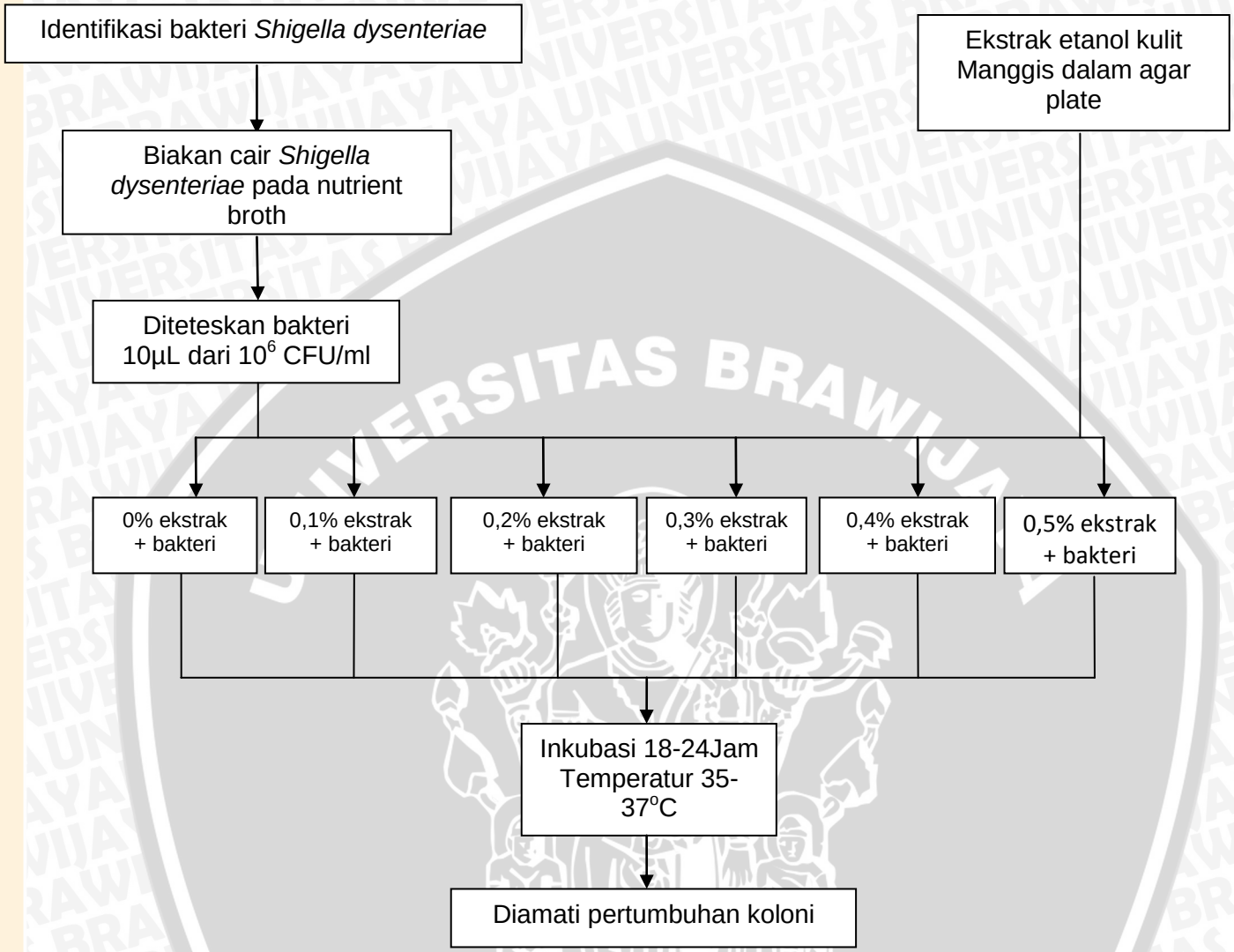
4.10 Analisis Data

Data penelitian diperoleh dengan mengamati hasil pertumbuhan koloni *Shigella dysenteriae* pada agar plate yang telah diinkubasikan pada suhu 37°C selama

18-24 jam berupa data ordinal. Analisis yang digunakan adalah uji statistik Kruskall Wallis untuk mengetahui perbedaan pengaruh dari berbagai konsentrasi ekstrak kulit buah manggis terhadap *Shigella dysenteriae* dan uji Mann Whitney menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan sehingga dapat disimpulkan apakah ekstrak kulit buah manggis mempunyai pengaruh antimikroba yang signifikan terhadap *Shigella dysenteriae,*

Selain itu juga dilakukan Uji Korelasi Spearman, untuk mengetahui besarnya keeratan hubungan pemberian perlakuan terutama yang disebabkan oleh pemberian ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) dengan pertumbuhan koloni bakteri *Shigella dysenteria*e. Dalam penelitian ini, taraf kepercayaan yang dipakai adalah 95% (α=0,05). Bermakna bila p<0.05.

Secara sistematis, alur kerja dapat dilihat pada Gambar 4.1



Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian