

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental secara *in vitro* dengan rancangan *post test control group design* untuk menguji efek antibakteri ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap *Acinetobacter baumannii*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

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

4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah bakteri *Acinetobacter baumannii* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Jumlah perlakuan yang diberikan ada enam, yang artinya satu kontrol bakteri dan lima macam konsentrasi ekstrak etanol daun binahong. Estimasi jumlah pengulangan dalam penelitian dihitung dengan rumus $p (n-1) \geq 16$ (Lukito, 1998). Sehingga hasil perhitungannya:

$$p (n-1) \geq 16$$

$$5 (n-1) \geq 16$$

$$5n-5 \geq 16$$

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4,2 \approx 4$$

keterangan : n : jumlah pengulangan
p : jumlah perlakuan

Jadi dari hasil perhitungan di atas, untuk memenuhi persyaratan uji statistik, diperlukan empat kali ulangan untuk sampel.

4.4 Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas di dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dengan konsentrasi 0%, 11%, 12%, 13%, 14% dan 15%. Dosis tersebut didapatkan berdasarkan eksplorasi awal atau penelitian pendahuluan (Lampiran 1).

2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan *Acinetobacter baumannii* yang diamati dari media *natrium agar plate* (NAP) dan jumlah koloni pada medium NAP

4.5 Definisi Operasional

1. Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis)

Daun binahong yang digunakan untuk penelitian ini diperoleh dan divalidasi oleh UPT Materia Medika Batu (Lampiran 3) dan diekstraksi di Politeknik Negeri Malang dengan cara maserasi dan evaporasi (pemisahan zat-zat aktif dengan pelarutnya) dengan menggunakan pelarut etanol 96%.

2. Isolat Bakteri *Acinetobacter baumannii*

Bakteri *Acinetobacter baumannii* yang digunakan untuk penelitian ini didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

3. Kadar Hambat Minimal (KHM)

KHM adalah kadar atau konsentrasi terendah dari larutan ekstrak etanol daun binahong yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Acinetobacter*

baumannii pada media NAP. Hal ini ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri yang tumbuh pada media NAP yang berisi ekstrak etanol daun binahong setelah diinkubasi selama 18-24 jam (Dzen dkk., 2010)

4. Kadar Bunuh Minimal (KBM)

KBM adalah kadar atau konsentrasi terendah dari larutan ekstrak etanol daun binahong yang mampu membunuh bakteri *Acinetobacter baumannii*. Hal ini ditandai dengan jumlah koloni bakteri pada medium NAP yang telah dilakukan penggoresan (streaking) dengan satu ose larutan ekstrak daun binahong yang telah diberi bakteri uji dan diinkubasi selama 18-24 jam kurang dari 0,1% *original inoculum* (OI). Perhitungan jumlah koloni menggunakan *colony counter* (Dzen dkk., 2010)

5. *Original inoculum*

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.

6. Kontrol bahan

Kontrol bahan adalah ekstrak etanol daun binahong murni sebanyak 2ml dan tidak dicampur dengan bakteri *Acinetobacter baumannii*. Kontrol bahan digunakan untuk mengetahui apakah bahan yang digunakan steril.

7. Kontrol bakteri

Kontrol bakteri adalah biakan bakteri *Acinetobacter baumannii* murni yang tidak ditambahkan larutan ekstrak etanol daun binahong. Kontrol bakteri digunakan untuk mengetahui apakah bakteri yang digunakan terkontaminasi dengan bakteri lain.

4.6 Instrumen Penelitian

1. Alat dan Bahan untuk Identifikasi Bakteri

Alat: Tabung reaksi, ose, lampu spiritus atau bunsen, inkubator, spektrofotometer, korek api.

Bahan : Isolat bakteri *Acinetobacter baumannii*, media agar *MacConkey*.

2. Alat dan Bahan untuk Pewarnaan Gram

Alat: *Object glass* dan kaca penutup, lampu spiritus atau bunsen, ose, mikroskop, minyak emersi, korek api.

Bahan: Suspensi bakteri dari *Nutrient Broth*, bahan pewarnaan Gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), aquades steril, kertas penghisap atau *tissue*.

3. Alat dan Bahan untuk Ekstraksi dan Evaporasi Daun Binahong

Alat: Oven, blender, timbangan, gelas Erlenmeyer, corong gelas, kertas saring, evaporator, pendingin spiral (*rotary evaporator*), selang *water pump*, *water pump*, *water bath*, *vacuum pump*, botol hasil ekstrak, pisau.

Bahan: daun binahong, etanol 96%, NaCl 0,9%

4. Alat dan Bahan untuk Uji Dilusi Agar dan Tabung

Alat: Tabung reaksi, pipet steril ukuran 1 ml dan 10 ml, karet penghisap, inkubator, vortex, bunsen, korek api, *object glass*, plate kosong steril, alat penjepit (skalpel) steril, kapas, *colony counter*.

Bahan: ekstrak etanol daun binahong, suspensi bakteri dari *Nutrient Broth*.

4.7 Prosedur Penelitian

1. Pewarnaan Gram

- 1) Satu tetes *aquades* steril atau larutan *saline* ditetaskan pada *object glass*.

Ose disterilkan dengan cara dibakar di atas api sampai berpijar, lalu ambil

sedikit koloni *Acinetobacter baumannii* untuk disuspensikan dengan satu tetes *aquades* steril lalu hapusan dibiarkan kering di udara.

- 2) Suspensi *Acinetobacter baumannii* yang telah kering difiksasi dengan cara melewatkannya di atas bunsen beberapa kali kemudian sediaan siap diwarnai.
- 3) Sediaan ditetesi dengan kristal violet dan ditunggu selama 1 menit. Kemudian kristal violet dibuang dan dibilas dengan air mengalir perlahan-lahan.
- 4) Sediaan ditetesi dengan lugol dan ditunggu selama 1 menit. Kemudian buang sisanya dan dibilas dengan air.
- 5) Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna catnya luntur, kemudian buang sisanya dan dibilas dengan air.
- 6) Sediaan ditetesi dengan safranin dan ditunggu selama 30 detik, kemudian sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- 7) Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap dan siap untuk dilihat dibawah mikroskop. Amati sediaan di bawah mikroskop dengan menggunakan perbesaran lensa obyektif 100x.
- 8) Bakteri *Acinetobacter baumannii* pada pewarnaan gram menunjukkan ciri-ciri bakteri gram negatif, yaitu koloni bakteri berwarna merah serta berbentuk batang (basil) (khas pada *Acinetobacter baumannii*) (Dzen dkk., 2010).

2. Pembenihan Pada Agar MacConkey

- 1) Spesimen ditanam pada *selenite broth* kemudian diinkubasi semalam pada suhu 37°C
- 2) Biakan pada *selenite broth* (1 ose) ditanam pada agar *MacConkey* untuk mendapatkan koloni terpisah kemudian diinkubasi semalam pada suhu 37 °C

- 3) Bila warna media berubah menjadi merah artinya bakteri uji memfregmentasikan laktosa. Jika pada medium tampak koloni tidak berwarna (pucat), maka bakteri yang diuji tidak memfermentasikan laktosa (khas pada *Acinetobacter baumannii*) (Dzen dkk., 2010).

3. Pengujian Microbact 12A/E-24E

- 1) Melakukan uji oksidase terlebih dahulu dengan menggunakan strip oksidase.
- 2) Uji oksidase dilakukan dengan cara mengambil koloni bakteri dari media EMB menggunakan tusuk gigi kemudian menggoreskannya pada strip oksidase. Tunggu sampai kira-kira 10 detik dan amati perubahan yang terjadi.
- 3) Oksidase dikatakan positif jika strip oksidase berubah warna menjadi ungu dan dikatakan negatif jika strip oksidase tidak berubah warna. *Acinetobacter baumannii* menghasilkan uji oksidase negatif sehingga menggunakan *Microbact test 12A/12E*.
- 4) Satu koloni *Acinetobacter baumannii* yang telah diinkubasi selama 18-24 jam diambil dengan menggunakan ose kemudian dilarutkan kedalam 5 mL NaCl 0,9% pada tabung reaksi steril dan di-vortex hingga homogen.
- 5) Larutan bakteri *Acinetobacter baumannii* yang telah homogen ditetaskan ke dalam sumur *Microbact* sebanyak 100 IU (4 tetes), untuk sumur Lysin, Omitin, dan H₂S ditambah dengan tetesan *mineral oil* sebanyak 1-2 tetes. Setelah itu *Microbact* diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- 6) *Microbact* yang telah diinkubasi diambil kemudian ditetaskan 2 tetes reagen Nitrat A dan B pada sumur nomor 7, 2 tetes *Indol Kovact* pada sumur nomor 8, 1 tetes VP I dan VP II pada sumur nomor 10, dan 1 tetes TDA pada sumur nomor 12.

- 7) Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *Microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna dan hasilnya ditulis pada formulir *Patient Record*.
- 8) Angka-angka *oktal* didapat dari penjumlahan reaksi positif saja, dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka *oktal*).
- 9) Nama spesies bakteri dilihat dengan *software Microbact system* di komputer berdasarkan angka *oktal* yang didapat (Cahyadi, 2011).

4. Perbenihan

Koloni *Acinetobacter baumannii* ditanam pada *Nutrient Broth* dan diinkubasikan pada suhu 37^o–37,5^o C selama 18-24 jam.

5. 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 10⁸ 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 10⁸/ml)

N_1 sama dengan nilai absorbansi yang didapat sedangkan N_2 adalah absorbansi 0,1 yang ekuivalen dengan jumlah bakteri 10⁸ CFU/ml. V adalah volume suspensi bakteri. Sehingga diperoleh volume (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 NaCl untuk mendapatkan konsentrasi sebesar 10^7 CFU/ml. Kemudian dilakukan pengenceran lagi dengan mengambil 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 (Darusman, 2003).

6. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Binahong

Proses pembuatan ekstrak etanol daun binahong melalui 2 tahap, yaitu :

6.1 Proses Ekstraksi (Metode Maserasi)

Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada suhu ruangan. Prosesnya sebagai berikut:

- 1) Daun binahong dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran dan sisa-sisa tanah.
- 2) Proses selanjutnya adalah memotong atau mengiris daun menjadi kecil-kecil untuk mempercepat proses pengeringan.
- 3) Daun dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 50°C sehingga kandungan air berkurang.
- 4) Setelah melalui proses pengeringan, daun binahong dihaluskan dengan blender sehingga bentuknya menyerupai bubuk.
- 5) Bubuk ditimbang dan diambil sebanyak 100gr (sampel kering).
- 6) Bubuk dibungkus kertas saring *whatman* no 41 dan dimasukkan ke dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1L.
- 7) Rendam dengan etanol 96% hingga volume 1L.

- 8) Aduk larutan sampai benar-benar tercampur, kurang lebih 30 menit dan diamkan satu malam sampai mengendap.
- 9) Proses perendaman dilakukan sebanyak 3 kali kemudian lapisan atas campuran etanol 96% dengan zat aktif yang sudah terambil (Iswani, 2007).

6.2 Proses Evaporasi

- 1) Hasil maserasi yang berupa campuran etanol 96% dengan zat aktif daun binahong dimasukkan ke dalam labu evaporasi.
- 2) Menyalakan *rotary* evaporator (alat pompa sirkulasi air dingin dan alat pompa vakum).
- 3) Isi *Water bath* dengan air sampai penuh kemudian pasang semua rangkaian alat termasuk *rotary* evaporator.
- 4) Setelah itu pemanas *water bath* disambungkan dengan aliran listrik sehingga hasil maserasi dalam tabung penampung evaporasi mendidih sampai dengan suhu 70°C (titik didih etanol 96%). Larutan etanol 96% akan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
- 5) Hasil penguapan etanol 96 % dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tidak tercampur hasil evaporasi dan uap lain tersedot pompa vakum.
- 6) Proses evaporasi dilakukan hingga volume hasil ekstraksi berkurang dan menjadi kental.
- 7) Hasil evaporasi ditampung dalam cawan penguap kemudian dioven selama 2 jam untuk menguapkan pelarut yang tersisa sehingga didapatkan hasil ekstraksi 100%.

- 8) Apabila tidak sedang digunakan, ekstrak daun binahong tadi dapat disimpan dalam botol plastik tertutup kemudian disimpan dalam *freezer* (Iswani, 2007).

7. Uji Efektivitas Antibakteri

7.1 Pengujian Dilusi Agar Untuk Menentukan KHM (Kadar Hambat Minimal)

- 1) Siapkan 6 plate steril, beri tanda KK, 11%, 12%, 13%, 14% dan 15%
- 2) Masukkan 20,0 ml NAP agar ke dalam plate bertanda KK.
- 3) Masukkan 17,8 ml NAP agar ke dalam plate bertanda 11% lalu tambahkan 2,2 ml ekstrak etanol daun binahong.
- 4) Masukkan 17,6 ml NAP agar ke dalam plate bertanda 12% lalu tambahkan 2,4 ml ekstrak etanol daun binahong.
- 5) Masukkan 17,4 ml NAP agar ke dalam plate bertanda 13% lalu tambahkan 2,6 ml ekstrak etanol daun binahong.
- 6) Masukkan 17,2 ml NAP agar ke dalam plate bertanda 14% lalu tambahkan 2,8 ml ekstrak etanol daun binahong.
- 7) Masukkan 17,0 ml NAP agar ke dalam plate bertanda 15% lalu tambahkan 3,0 ml ekstrak etanol daun binahong.
- 8) Diamkan media agar tersebut hingga memadat dan permukaannya menjadi kering.
- 9) Masukkan plate ke dalam inkubator selama 24 jam untuk memastikan agar dalam plate tidak terkontaminasi.
- 10) Bagi plate menjadi 4 bagian sama luas dengan spidol marker
- 11) Setiap bagian pada masing-masing plate ditetesi 1 tetes bakteri *Acinetobacter baumannii* yang diambil pada suspensi bakteri dengan

kepadatan 10^6 CFU/ml. Volume 1 tetes mikropipet setara dengan 10 μ l bakteri yang mengandung 10^4 CFU/ml.

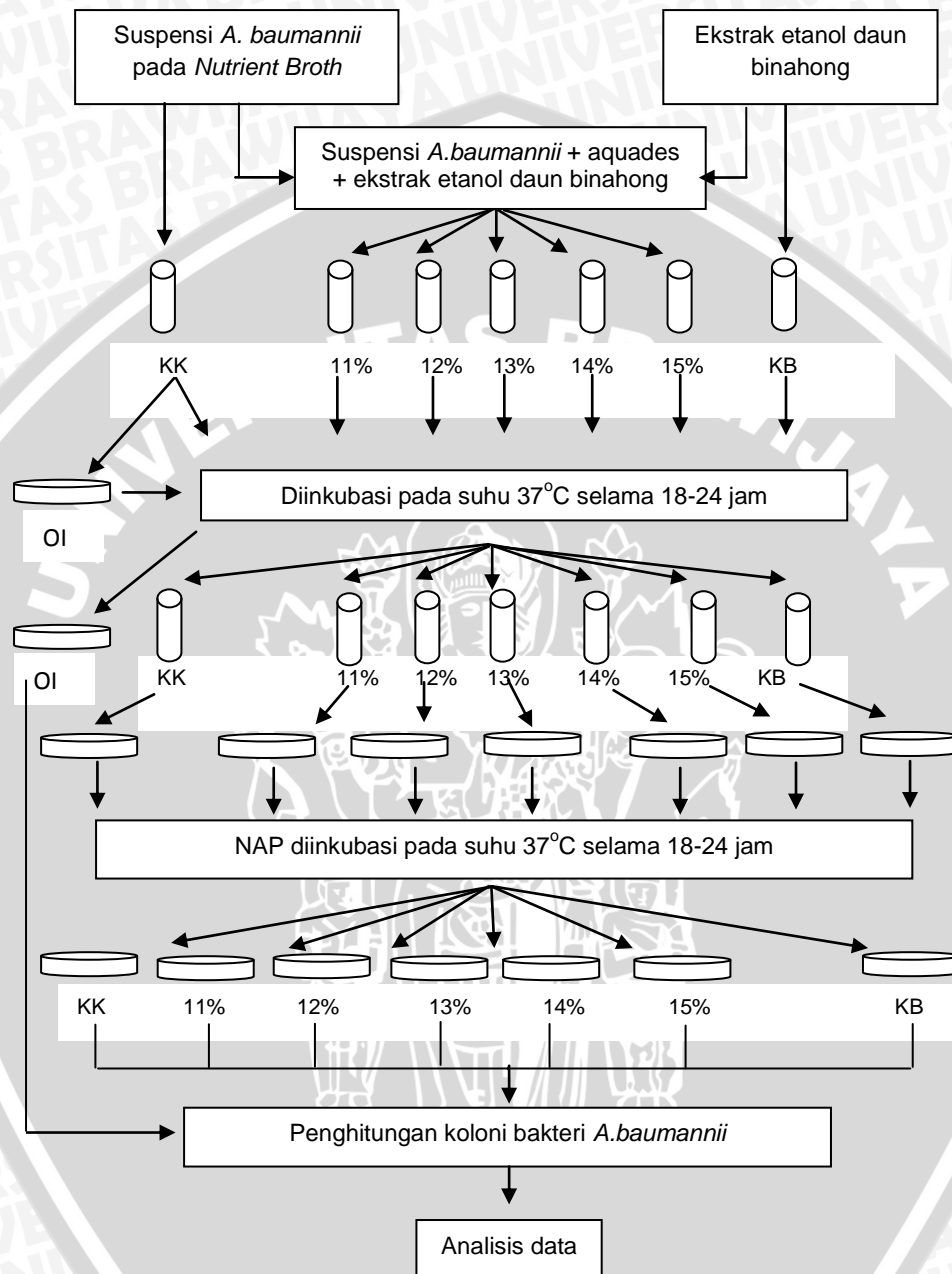
- 12) Semua plate diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 35-37°C selama 24 jam. Kemudian amati koloni bakteri yang tumbuh dengan kriteria +3: koloni tebal dan tidak terhitung; +2: koloni tipis dan tidak terhitung, +1: pertumbuhan koloni dapat dihitung; 0: tidak ada pertumbuhan koloni. Media NAP dengan konsentrasi terendah yang tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri, ditentukan sebagai KHM (Cahyadi, 2011).

7.2 Pengujian Dilusi Tabung Untuk Menentukan KBM (Kadar Bunuh Minimal)

- 1) Sediakan 7 tabung steril, 5 tabung sebagai uji antibakteri, 1 tabung sebagai kontrol bahan (KB), dan 1 tabung sebagai kontrol bakteri (KK).
- 2) Masukkan 0,89 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 11% lalu tambahkan 0,11 ml ekstrak etanol daun binahong.
- 3) Masukkan 0,88 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 12% lalu tambahkan 0,12 ml ekstrak etanol daun binahong.
- 4) Masukkan 0,87 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 13% lalu tambahkan 0,13 ml ekstrak etanol daun binahong.
- 5) Masukkan 0,86 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 14% lalu tambahkan 0,14 ml ekstrak etanol daun binahong.
- 6) Masukkan 0,85 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 15% lalu tambahkan 0,15 ml ekstrak etanol daun binahong.
- 7) Masukkan 1 ml ekstrak etanol daun binahong saja ke dalam tabung KB dan masukkan 1 ml suspensi bakteri saja ke dalam tabung KK.

- 8) Masukkan 1 ml suspensi bakteri *Acinetobacter baumannii* dengan konsentrasi bakteri 10^6 CFU/ml ke dalam tabung 1-5.
- 9) Ambil 1 ose bakteri dari tabung KK kemudian digoreskan pada NAP sebagai *original inoculum* kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu $35-37^{\circ}\text{C}$.
- 10) Masing-masing tabung di-*vortex* dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu $35-37^{\circ}\text{C}$.
- 11) Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. Dilihat kekeruhan tabung untuk menentukan apakah ekstrak keruh atau tidak.
- 12) Kemudian dari masing-masing tabung dilusi diambil 1 ose ($10\ \mu\text{l}$) kemudian digoreskan pada NAP dan diinkubasi 18-24 jam pada suhu $35-37^{\circ}\text{C}$.
- 13) Pada hari ketiga didapatkan data KBM dan dilakukan pengamatan kuantitatif pada masing-masing konsentrasi dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri dengan *colony counter*. KBM ditentukan dari tidak adanya jumlah koloni yang tumbuh pada NAP atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% jumlah koloni di OI (Eucast, 2000).

4.8 Diagram Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.1 Skema Alur Kerja Penelitian Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Binahong Terhadap *Acinetobacter baumannii*

Keterangan:

KK: Kontrol Bakteri OI: Original inoculum

KB : Kontrol Bahan NAP: Nutrient Agar Plate

4.9 Analisis Data

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif (KHM) didapatkan dengan melihat ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri pada media NAP. Data kuantitatif (KBM) didapatkan dengan menghitung jumlah koloni bakteri pada media NAP dengan menggunakan *colony counter*. Uji statistik yang digunakan untuk data kuantitatif adalah:

1. Uji normalitas data

bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak, karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis tergantung dari normal tidaknya distribusi data. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal, maka digunakan *mean* dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Sedangkan untuk penyajian data yang tidak terdistribusi normal digunakan *median* dan minimum-maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesis, jika sebaran data normal, maka digunakan uji parametrik. Sedangkan jika sebaran data tidak normal digunakan uji non parametrik.

2. Uji homogenitas varian

bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Jika didapatkan varian yang homogen, maka analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA. Tetapi jika didapatkan varian yang tidak homogen, dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA asalkan memiliki distribusi data yang normal.

3. Uji *One-way* ANOVA

Bertujuan untuk menguji kemampuan generalisasi atau signifikansi hasil penelitian.

4. *Post Hoc* Tukey

Bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA.

5. Uji korelasi

Uji korelasi bertujuan untuk membuktikan hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol daun binahong terhadap rata-rata jumlah koloni.

6. Uji regresi

Uji regresi bertujuan untuk mengetahui pengaruh variabel independen terhadap variabel dependen setelah diketahui ada hubungan antara variabel tersebut.

